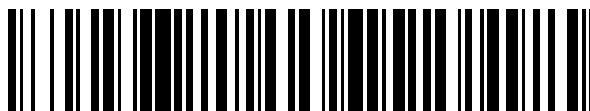


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 560**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2005 PCT/NL2005/000036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2005 WO05068622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2005 E 05704566 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 1737971**

54 Título: **Mezclas de proteínas de unión**

30 Prioridad:

20.01.2004 EP 04075170

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

14.12.2017

73 Titular/es:

**MERUS N.V. (100.0%)
Yalelaan 62
3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**LOGTENBERG, TON y
HOOGENBOOM, HENDRICUS, RENERUS,
JACOBUS, MATTHEUS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 646 560 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

Mezclas de proteínas de unión

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular, en particular a la biología molecular médica. El reconocimiento específico juega un papel importante en la biología médica moderna. Todas las interacciones de receptor y ligando, respuestas inmunes, infecciones, conversiones enzimáticas se basan en el reconocimiento específico entre moléculas. De particular interés son las interacciones proteína-proteína específicas, que brindan una enorme variedad de posibilidades para interferir en todo tipo de procesos biológicos. En toda la naturaleza se encuentran procesos biológicos que dependen de más de una interacción (simultánea) de proteínas. En la actualidad, parece que interferir en más de un punto en un proceso biológico será más efectivo que una única interferencia. Esta interferencia puede estar mediada por dos proteínas diferentes con actividad de unión (tales como los anticuerpos), cada una de las cuales se une a un epítipo en un objetivo u objetivos asociados con el proceso biológico, y posteriormente inhibe el proceso biológico. Particularmente en la terapia con anticuerpos se ve que un anticuerpo (monoclonal) frecuentemente no es suficientemente efectivo para tratar un trastorno y/o enfermedad particular. Por lo tanto, la atención de muchos investigadores médicos ahora se centra en las terapias de combinación. Ejemplos bien conocidos de combinaciones de anticuerpos que se siguen clínicamente en la actualidad son para el tratamiento del linfoma no Hodgkin, la combinación del anticuerpo anti-CD20 Rituxan ya aprobado con el anticuerpo anti-CD22 Epratuzumab de AmGen y para el tratamiento de la Hepatitis B, una combinación de dos anticuerpos humanos desarrollados por XTL Pharmaceuticals (Galun E. y otros, Hepatology (2002) 35: 673-679). Sin embargo, la combinación de múltiples (dos o más) fármacos (ya sean proteínas de unión, anticuerpos u otros) tiene una serie de inconvenientes técnicos, prácticos y regulatorios. En el pasado, las proteínas de unión, tales como los anticuerpos, no se diseñaron típicamente para funcionar y producirse en combinación entre sí y el desarrollo como combinaciones con una eficacia clínica y compatibilidad óptima puede ser un problema. Como un ejemplo, las condiciones para estabilizar una puede ser perjudicial para la estabilidad de la(s) otra(s). Además, múltiples fuentes de producción recombinante conducen a múltiples fuentes de riesgos tales como la contaminación viral, la contaminación priónica y similares.

30 Históricamente, las proteínas de unión más investigadas son los anticuerpos. Los anticuerpos normalmente muestran sitios de unión compuestos por dos cadenas polipeptídicas separadas, ensambladas como una proteína tetramérica en la molécula de inmunoglobulina IgG. Más recientemente, ha sido posible producir proteínas de unión de cadena polipeptídica simple, en las cuales la unión está mediada por un dominio de proteína único. Tales proteínas de unión pueden basarse en la misma secuencia o andamios de proteína altamente relacionados, aunque muestran especificidades de unión altamente divergentes. Definimos aquí SPCBP como proteína de unión de cadena polipeptídica simple, y las SPCBP como proteínas de unión de cadena polipeptídica simple. Frecuentemente se obtienen proporcionando en primer lugar un cierto nivel de diversidad en un andamio o pliegue de proteína monomérica elegido, que puede tener un origen natural o una base sintética, y después usar métodos de selección molecular o de selección para identificar entre las variantes de proteínas las que muestran una especificidad de unión conveniente. Alternativamente, se obtienen de la naturaleza, que además tiene algunas fuentes de las SPCBP, tales como los anticuerpos de 'cadena pesada solamente' de camélidos y tiburones.

40 La presente invención proporciona métodos para la producción de bibliotecas de células que expresan al menos dos proteínas de unión únicas separadas, en las que las proteínas de unión tienen diferentes epítopos objetivos. Estas bibliotecas se preparan mediante la integración de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas polipeptídicas en el genoma de la célula huésped y seleccionando las células que han integrado satisfactoriamente estos ácidos nucleicos. Las células seleccionadas se someten preferentemente a una etapa de clonación. Esta etapa de clonación se enlaza a una selección y/o etapa de tamizaje que implica selección y/o selección de células que producen proteínas de unión adecuadas, los ejemplos de tales pasos de selección se discuten en otra parte de esta solicitud. Se prefiere que los ácidos nucleicos que codifican estas cadenas polipeptídicas se relacionen en su secuencia de aminoácidos fuera de la región de unión de manera que la mezcla de proteínas de unión pueda aislarse mediante el mismo procedimiento de purificación fisicoquímico. En este contexto, se prefiere que las cadenas polipeptídicas sean al menos 70% homólogas. Al producir múltiples líneas de células huésped recombinantes que expresan cada una múltiples proteínas de unión y en las que cada línea celular expresa las proteínas en una relación establecida, pueden hacerse fácilmente muchas mezclas diferentes de proteínas de unión, y sin tener que expresar, purificar y caracterizar cada unión proteína de forma individual. Al evaluar tales mezclas en un ensayo de actividad biológica, puede determinarse la composición de la mezcla con la actividad biológica óptima, y se identifica la línea celular huésped concurrente que produce exactamente esta mezcla. Dado que se prefiere que la proteína de unión incluida en la invención comparta un cierto nivel de homología de secuencia de ácido nucleico y naturaleza fisicoquímica, la mezcla de proteínas de unión puede aislarse mediante procedimientos de purificación fisicoquímicos que con una eficacia similar purificarán todos los componentes de la unión de la mezcla de proteínas. Tal método proporciona un medio para producir mezclas de proteínas de unión para aplicaciones terapéuticas sin tener que producir individualmente los componentes de la mezcla, lo que tiene importantes inconvenientes técnicos, financieros y de tiempo. Los presentes inventores han abierto una ruta de mejoras en el tamizaje de las propiedades de las combinaciones de proteínas de unión. Estas mejoras y sus ventajas se harán evidentes a partir de la siguiente descripción.

65 Así, uno de los problemas técnicos subyacentes a la presente invención es proporcionar métodos para producir y evaluar mezclas de proteínas de unión sin tener que producir individualmente cada uno de los componentes de la

- mezcla. Una solución a este problema técnico se logra mediante la provisión de las modalidades caracterizadas en las reivindicaciones. Como consecuencia, la presente invención permite construir colecciones de proteínas de unión homólogas que se unen a diferentes epítomos objetivo, que se expresan en la misma célula huésped y en la que la homología conduce a un método común para la purificación de todas las proteínas de unión homólogas como una mezcla de proteínas. El enfoque técnico de la presente invención, es decir derivar bibliotecas de células que expresan mezclas de las SPCBP y tamizar tales bibliotecas para composiciones con bioactividad óptima, no se proporciona ni sugiere por la técnica anterior.
- El documento de patente WO 2004/106375 describe las combinaciones de proteínas de unión específicas, tales como inmunoglobulinas, y métodos para producir composiciones que comprenden al menos dos moléculas proteínicas diferentes que comprenden regiones variables apareadas.
- El documento de patente WO 94/02610 describe los métodos que comprenden la expresión intracelular de un anticuerpo capaz de unirse a una molécula objetivo o a un antígeno objetivo.
- El documento de patente WO 02/096948 describe los métodos, composiciones y kits que comprenden anticuerpos diméricos para el tratamiento de trastornos neoplásicos, autoinmunes u otros. Estos anticuerpos diméricos pueden comprender homodímeros o heterodímeros.
- El documento de patente US 2003/0194403 describe anticuerpos monoclonales humanos aislados que se unen específicamente al EGFR humano, y composiciones y moléculas basadas con el anticuerpo.
- El documento de patente WO 03/048306 describe sistemas de expresión para producir múltiples productos génicos de interés, que contienen un vector policistrónico capaz de expresar anticuerpos funcionales en células huésped eucariotas.
- Muyldermans S., *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 (2001) 277-302 describe métodos para aprovechar el repertorio de VHH de un dromedario o llama inmunizado y menciona el uso de intracuerpos VHH para tratar una infección viral.
- El documento de patente WO 03/046560 describe métodos para formar complejos multiméricos que tienen una afinidad mejorada para un objetivo. Dichos complejos multiméricos comprenden al menos tres unidades de autoensamblaje, por ejemplo, que incluyen la subunidad B de la verotoxina (VTB) de *Escherichia coli*.
- El documento de patente WO 03/106684 describe métodos para la producción de manera simultánea de múltiples proteínas multiméricas, tales como anticuerpos, en células huésped. Los monómeros/subunidades requeridos se producen en una relación predeterminada que es la relación natural (estequiometría) de las diferentes subunidades/monómeros/polipéptidos de las proteínas multiméricas.
- El documento de patente WO 03/002609 describe ligandos dobles específicos que comprenden un primer dominio variable de inmunoglobulina único que tiene una primera especificidad de unión y un dominio variable único de inmunoglobulina complementario que tiene una segunda especificidad de unión. Estos ligandos dobles específicos tienen al menos un par VH/VL.
- Skerra A., *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 (2001) 257-275 describe anticalinas como una nueva clase de proteínas de unión a ligando modificados genéticamente con propiedades similares a los anticuerpos.
- La unión se define como las interacciones entre moléculas que pueden distinguirse de las interacciones de fondo. Típicamente, la interacción específica entre las moléculas tiene mayor afinidad de unión, después de las interacciones de fondo entre las moléculas. Las proteínas de unión son proteínas formadas por una secuencia de residuos de aminoácidos y se unen a un epítomo de un objetivo. Las proteínas de unión específica se componen de residuos de aminoácidos (moléculas proteínicas).
- Al producir las dos o más especificidades de unión deseadas en un sistema, solo existe una fuente de los productos y de ese modo menos riesgo de contaminación con virus, priones y similares. Además es más probable que las modificaciones postraduccionales impuestas a las proteínas de unión como se expresan dentro de la célula huésped serán similares, si no indistinguibles, entre sí. Al contrario, mientras se producen proteínas de unión en diferentes células, incluso aun cuando éstas son células idénticas, las condiciones de cultivo afectarán a algunas de las modificaciones postraduccionales. Se prefiere llevar a cabo métodos de conformidad con la invención dentro de una célula inmortalizada, típicamente una línea celular eucariótica, y preferentemente CHO, SP2/0, NSO o PER. C6. Para la producción de bibliotecas y la selección de mezclas óptimas, pueden usarse otras células tales como bacterias, células de insectos, levaduras y otras eucariotas que son típicamente adecuadas para la producción de pequeñas proteínas globulares (*E. coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, etcétera), se prefieren.
- La producción de proteínas de unión separadas tiene lugar en la misma célula huésped. Una forma particularmente útil de producir proteínas de unión es a través de la expresión de ácidos nucleicos que codifican estas proteínas de unión.

Se prefiere que todas las proteínas de unión en una célula se produzcan mediante dicha expresión. Para la mayoría de los propósitos, la naturaleza del ácido nucleico no es crítica, es ARN, es preferentemente ADN, es episomal o integrado, parte de un vector viral o un plásmido. Se prefiere que dichas al menos dos proteínas de unión se codifiquen por secuencias de ácidos nucleicos separadas. En otra modalidad preferida dichas al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas al menos dos cadenas polipeptídicas individuales son parte del mismo ácido nucleico. De esta manera, el número de copia de dichas al menos dos secuencias de ácidos nucleicos, en relación entre sí, puede hacerse esencialmente constante. Aun en otra modalidad, dichas al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas al menos dos cadenas polipeptídicas individuales son parte de dos ácidos nucleicos diferentes. De esta forma, el número de copias de dichas al menos dos secuencias de ácidos nucleicos puede variarse entre sí, de una manera controlable. Para el sistema de producción final de la combinación de proteínas de unión que tienen diferentes especificidades de unión, se prefiere que el ácido nucleico o los ácidos que codifican las proteínas de unión se integren de manera estable en el genoma del huésped, preferentemente el ácido nucleico comprende medios para la integración dirigida del sitio secuencia de ácido nucleico que codifica dichas proteínas de unión, preferentemente dichos medios son medios para la recombinación homóloga. La producción de proteínas de unión a través de la expresión de ácidos nucleicos que los codifican da la posibilidad de manipular las secuencias de codificación, permitiendo de ese modo el diseño de nuevas especificidades de unión, intercambiando secuencias útiles de una secuencia de codificación a otra y similares.

Particularmente para elaborar las preparaciones terapéuticas de proteínas de unión múltiple, pueden hacerse fusiones de una o más de las proteínas de unión a una secuencia que no influye en la especificidad de unión de la proteína de unión en sí misma, sino que proporciona una función efectora o manejo de detección. Ejemplos de esto son beta galactosidasa, carboxipeptidasa G2 (u otras enzimas implicadas en la terapia con profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpos), ARNasa humana, Onconasa (u otras enzimas que degradan el ARN) o toxinas bacterianas o de plantas (ricina A, exotoxina de Pseudomonas), o citocinas o factores de crecimiento (TNF, IL-1, IL-12, GM-CSF). Los métodos descritos en la descripción detallada proporcionan la adaptación de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión al resultado final deseado.

La invención proporciona un método en donde dichas proteínas de unión son anticalinas, aficuerpos o anticuerpos de dominio único.

Un método de la invención se usa preferentemente para la producción de bibliotecas de células que expresan proteínas de unión múltiples (es decir, dos o más) en un sistema, y composiciones que comprenden múltiples proteínas de unión producidas por estos métodos. Para la producción biofarmacéutica de tales mezclas de proteínas, será necesario obtener un sistema de expresión que sea compatible con la escala de los procesos industriales que se emplean. Las células huésped típicamente recombinantes se fabrican en las que el sistema de expresión que codifica los transgenes (o los ácidos nucleicos que codifican una proteína de interés) se retienen por las células huésped en forma estable y activa durante las fases de crecimiento de escalado y producción. Esto se logra típicamente mediante la integración de los transgenes en el genoma de la célula huésped. Al seleccionar los eventos de integración exitosos (por ejemplo, mediante marcadores de selección codificados genéticamente presentes en los vectores de expresión usados para la transfección), se aíslan células que han integrado los ácidos nucleicos que codifican las cadenas polipeptídicas individuales y las expresan a niveles variables. La variación en los niveles de expresión se debe a muchos factores, que incluyen los efectos de clonación posicional y el número de copias del transgén. Esto crea una biblioteca de combinaciones que se tamiza en bioensayos para identificar la mezcla óptima. Los métodos proporcionan un medio para identificar una célula huésped que expresa las diferentes proteínas de unión en la relación óptima.

Otro elemento de la invención útil para el control de la producción de diversas bibliotecas es la expresión de diferentes genes que codifican proteínas de unión bajo el control de diferentes elementos reguladores tales como promotores, (trans) activadores, potenciadores, terminadores, antirrepresores, elementos estabilizadores anti represión (STAR), represores, regiones de control del locus, regiones de fijación a la matriz, sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) y similares. Estos elementos reguladores son constitutivos, inducibles o reprimibles y dependen de su función, proporcionados en cis o en trans. Así, la producción de proteínas de unión puede regularse y multiplicarse, proporcionando así un medio para lograr relaciones variables de proteínas de unión en cada célula, es decir, en donde dichos diferentes elementos reguladores dan lugar a diferentes niveles de expresión de diferentes proteínas de unión. Pueden hacerse diferentes combinaciones de proteínas de unión mediante separación en el tiempo de expresión de diversas proteínas de unión, y las relaciones entre diferentes proteínas de unión se manipulan regulando los niveles de expresión. Las variaciones se describen en la descripción detallada. Dichas secuencias de ácidos nucleicos comprenden una señal de secreción o una secuencia de codificación para localizar y anclar la proteína de unión resultante en una membrana celular.

En una modalidad particularmente preferida, dichas al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas al menos dos proteínas de unión están bajo el control de diferentes elementos reguladores.

En otra modalidad preferida, dichos elementos reguladores diferentes se eligen a partir de un promotor, preferentemente inducible, un potenciador, un terminador, un elemento estabilizante anti represor, un sitio interno de entrada al ribosoma, una región de fijación a la matriz, un elemento de apertura de la cromatina ubicuo, un elemento de límite, una región de control del locus o una región de fijación al andamio.

5 En una modalidad preferida, dichos diferentes elementos reguladores dan lugar a diferentes niveles de expresión de diferentes proteínas de unión. En esta modalidad, se prefiere que se produzcan al menos dos células y que se use una selección o tamizaje usando un bioensayo como se menciona anteriormente para seleccionar y/o tamizar una célula que expresa una relación favorable de dicha proteína de unión.

10 Se prefiere que cada célula codifique de 2-10 diferentes proteínas de unión de cadena única de aminoácidos separadas. Al menos las dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas al menos dos cadenas polipeptídicas individuales son preferentemente parte del mismo ácido nucleico, en células eucariotas o en parte de dos diferentes ácidos nucleicos (células eucariotas y procariotas).

15 Tales métodos son particularmente útiles cuando dichos dos epítomos objetivo se asocian con una enfermedad o trastorno. Se prefiere combinar un método de este tipo con el sometimiento de una combinación seleccionada de moléculas proteicas a un ensayo biológico indicativo de un efecto de la combinación sobre la enfermedad y/o el trastorno.

20 Estas mezclas multiespecíficas se parecen a las mezclas de anticuerpos policlonales en su eficacia para reconocer antígenos, pero sin los inconvenientes de muchas especificidades irrelevantes en la mezcla. Las mezclas de proteínas de unión se parecen a los anticuerpos monoclonales en su constitución definida, facilidad de producción y altas especificidades, pero sin la pérdida de eficacia concomitante. Las mezclas contienen así dos, tres o más especificidades de unión diferentes, y existen en varios formatos. En la forma más simple, una mezcla de proteínas de unión de conformidad con la invención contiene dos o más proteínas de unión relacionadas con diferentes especificidades de unión.

25 Como se describe en la presente descripción, los métodos y medios de la invención en una modalidad son la producción de combinaciones de especificidades. Antes de la producción de las combinaciones, deben diseñarse y/o seleccionarse las combinaciones adecuadas. Estos métodos de diseño y selección además son parte de la presente invención.

30 Los ácidos nucleicos preferidos para usar en la producción de combinaciones de especificidades son proteínas de unión creadas por la biotecnología combinatoria. Estos incluyen anticuerpos de dominio, o dAbs, anticuerpos de camélidos (VHH), anticalinas y aficuerpos), y sus variantes modificadas genéticamente (fusiones con otros efectores o etiquetas). Los anticuerpos de dominio pueden derivarse, por ejemplo, de regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina o regiones variables de cadena ligera de inmunoglobulina, pero además pueden ser híbridos modificados genéticamente de regiones variables de cadena pesada y ligera (con, por ejemplo, regiones CDR intercambiadas o regiones FR). Los Dabs pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de hibridomas, mediante clonación de donantes inmunes o no inmunes o pueden ser regiones variables construidas sintéticamente.

La invención se describirá en más detalles en la siguiente descripción detallada.

40 Leyendas de las figuras:

Figura 1. Esquema general del casete de expresión y los vectores de expresión para las células eucariotas. La leyenda de los elementos del vector se representa a la derecha. En (A) en el panel superior del lado izquierdo se representan tres casetes de expresión eucariota para tres proteínas de unión diferentes, BP1-3. Estos son esquemas de los elementos encontrados en un casete de expresión para un gen o ácido nucleico de proteína de unión de cadena polipeptídica simple, y típicamente comprende un promotor, una secuencia líder (opcional), un marco de lectura abierto que codifica la proteína de interés, una región de poliadenilación (para expresión eucariota) y un terminador, todo en configuración operativa. Además, se muestran los sitios (además son opcionales, indicados en la parte superior del primer casete de expresión) que se usan para la recombinación dirigida y en algunos casos homóloga. En su panel inferior se representa un esqueleto de vector ilustrativo que se usa para la inserción de casete(s) del panel superior. Este esquema muestra los elementos típicos de un vector de expresión eucariota, que comprende un origen de replicación bacteriano (como Col EI), un marcador de selección bacteriano (Seleccionar B, tal como el gen de resistencia a ampicilina), un marcador de selección eucariota (Seleccionar, tal como gpt, neo, zeo, etcétera, ver texto, útil cuando se prevé la integración estable en el genoma de la célula huésped), y elementos opcionales adicionales tales como una región de empaquetamiento de bacteriófagos (para la producción de ADN monocatenario, tales como fl) y un marcador de amplificación opcional (tal como DHFR). Opcional, pero no se muestra en el esqueleto del vector, ni en los casetes de expresión otros elementos que controlan la expresión (tales como los BE, STAR, las LCR, las MAR y similares, ver más abajo) e IRES; estos se incluyen en las figuras posteriores. En (B) se representan los elementos necesarios para la expresión procariota. Solo se indican los elementos más relevantes para la invención, y se omitieron algunas otras características que son bien conocidas en la técnica que se requieren para la expresión (por ejemplo, secuencias de sitios de unión a ribosomas, regiones de Shine Dalgarno, secuencias de consenso de Kozak, etcétera).

Figura 2: Esquemas que representan diferentes puntos de partida para hacer bibliotecas de proteínas de unión. En el panel A, múltiples genes que codifican diferentes proteínas de unión se clonan en uno y el mismo vector de expresión que porta un marcador de selección. En el panel B, los genes que codifican la proteína de unión se clonan en tres

vectores de expresión diferentes, cada uno diferente en su marcador de selección (los ejemplos de estos se ilustran en el texto).

Figura 3: Ruta a bibliotecas de 3 SPCBP diferentes con relaciones de expresión diferentes basadas en integración aleatoria y tamizaje del sobrenadante de líneas celulares clonales mediante unión a antígeno (se indican con X en la gradilla de la placa ELISA las líneas celulares que expresan las 3 proteínas de unión diferentes por encima de un determinado criterio de selección, por ejemplo señal superior a 3x de la señal de fondo del ensayo). Las mezclas se preparan transfecando las proteínas de unión que codifican los genes que codifican las proteínas de unión de interés (el número aquí es 3), seguido por la clonación de líneas celulares, seleccionando líneas celulares productoras de forma estable y eventualmente tamizando las mezclas de anticuerpos resultantes para una bioactividad óptima.

Figura 4. Casetes de expresión para genes de SPCBP en la misma célula huésped. (A) El casete individual de base, representado por una proteína de unión; (B) Este casete contiene dos genes BP clonados en tándem, pero su expresión se regula individualmente, a través de dos promotores diferentes, P1 y P2. (C) Los dos genes BP se clonan en direcciones transcripcionalmente opuestas y en este ejemplo separados por un elemento que influye en la frecuencia de expresión/estabilidad/integración (se dan más ejemplos en el texto). (D) Igual que B, pero ahora se incluyen elementos E adicionales en el extremo 3' de cada una de las dos unidades transcripcionales. (E) El casete contiene tres genes BP clonados en tándem, cada uno con su propio promotor, líder, señal de poliadenilación y terminador. (F) Para los casos en que dos proteínas de unión deben estar presentes en la mezcla en cantidades aproximadamente similares, se inserta un IRES entre dos genes BP; en este casete, la expresión de un tercer gen BP se regula independientemente a través de un promotor diferente. (G y H) Casetes de expresión para mediar la expresión de dos proteínas de unión, en las que el gen de la proteína de unión se une a través de un elemento IRES a un marcador de selección (que después se selecciona en lugar de usar el marcador basado en el vector del esqueleto) sin (G) o con elementos adicionales en una casete para influenciar la expresión (H).

Figura 5. Expresión dependiente de los genes de SPCBP. BP-1 es una primera SPCBP, que está bajo el control de un promotor (P). La secuencia IRES enlaza la expresión de la cadena pesada con la de un transactivador; esto activa un promotor receptivo que induce la expresión de una segunda SPCBP, BP-2 (ver el texto para los detalles).

Figura 6. Método secuencial (introducción de colecciones de 5 genes de BP en las células del huésped; para cada conjunto de 5, se selecciona para un marcador de selección diferente. Para detalles de simplicidad, solo se muestran los genes de SPCBP y la caja de marcador de selección en los plásmidos. Ver texto para más detalles.

Figura 7. Plásmidos para la expresión de múltiples SPCBP en células de mamíferos. (A) pBRV; (B), pRRV, (C) pABExpress40; se indican los sitios de clonación para la inserción direccional de anticuerpos de dominio y anticalinas (ver el texto para más detalles).

Figura 8. El plásmido pAn02x33x04 que dirige la expresión y la secreción de tres fragmentos diferentes de anticuerpo de camélido.

Descripción detallada

1. Antecedentes

1.1 Anticuerpos

En la lucha contra la infección, el sistema inmunológico crea una respuesta celular y humoral que puede combatir específicamente al agente infeccioso. La respuesta inmune humoral se basa en inmunoglobulinas, o anticuerpos, que contactan a los antígenos y median ciertas funciones efectoras para eliminar la infección ((Roit, I. M. y otros (1985)) y todas las referencias en la presente descripción). En el sistema inmunitario los anticuerpos son generados por los linfocitos B. Los anticuerpos consisten en cadenas pesadas y ligeras que se ensamblan mediante apareamiento entre dominios y enlaces de disulfuro intercatenarios para formar moléculas multivalentes. Existen varios isotipos de anticuerpos naturales, que incluyen IgG (con en humanos 4 subclases, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgD, IgA e IgE. Una molécula de IgG contiene dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), ambas con unas regiones variable (V) y constante (C). Un anticuerpo IgG típico comprende dos regiones variables de la cadena pesada (H) (abreviado en la presente descripción como VH), y dos regiones variables de la cadena ligera (L) (abreviado en la presente descripción como VL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que más se conservan, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de la región marco y los CDR se definió con precisión (ver, Kabat, E. A., y otros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación NIH núm. 91-3242, y (Chothia, C. y otros (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917), que se incorporan en la presente descripción como referencia).

En la generación de la respuesta inmune primaria, el apareamiento de las secuencias de la región variable pesada y ligera de los anticuerpos es un proceso aleatorio. Los genes de la región variable se ensamblan por primera vez recombinando los elementos genéticos V, (D) y J elegidos aleatoriamente, representados en el genoma como un

conjunto de genes diversos. Las regiones variables pesadas y ligeras recombinadas se empalman después en sus respectivos genes de región constante y las cadenas se expresan, ensamblan y secretan como inmunoglobulina. En esta biblioteca combinatoria, en principio, cada cadena pesada puede aparearse con cada cadena ligera, para crear un amplio repertorio de diferentes especificidades de antígeno, con diversidad derivada del proceso de reordenamiento (que además introduce una mayor diversidad en algunas de las uniones de segmento) y del conjunto combinatorio de las regiones variables de la cadena pesada y ligera. En principio, las células B producen solo una especificidad de anticuerpo, codificada por una secuencia de cadena pesada del anticuerpo y una ligera del anticuerpo. El sistema inmune selecciona a través de un eficiente proceso de selección de antígenos aquellos anticuerpos que pueden unirse a un antígeno dado, en particular cuando el antígeno es extraño y parte de un patógeno.

En las inmunoglobulinas naturales, la cadena ligera que consiste de dos dominios se aparean con la cadena pesada, que consiste de al menos 4 dominios y una región bisagra: ocurren interacciones no covalentes entre VH y VL, y entre CH1 y CL; entre este último, un puente disulfuro proporciona un enlace covalente entre cadenas pesadas y ligeras. Además, las cadenas pesadas se encuentran apareadas entre sí, es decir en el formato IgG, y otras veces se asocian además con elementos adicionales tales como cadenas J (es decir, en el formato IgM). Ocurre una fuerte interacción no covalente entre los dominios CL y CH1, una interacción frecuentemente más débil está presente entre VL y VH. Las cadenas pesadas se aparean mediante interacciones en la región bisagra (frecuentemente asociadas covalentemente a través de uno o más puentes disulfuro) y entre los dominios CH2 y CH3.

Dentro de una célula B, típicamente y normalmente solo se expresa una cadena ligera y una pesada, pero en los pocos casos en que se expresan otras cadenas ligeras o pesadas (tales como en dos células B fusionadas), mal apareamiento entre las cadenas ocurrirá y la unión del antígeno se pierde en esta fracción de la preparación del anticuerpo. Por ejemplo, en el pasado, la expresión de múltiples dominios variables de anticuerpos, como en cuadromas o células transfectadas con múltiples genes de cadena pesada y/o ligera, típicamente produce una gran fracción de apareamiento de regiones variables que no son funcionales.

1.2 MoAb terapéuticos

La ingeniería de anticuerpos más avanzada permite la generación de anticuerpos 'hechos a medida' en términos de especificidad, afinidad y mecanismos efectores mediados por la región constante. El fuerte crecimiento de las ventas del creciente número de MoAb aprobados es testimonio de su éxito. En el año 2000, las ventas combinadas de anticuerpos humanos o humanizados superaron los \$ 2 mil millones y se espera que superen los \$ 6 mil millones para el 2005. Con 13 MoAb registrados para el tratamiento de una variedad de enfermedades que incluyen cáncer, enfermedad autoinmune, rechazo de trasplante y profilaxis antiviral, se estimaron 200 productos de anticuerpos en varias fases de pruebas clínicas y aproximadamente 470 anticuerpos adicionales en desarrollo preclínico, los MoAb además fueron en 2002 la categoría más importante de nuevos medicamentos. Por ejemplo, una serie de anticuerpos monoespecíficos se han aprobado como terapéuticos humanos. Estos incluyen Orthoclone OKT3, que se dirige al antígeno CD3; ReoPro, que se dirige a GP IIb IIIa; Rituxan, que se dirige a CD20; Zenapax y Simulect, que se dirigen a los receptores de la interleucina-2; Herceptin, que se dirige al receptor HER2; Remicade, que se dirige al factor de necrosis tumoral; Synagis, que se dirige a la proteína F del virus respiratorio sincitial; Mylotarg, que se dirige a CD33; y Campath, que se dirige a CD52 (ver, por ejemplo, Carter (2001) Nature Reviews 1: 118-129; Ezzell (2001) Scientific American Oct. 2001, páginas 36-41; Garber (2001) Nat. Biotechnol. 19: 184-185).

La noción de que las generaciones actuales de los MoAb humanos recombinantes requieren más optimización para lograr efectos clínicos mejorados ha estimulado el desarrollo de conjugados de anticuerpos: anticuerpos enlazados a fármacos, toxinas o radionúclidos que explotan la especificidad del anticuerpo para suministrar un compuesto altamente tóxico a, por ejemplo, células tumorales. A pesar de su potencia mejorada, los anticuerpos conjugados son más tóxicos que los anticuerpos 'desnudos' y requieren procesos de fabricación más complejos, lo que restringe su aplicabilidad y aumenta sus costos. Además, los anticuerpos conjugados no abordan la falta de eficacia de los MoAb cuando destruyen una célula objetivo no es el mecanismo de acción deseado.

Una razón importante para la falta de eficacia de los MoAb desnudos es que solo se unen a un único epítipo en un objetivo (virus, célula cancerosa, toxina, etcétera). En contraste, en las respuestas de anticuerpos naturales, se generan una multitud de anticuerpos (anticuerpos policlonales) que se unen a muchos epítopos en un objetivo, lo que resulta en una eliminación o neutralización de objetivos más eficiente. Aunque los anticuerpos policlonales pueden considerarse fármacos más eficaces que los MoAb, su uso generalizado se ve obstaculizado por muchos inconvenientes.

En el campo del anticuerpo terapéutico, existe la necesidad de nuevos enfoques que combinen la tecnología superior existente de los MoAb humanos 'desnudos' con los niveles más altos de eficacia clínica asociados con los anticuerpos policlonales. Para capturar la eficacia inherente a los anticuerpos policlonales, se han realizado algunos esfuerzos en el desarrollo de cócteles de los MoAb dirigidos a la misma entidad. A nivel de investigación, se han demostrado efectos aditivos o sinérgicos sobre la eficacia terapéutica los para las combinaciones de los MoAb que se produjeron por separado y posteriormente se mezclaron a nivel de proteína o se administraron de manera simultánea a modelos animales.

1.3 Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales aislados de sueros animales se han empleado en la clínica durante más de un siglo para tratar infecciones bacterianas y virales y aún se aplican para muchas indicaciones diferentes. Los anticuerpos policlonales consisten en una mezcla mal definida de anticuerpos purificados del suero de un animal o humano. El suero policlonal se enriquece de anticuerpos específicos mediante inmunización o infección anterior. Se prefieren los productos de origen humano sobre los de origen animal debido a la alta incidencia de reacciones adversas a los sueros de animales y a la protección más duradera conferida por los anticuerpos humanos.

Los anticuerpos policlonales tienen la ventaja de consistir en una multitud de los MoAb que se dirigen a diferentes epítomos, confiriendo de ese modo frecuentemente una actividad biológica más potente. Aunque se ha demostrado que son efectivos, su uso más amplio se ha limitado por una variedad de razones, que incluye la inmunogenicidad de proteínas derivadas de animales en pacientes humanos. Las preparaciones de anticuerpos policlonales adolecen de los siguientes inconvenientes: (1) Los anticuerpos policlonales son costosos y requieren uso intensivo de mano de obra para producirlos. (2) La cantidad de anticuerpos específicos en una preparación de anticuerpo policlonal usualmente representa solo una fracción diminuta (<1%) de la proteína de anticuerpo total, lo que resulta en la inyección de grandes cantidades de proteína no relevante en los pacientes. (3) Las preparaciones policlonales generadas a partir de donantes inmunes o animales inmunizados son difíciles para el control de calidad. (4) Las preparaciones policlonales generadas a partir de sueros mezclados de donantes inmunes o animales inmunizados presentan variaciones de lote a lote. (5) La especificidad y la afinidad de los anticuerpos específicos en la preparación no se definen. (6) La cantidad de antisuero disponible puede limitarse para algunas aplicaciones. (7) Debido a que los anticuerpos policlonales se derivan de mezclas de sueros, existe la posibilidad de transmisión de agentes infecciosos (virus, priones). Todavía, los anticuerpos policlonales tienen la ventaja de consistir en una multitud de MoAb que se dirigen a diferentes epítomos, confiriendo de ese modo frecuentemente una actividad biológica más potente. Aunque se ha demostrado que son efectivos, su uso más amplio se ha limitado por una variedad de razones, que incluye la inmunogenicidad de proteínas derivadas de animales en pacientes humanos. En algunos casos ha quedado claro que un anticuerpo policlonal de origen animal puede ser más efectivo que un MoAb: un anticuerpo policlonal de origen de conejo recientemente aprobado, Thymoglobulin®, resultó más eficaz que un MoAb humanizado, Simulent, en el tratamiento del trasplante rechazado.

1.4 Mezclas de proteínas

A partir de esta información, quedará claro que las mezclas de 3-5 MoAb, preparadas combinando anticuerpos a nivel de proteína, tienen efectos terapéuticos superiores en comparación con los MoAb. Sin embargo, la fabricación a gran escala de múltiples MoAb individuales que se mezclan para formar un producto único plantea problemas insuperables para el desarrollo farmacéutico relacionado con cuestiones regulatorias, el costo del desarrollo paralelo de múltiples MoAb y el diseño de instalaciones de fabricación actuales para biofarmacéuticos. Similarmente, los anticuerpos policlonales terapéuticos, aunque frecuentemente son más potentes que los MoAb, presentan importantes problemas de aislamiento, seguridad y desarrollo. Por lo tanto, los métodos para crear mezclas de proteínas de unión están abordando una necesidad crucial en la terapia.

Así, las mezclas de anticuerpos monoclonales funcionales se han hecho expresando y purificando las proteínas por separado, y después mezclándolos a nivel de proteína. Generalmente, existen varios otros problemas subyacentes a la producción de tales mezclas de proteínas. Un primer problema al depender de mezclas de proteínas de unión que se expresaron, produjeron y purificaron por separado y después se mezclaron, es la susceptibilidad diferencial de cada preparación a factores externos que modificarán la proteína de unión. Por ejemplo, frecuentemente se proporcionan epítomos y etiquetas de detección/purificación (tales como myc, etiquetas, o etiquetas ploy-HIS o fusiones a proteína A, dominio de proteína Z, proteína de unión a maltosa y GST) para la detección y purificación de la proteína de unión expresada. Como estos usualmente se localizan en los extremos terminales N o C de la proteína de unión, tienden a ser propensos a la escisión proteolítica. Si la etiqueta de una pero no la otra proteína de unión se ha degradado ampliamente, por ejemplo, debido a la extensa lisis de las células bacterianas durante la producción, las dos proteínas en la mezcla mostrarán más diferencias que su especificidad de unión. Otros ejemplos son modificaciones de proteínas independientes de secuencia o dependientes tales como glicosilación, oxidación, etcétera. La distribución de glicosilación de proteínas por las células eucariotas es susceptible a entre otros factores que están presentes en los medios de crecimiento de las células y por las condiciones de cultivo; incluso cuando se producen proteínas de unión tales como anticuerpos en las mismas células huésped, podrá esto no ser una garantía de que el patrón y el contenido de glicosilación serán idénticos. Para este fin, sería conveniente tener un sistema que pudiera eliminar las diferencias indeseables entre las proteínas de unión que deben usarse como mezclas.

Además existen problemas para probar grandes cantidades de mezclas de proteínas que se ensamblan *in vitro* mezclando muestras de los componentes individuales. Cada componente deberá prepararse por separado, purificarse y determinarse su cantidad con exactitud. Frecuentemente, la purificación de proteínas es un proceso largo y no fácil de usar para cientos de muestras. La determinación de la fracción activa de una preparación de proteínas consume mucho tiempo y no siempre es posible, y con el tiempo puede alterarse la actividad (que además frecuentemente depende de qué tan bien se purificó el componente de la proteína). Con este fin sería conveniente tener un método que proporcione mezclas de proteínas de unión que se expresen en diferentes relaciones y se expresen de tal manera que la determinación de la purificación y la concentración pueda hacerse con la misma muestra.

Existe un tercer problema al depender del tamizaje de las mezclas de proteínas purificadas para encontrar la combinación óptima para la actividad biológica y después producir una célula huésped que expresa los componentes de la proteína de unión de esa relación óptima. En primer lugar, habrá que seleccionar muchas líneas celulares para encontrar una que exprese la relación de la combinación efectiva, un problema que aumenta con el aumento del número de diferentes proteínas de unión en la mezcla. Segundo, en algunos casos, la coexpresión de una proteína de unión simultánea con otras proteínas de unión puede llevar a efectos negativos inesperados en la agregación de proteínas, en la viabilidad celular y en los niveles de producción.

2. Fabricación de mezclas de proteínas de unión

2.1 Bibliotecas de proteínas de unión expresadas en cantidades variables

Esta invención describe métodos para producir bibliotecas de células que expresan mezclas de las SPCBP. La invención proporciona un método que aborda al menos algunos de estos problemas citados que ocurren cuando se mezclan proteínas *in vitro*. El método minimiza las diferencias entre las proteínas de unión que se usan como mezcla, debido a la expresión de manera simultánea en la misma célula huésped. Simplifica la manipulación de las proteínas y evita la necesidad de purificar las proteínas por separado. Si las proteínas de unión se modifican postraduccionalmente durante estos procesos, pueden aparecer modificaciones y alteraciones independientes de la secuencia, pero es probable que aparezcan en todas las proteínas de unión a una frecuencia igual o similar. Por ejemplo, la glicosilación unida a N de dos proteínas de unión es más probable que sea similar, si no indistinguible, cuando estas proteínas se expresan en la misma célula huésped en comparación con la expresión en dos células huésped separadas. Esto hará que la caracterización e interpretación de la actividad biológica de la proteína sea más directa. Finalmente, el tamizaje directo de mezclas expresadas por una célula huésped eliminará aquellos casos en los que una proteína de unión es incompatible con la expresión de otras. Además, tiene una serie de ventajas adicionales que se detallan más abajo.

Se ha descrito la expresión de múltiples proteínas dentro de la misma célula huésped, por ejemplo para producir proteínas que consisten en múltiplos funcionales, que sin embargo es un enfoque muy diferente de lo que se presenta aquí. Las proteínas multiméricas consisten en dos o más cadenas polipeptídicas, posiblemente diferentes, en su forma biológica y/o biotecnológicamente activa. Los ejemplos incluyen anticuerpos (Wright y Morrison, 1997), proteínas morfogenéticas óseas (Groeneveld y Burger, 2000), receptores de hormonas nucleares (Aranda y Pascual, 2001), receptores de superficie celular heterodiméricos (por ejemplo, receptores de células T, (Chan y Mak, 1989)), integrinas (Hynes, 1999) y la familia de la hormona glicoproteica (gonadotropina coriónica, hormona luteinizante hipofisaria, hormona estimulante del folículo y hormona estimulante de la tiroides (Thotakura y Blithe, 1995)). En todos estos casos, los diferentes polipéptidos que se expresaron se ensamblaron en la célula a una proteína funcional. La invención actual es diferente en cuanto a que se expresan múltiples proteínas de unión, y que éstas no se asocian y, así, pueden recuperarse como proteínas separadas. Las proteínas de unión que llevan dos cadenas que forman un sitio de unión se excluyen así de esta invención. Además existe una gran diferencia en el enfoque y en el resultado final. La producción de una proteína multimérica en un sistema heterólogo es técnicamente difícil debido a las dificultades para lograr la producción de los polipéptidos monoméricos en proporciones estequiométricamente equilibradas (Kaufman, 2000). La expresión desequilibrada de los monómeros es un desperdicio de los costosos recursos usados en el cultivo celular y puede tener efectos perjudiciales en la célula (que incluyen el secuestro de factores celulares necesarios para la secreción de proteínas recombinantes y la inducción de respuestas de estrés que resultan en velocidades reducidas de crecimiento y la traducción de proteínas, o incluso en la apoptosis (muerte celular programada)). Tales efectos perjudiciales conducen a pérdidas en productividad y rendimiento y a costos generales más altos. Muchos sistemas de expresión descritos para tales proteínas multiméricas se han centrado, por lo tanto, en la obtención de una expresión equilibrada y proporcional de dos o más monómeros polipeptídicos que son constituyentes de una proteína multimérica. En esta invención, se crean bibliotecas de células que expresan cada una las diferentes proteínas de unión a propósito en una relación diferente, de manera que se produce una biblioteca de células que expresan un subconjunto de al menos dos proteínas de unión y en la que la relación entre los niveles de expresión de las dos proteínas de unión es altamente variable. Eventualmente, se determina la relación que media la bioactividad adecuada y la línea celular que produce esta relación se usa para producir la mezcla de dos proteínas de unión a esta relación.

2.2. Ejemplos de las SPCBP y métodos para identificar estas

El desarrollo de proteínas de unión solubles que reconocen moléculas objetivo dadas es importante en las ciencias de la vida y la biotecnología. Durante el último siglo, este campo se dominó por los anticuerpos, que se generaron tradicionalmente a través de la inmunización de animales, pero además se hicieron disponibles por medio de métodos de ingeniería de proteínas. Las proteínas de unión usadas en esta invención se basan en un polipéptido simple. Pueden generarse a partir de ciertos animales (ver más abajo) o como proteínas de unión artificial *in vitro*, mediante la aplicación de técnicas de biotecnología combinatoria con andamios o pliegues de proteínas. La aplicabilidad de un andamio o pliegue radica en la capacidad de introducir diversidad permisiva, sin destruir la estructura terciaria del pliegue proteico, y la capacidad de recuperar moléculas de unión de un repertorio diverso. Usualmente, los andamios existentes se reclutan para aleatorizar algunos residuos de aminoácidos expuestos después del análisis de la estructura del cristal. La recuperación de las variantes de unión de este andamio puede lograrse mediante la presentación de fagos y la selección de afinidad en el ligando elegido. Las propiedades de un andamio se determinan en gran parte por la

naturaleza de la aplicación y las propiedades del andamio. Muchos andamios descritos hasta la fecha son pequeñas proteínas globulares, y frecuentemente comprenden un dominio único (así, son más fáciles de producir, purificar y modificar genéticamente en reactivos multivalentes o multispecíficos).

- 5 En muchos casos, los andamios cumplen una o la totalidad de la siguiente lista de criterios, convirtiéndolos en proteínas de unión alternativas atractivas para los anticuerpos. (1) el andamio debe expresarse como una proteína soluble en huéspedes compatibles con la biblioteca (*E. coli* y otras bacterias, células de levadura, células infectadas con Baculovirus, células eucariotas), y que son susceptibles a tamizaje o presentación para venta grande y tecnología de selección (como fagos, ribosomas, ARNm, pantalla celular); (2) la estructura terciaria del andamio no debe perturbarse por la introducción de la diversidad; (3) el andamio además debe ser estable; (4) el andamio debería tener bucles permisivos, parches y/o superficies para introducir diversidad en una serie de sitios elegidos, en donde la naturaleza de la superficie de unión requerida depende de la aplicación; (5) debe tener una gran superficie de unión accesible que tenga el potencial de diversificarse y volverse a elegir, por ejemplo para propósitos de maduración de afinidad; (6) el andamio debe obtenerse mediante ingeniería para fabricar moléculas monoespecíficas/biespecíficas/triespecíficas o en general multiespecíficas; (7) debería permitir la fusión en el extremo N y/o C; y (8) para uso terapéutico en humanos, debe ser preferentemente no inmunogénico y humano, y (9) debe ser resistente a la proteólisis.

2.2.1 Anticuerpos de dominio único

- 20 El primer andamio que debe considerarse es uno que se usa en las proteínas naturales de unión, los anticuerpos. Los dos dominios del anticuerpo, que forman el fragmento Fv, son típicamente la unidad más pequeña de un anticuerpo que retiene la actividad de unión sin pérdida significativa en la afinidad y especificidad del antígeno. Pero un dominio en sí mismo además puede retener la actividad de unión al antígeno, y existir como una única proteína de unión basada en el pliegue de inmunoglobulina. Se han descrito fragmentos de anticuerpos de dominio único basados en un único dominio VH (Ward, E. S. y otros (1989) *Nature* 341: 544-546), y además se han mostrado como moléculas naturales en camélidos (Hamers-Casterman, C. y otros (1993) *Nature* 363: 446-448). Además, los dominios VH únicos se han seleccionado de diversas bibliotecas exhibidas de fagos de humanos modificados (Davies, J. y otros (1995) *Biotechnology (N Y)* 13: 475-479) o dominios VH de ratón (Reiter, Y. y otros (1999) *J Mol Biol* 290: 685-698). Más recientemente, los dominios únicos VH y VL humanos se han modificado genéticamente para unirse a antígenos proteicos (van den Beucken, T. y otros (2001) *J Mol Biol* 310: 591-601; Holt, L. J. y otros (2003) *Trends Biotechnol* 21: 484-490).

2.2.2. Anticalinas

- 35 Un ejemplo de un tipo alternativo de proteínas de unión a ligando son las anticalinas, construidas sobre la base de lipocalinas como un andamio. El elemento central de esta arquitectura de la proteína es una estructura de barril beta de ocho cadenas antiparalelas, que soporta cuatro bucles en su extremo abierto. Estos bucles forman el sitio de unión natural de las lipocalinas y se han reformado *in vitro* mediante un amplio reemplazo de aminoácidos, creando así nuevas especificidades de unión (Skerra, A. (2001) *J Biotechnol* 74: 257-275.). Por ejemplo, la proteína de unión a bilina (BBP), una lipocalina de *Pieris brassicae*, se empleó como un sistema modelo para la preparación de una biblioteca aleatoria con 16 residuos mutagenizados selectivamente. Usando técnicas de presentación de fagémidos bacterianos y tamizaje de colonias, se seleccionaron varias variantes de lipocalina de esta biblioteca, que exhibían actividad de unión para compuestos como fluoresceína o digoxigenina. Se describe que las anticalinas poseen alta afinidad y especificidad por sus ligandos prescritos, así como por su cinética de unión rápida, de manera que sus propiedades funcionales son similares a las de los anticuerpos. Sin embargo, las anticalinas exhiben varias ventajas, que incluyen un tamaño más pequeño, la composición de una cadena polipeptídica simple y un conjunto simple de cuatro bucles hipervariables que pueden manipularse fácilmente a nivel genético.

2.2.3. Aficuerpos

- 50 La ingeniería de proteínas además se ha usado para generar proteínas de unión específicas del producto hechas a medida que se usan como ligandos de afinidad en el proceso de recuperación del producto (Jonasson, P. y otros (2002) *Biotechnol Appl Biochem* 35: 91-105). Particularmente útiles para este proceso son proteínas de unión modificadas genéticamente tales como los aficuerpos, proteínas basadas en el andamio de tres hélices del dominio Z derivado de la proteína A estafilocócica. Las bibliotecas de aficuerpo se crean por variegación combinatoria de residuos dentro del dominio Z del conjunto de tres hélices derivado de la proteína A estafilocócica, y los aficuerpos que se unen al objetivo de los interesados seleccionados usando la presentación de fagos o tecnologías similares. Se han identificado aficuerpos para una amplia gama de otras proteínas y se han usado para la cromatografía de afinidad de proteínas objetivo tales como IgA humana, factor VIII, ADN polimerasa Klenow y la proteasa viral 3C (Graslund, T. y otros (2002) *J Biotechnol* 96: 93-102) (Nord, K. y otros (2001) *Eur J Biochem* 268: 4269-4277).

2.2.4. Aislamiento de las SPCBP reactivas al antígeno

- 65 SPCBP puede aislarse por ejemplo usando tecnología de biblioteca de anticuerpos basada en la presentación, en donde las proteínas de unión a antígeno se seleccionan exponiendo una biblioteca de proteínas que se presentan en la superficie del fago, levadura u otra célula huésped, al antígeno de interés y aislando esas variantes que se unen a la

preparación del antígeno. Una biblioteca de presentación es una colección de entidades; cada entidad incluye un componente polipeptídico accesible y un componente recuperable que codifica o identifica el componente peptídico. Se han mostrado muchas proteínas en la superficie de entidades que portan el material genético que codifica la proteína dentro de la entidad, tal como los bacteriófagos. Este formato se denomina "presentación de fagos." La presentación de fagos se describe por ejemplo, en Ladner y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,223, 409; Smith (1985) Science 228: 1315-1317; documento de patente WO 00/70023; documento de patente WO 92/18619; documento de patente WO 91/17271; documento de patente WO 92/20791; documento de patente WO 92/15679; documento de patente WO 93/01288; documento de patente WO 92/01047; documento de patente WO 92/09690; documento de patente WO 90/02809; documento de patente WO 00/70023; Fuchs y otros (1991) *BiolTechnology* 9: 1370-1372; Hay y otros (1992) *Hum Antibody Hybridomas* 3: 81-85; Huse y otros (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths y otros (1993) *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins y otros (1992) *J Mol Biol* 226: 889-896; Clackson y otros (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram y otros (1992) *PNAS* 89: 3576-3580; Garrard y otros (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Rebar y otros (1996) *Methods Enzymol.* 267: 129-49; Hoogenboom y otros (1991) *Nuc Acid Res* 19: 4133-4137; y Barbas y otros (1991) *PNAS* 88: 7978-7982. Se han desarrollado sistemas de presentación de fagos para fago filamentosos (fago fl, fd y M13) así como para otros bacteriófagos (por ejemplo, bacteriófago T7 y fagos lambdoides; ver, por ejemplo, Santini (1998) *J. Mol. Biol.* 282: 125-135; Rosenberg y otros (1996) *Innovations* 6: 1-6; Houshmand y otros (1999) *Anal Biochem* 268: 363-370). Los sistemas de presentación de fagos filamentosos típicamente usan fusiones a una proteína de recubrimiento menor, tal como proteína de gen III, y proteína de gen VIII, una proteína de recubrimiento principal, pero además pueden usarse fusiones a otras proteínas de recubrimiento tales como proteína de gen VI, proteína de gen VII, proteína de gen IX, o sus dominios (ver, por ejemplo, documento de patente, WO 00/71694).

Otros formatos de presentación utilizan fusiones de péptido con ácido nucleico. El ARN y el polipéptido codificado por el ARN pueden asociarse físicamente estabilizando los ribosomas que están traduciendo el ARN y tienen el polipéptido naciente unido. Las fusiones de polipéptido ácido nucleico pueden generarse mediante la traducción *in vitro* de ARNm que incluye un grupo de puromicina unido covalentemente, por ejemplo, como se describe en Roberts y Szostak (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12297-12302, y la Patente de Estados Unidos núm. 6,207, 446. El ARNm después puede transcribirse de manera inversa en ADN y reticularse al polipéptido. Típicamente, se usan altas concentraciones de Mg²⁺ divalentes y baja temperatura. Ver, por ejemplo, Mattheakis y otros (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9022 y Hanes y otros (2000) *Nat Biotechnol.* 18: 1287-92; Hanes y otros (2000) *Methods Enzymol.* 328: 404-30. y Schaffitzel y otros (1999) *J Immunol Methods.* 231 (1-2): 119-35.

En otro formato de presentación, la biblioteca es una biblioteca de presentación en las células. Las proteínas se presentan en la superficie de una célula, por ejemplo, una célula eucariótica o procarionta. Las células procariontas ilustrativas incluyen células de *E. coli*, células *B. subtilis*, esporas, células eucariotas ilustrativas incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, células de insecto y células de mamífero. La presentación en la superficie de levadura se describe, por ejemplo, en Boder y Wittrup (1997) *Nat. Biotechnol.* 15: 553-557. La presentación en levadura es particularmente adecuada para aislar las SPCBP. En una modalidad, las secuencias de ácidos nucleicos variegadas que codifican variantes de andamios se clonan en un vector para presentación en levaduras. La clonación une la secuencia variegada con un dominio (o completa) proteína de superficie celular de levadura, por ejemplo, preferentemente Aga2, Aga1, Flol o Gas1. Un dominio de estas proteínas puede anclar el polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico variegado por un dominio transmembrana (por ejemplo, Flol) o mediante enlace covalente a la bicapa fosfolipídica (por ejemplo, Gas1).

Aún otro formato de presentación es una presentación no biológica en la que el componente polipeptídico se une a una etiqueta de ácido no nucleico que identifica el polipéptido. Por ejemplo, la etiqueta puede ser una etiqueta química unida a una perla que presenta el polipéptido o una etiqueta de radiofrecuencia (ver, por ejemplo, la Patente de Estados núm. 5, 874, 214).

Los métodos para la presentación de las SPCBP y la construcción de bibliotecas en una variedad de formatos se describen bien en la literatura y son conocidos por los expertos en la técnica. Alternativamente para presentar, a veces es factible el tamizaje directo de bibliotecas variantes de SPCBP, por ejemplo, cuando la frecuencia de los clones reactivos con antígeno es relativamente alta (como en bibliotecas de genes VHH de camello, dromedario o llama inmune), por alto rendimiento y métodos automatizados de tamizaje.

Los anticuerpos de dominio único se aíslan preferentemente de los repertorios de presentación *in vitro* hechos a partir de un repertorio de un dominio único de ciertos fragmentos de la región variable humana, tales como los repertorios VH humano o VL humano. En otra modalidad, los anticuerpos de dominio único se aíslan de repertorios de VHH no inmunizados, inmunizados o sintéticos, basados en dominios de cadena pesada de anticuerpo naturalmente carentes de cadenas ligeras (por ejemplo, anticuerpos de camello, llama o algunos de tiburón).

Las tecnologías de selección y tamizaje citadas de la SPCBP se establecen bien en el campo. Los polipéptidos específicos al antígeno pueden identificarse a partir de bibliotecas de presentación mediante tamizaje directo de la biblioteca, o pueden seleccionarse primero en el antígeno para aumentar el porcentaje de clones reactivos con antígeno. El proceso de selección se lleva a cabo mediante una variedad de técnicas bien conocidas en la técnica, que incluyen el uso del antígeno unido a una superficie (por ejemplo, una superficie de plástico, como en los pasos de selección), o mediante el uso del antígeno unido a una partícula de fase sólida que puede aislarse sobre la base de las

propiedades de las perlas (por ejemplo, perlas de látex coloreadas o partículas magnéticas), o mediante clasificación celular, especialmente la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Como será evidente para un experto en la técnica, el reactivo de afinidad específico al antígeno se une directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un anticuerpo secundario) al tinte, sustrato o partícula. Los procedimientos de selección se han descrito ampliamente en la literatura (ver, por ejemplo, Hoogenboom, (1997) Trends Biotechnol. 15: 62-70). La unión de las SPCBP a sus antígenos respectivos se lleva a cabo usando técnicas de ensayo basadas en anticuerpos, tales como técnicas de ELISA, inmunoelectrotransferencia, inmunohistoquímica, análisis de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR), cromatografía de afinidad y similares, de conformidad con los métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica (ver, por ejemplo Sambrook y otros, 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2da Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma para el aislamiento de anticuerpos "monoclonales" (especialmente cuando se requieren anticuerpos humanos), que se abarcan por la presente invención.

2.2. 5 Ensayos a ciegas para las SPCBP y mezclas de las SPCBP

A continuación se describen posibles modalidades de ensayos ilustrativos para los ensayos de unión:

ELISA. Los polipéptidos codificados por una biblioteca de presentación además pueden examinarse para una propiedad de unión usando un ensayo de ELISA. Por ejemplo, cada polipéptido se pone en contacto con una placa de microtitulación cuya superficie inferior se ha recubierto con el objetivo, por ejemplo, una cantidad limitante del objetivo. La placa se lava con tampón para eliminar los polipéptidos que no se unen específicamente. Después, la cantidad de la proteína unida a la placa se determina mediante el sondeo de la placa con un anticuerpo que puede reconocer el polipéptido, por ejemplo, una etiqueta o porción constante del polipéptido. El anticuerpo se enlaza a una enzima tal como fosfatasa alcalina, que produce un producto colorimétrico cuando se proporcionan los sustratos apropiados. El polipéptido puede purificarse a partir de células o ensayarse en un formato de biblioteca de presentación, por ejemplo, como una fusión a una capa de bacteriófago filamentoso. En otra versión del ensayo ELISA, cada polipéptido de una biblioteca se usa para recubrir un pocillo diferente de una placa de microtitulación. El ELISA procede después usando una molécula objetivo constante para pesquisar cada pocillo.

Resonancia de plasmón superficial (SPR). La interacción de unión de una molécula aislada de la biblioteca de cadenas de diversidad con un objetivo puede analizarse usando SPR. Por ejemplo, después de secuenciar un miembro de la biblioteca de presentación presente en una muestra, y opcionalmente verificado, por ejemplo, mediante ELISA, el polipéptido presentado puede producirse en cantidad y ensayarse para unir al objetivo usando SPR. La SPR o Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) detectan las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes. Los cambios de la masa en la superficie de unión (indicativos de un evento de unión) de la matriz de BIA dan lugar a alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial). Los cambios en la refractividad generan una señal detectable, que se mide como una indicación de las reacciones en tiempo real entre las moléculas biológicas. Los métodos para usar SPR se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos núm. 5,641, 640; Raether (1988) Surface Plasmon Springer Verlag; Sjolander y Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345; Szabo y otros (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699- 705 y recursos en línea proporcionados por BIAcore International AB (Uppsala, Suecia). La información de la SPR puede usarse para proporcionar una medida precisa y cuantitativa de la constante de disociación de equilibrio (Kd), y parámetros cinéticos, que incluyen kon y koff, para la unión de una biomolécula a un objetivo. Tales datos pueden usarse para comparar diferentes biomoléculas. Por ejemplo, proteínas codificadas por ácidos nucleicos seleccionados a partir de una biblioteca de cadenas de diversidad pueden compararse para identificar individuos que tienen alta afinidad por el objetivo o que tienen koff lenta. Esta información puede usarse además para desarrollar la relación estructura actividad (SAR). Por ejemplo, los parámetros de unión cinética y de equilibrio de las versiones maduras de una proteína original pueden compararse con los parámetros de la proteína original. Pueden identificarse aminoácidos variantes en posiciones dadas que se correlacionan con parámetros de unión particulares, por ejemplo, alta afinidad y koff lenta. Esta información puede combinarse con el modelado estructural (por ejemplo, usando el modelado de homología, la minimización de energía o la determinación de la estructura por cristalografía o NMR). Como resultado, puede formularse y usarse una comprensión de la interacción física entre la proteína y su objetivo para guiar otros procesos de diseño.

Ensayos de unión homogénea. La interacción de unión del polipéptido candidato con un objetivo puede analizarse usando un ensayo homogéneo, es decir, después de que se añaden todos los componentes del ensayo, no se requieren manipulaciones adicionales de fluidos. Por ejemplo, la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) puede usarse como un ensayo homogéneo (ver, por ejemplo, Lakowicz y otros, Patente de Estados Unidos núm. 5,631, 169; Stavrianopoulos, y otros, Patente de Estados Unidos núm. 4,868, 103). Otro ejemplo de un ensayo homogéneo es el Tamizaje Alfa (Packard Bioscience, Meriden CT). El Tamizaje Alfa usa dos perlas marcadas. Una perla genera oxígeno singlete cuando se excita con un láser. La otra perla genera una señal de luz cuando el oxígeno singlete se difunde desde la primera perla y choca con ella. La señal solo se genera cuando las dos perlas están cerca. Una perla puede unirse al miembro de la biblioteca de presentación, y la otra al objetivo. Las señales se miden para determinar el alcance de la unión. Los ensayos homogéneos pueden realizarse mientras el polipéptido candidato se une al vehículo de la biblioteca de presentación, por ejemplo, un bacteriófago. Otros métodos para determinar las afinidades de unión además son adecuados, tales como el uso de los sistemas basados en Kinexa y Luminex.

Tamizaje automatizado. Los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción además son adecuados para el tamizaje automatizado de bibliotecas de diversidad para encontrar clones con reactividad al antígeno. Por ejemplo, una biblioteca de presentación de la SPCBP puede tamizarse para los miembros que se unen a una molécula objetivo. La biblioteca puede seleccionarse directamente o primero seleccionarse en el antígeno una o varias veces. Los atadores de una primera ronda de tamizaje pueden amplificarse y volver a tamizarse, una o más veces. Los atadores de la segunda ronda o posteriores se aíslan individualmente, por ejemplo, en una placa de múltiples pocillos. Cada atador individual puede ensayarse después para unirse a la molécula objetivo, por ejemplo, usando ELISA, un ensayo de unión homogéneo o una matriz de proteínas. Estos ensayos de clones individuales pueden automatizarse mediante robótica. Las secuencias de los clones seleccionados pueden determinarse usando robots y cebadores de oligonucleótidos que permiten leer las secuencias de la región variable de los clones seleccionados. Los resultados del ensayo y las secuencias pueden almacenarse en un sistema informático y evaluarse a vista o mediante el uso de software, por ejemplo, para identificar clones que cumplen parámetros particulares (por ejemplo, para la afinidad y/o especificidad de unión, y para la homología de secuencia).

2.3 La producción de bibliotecas de mezcla de las SPCBP

Las SPCBP son altamente adecuadas para preparar composiciones farmacéuticas de proteínas de unión que se unen a múltiples objetivos mediante coexpresión en la misma célula huésped.

2.3.1 Sistemas de expresión básicos para la producción de bibliotecas

El vector de expresión o vectores que comprenden los genes de SPCBP de interés contienen secuencias reguladoras, que incluyen, por ejemplo, un promotor, unido operativamente al (a los) ácido (s) nucleico (s) de interés. Gran número de vectores y promotores adecuados se conocen por aquellos con experiencia en la técnica y están comercialmente disponibles para generar los constructos recombinantes de la presente invención. Se describen vectores apropiados de clonación y expresión para su uso con huéspedes procariontes y eucariotes por Sambrook, y otros, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989), cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo.

Para la expresión de alto nivel en huéspedes eucariotes, por ejemplo, los elementos reguladores ilustrativos potenciadores/promotores incluyen elementos derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador potenciador CMV/promotor AdMLP o un elemento regulador potenciador SV40/promotor AdMLP. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos núm. 5, 385, 839. Los promotores eucariotes incluyen CMV temprano inmediato, timidina quinasa HSV, ubiquitina, factor de alargamiento-10, SV40 temprano y tardío, los LTR de retrovirus, metalotioneína-I de ratón, y diversos promotores específicos de tejido conocidos en la técnica. Los promotores adecuados para obtener expresión en células eucariotes son el promotor CAW, un promotor EFI-alfa de mamífero, un promotor de ubiquitina de mamífero o un promotor SV40. Pueden usarse métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica para construir vectores que contienen un polinucleótido de la invención y señales de control reguladoras transcripcionales/traduccionales y otras apropiadas. Los vectores de expresión eucariotes incluyen los siguientes ejemplos: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXTI, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, y pSVL (Pharmacia). Las regiones promotoras pueden seleccionarse de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7.

Ciertos de los vectores de expresión proporcionados en esta invención contienen sitios internos de entrada de ribosomas (IRES). IRES permiten a los ribosomas eucariotes entrar y explorar un ARNm en una posición que no sea la estructura de 5'm7 G-cap. Si se coloca internamente, por ejemplo, 3' de una primera región de codificación (o cistron), un IRES permitirá la traducción de una segunda región de codificación dentro de la misma transcripción. La segunda región de codificación se identifica por el primer ATG encontrado después del IRES. Los elementos ilustrativos de IRES incluyen IRES virales tales como IRES de picornavirus y el IRES de cardiavirus (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos núm. 4,937, 190) y elementos de IRES no virales encontrados en los 5'UTR (por ejemplo, aquellos elementos de transcritos que codifican la proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina (BiP) (Macejak, D. G., y otros *Nature*, 35390-4,1991); *Drosophila* Antennapedia (Oh, S. K., y otros, *Genes Dev*, 6: 1643-53, 1992) y Ultrabithorax (Ye, X., y otros, *Mol. Cell Biol.*, 17: 1714- 21,1997); factor de crecimiento de fibroblastos 2 (Vagner, S., y otros, *Mol. Cell Biol.*, 15: 35- 44,1995); factor de iniciación eIF4G (Gan, y otros, *JBiol. Chem.*, 273: 5006-12, 1998); proto oncogén c-myc (Nanbru, y otros, *J. Biol. Chem.*, 272: 32061-6, 1995; Stoneley, M., *Oncogene*, 16: 423-8,1998); y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Stein, I., y otros, *Mol. Cell Biol.*, 18: 3112-9, 1998).

Otros elementos reguladores se relacionan con el control de la cromatina. Estos incluyen elementos con varios nombres y aislados en varios procedimientos que proporcionan estabilidad a largo plazo y expresión del transgén (es) específica o no específica (s) de tejido. En general, las secuencias de control de la cromatina aíslan la transcripción de genes ubicados dentro de su intervalo de acción, pero que no perturban la expresión génica, ya sea negativa o positivamente. Por ejemplo, modulan (por ejemplo, protegen) los efectos reguladores de la cromatina y las secuencias cercanas en un entorno nuclear, típicamente un entorno cromosómico. Así, los aisladores pueden permitir un control regulador sostenido y/o adecuado de secuencias integradas en regiones heterólogas de un cromosoma.

Ejemplos de elementos reguladores son los siguientes. Los elementos límites (BE) o elementos aislantes definen los límites en la cromatina y tienen un papel en la definición de los dominios transcripcionales in vivo. Carecen de actividad promotora/potenciadora intrínseca, pero más bien se cree que protegen los genes de la influencia transcripcional de los elementos reguladores en la cromatina circundante. Se ha demostrado que las S/MAR o las regiones de fijación al andamio/matriz interactúan con los potenciadores para aumentar la accesibilidad a la cromatina local y pueden mejorar la expresión de genes heterólogos en líneas de cultivo celular, ratones transgénicos y plantas. LCR de las regiones de control del locus son elementos reguladores cis necesarios para la activación de la cromatina inicial de un locus y la transcripción génica secuencial en sus ubicaciones nativas (revisado por Grossveld, 1999). LCS generalmente confiere expresión específica de tejido en los genes enlazados. Además existen otros elementos (STAR o elementos estabilizadores contra el represor, elementos de apertura de la cromatina ubicuos o los UCO, etcétera) que se han identificado y que tienen cierta capacidad para aumentar la expresión transgénica estable en células huésped industrialmente relevantes tales como CHO. La mayoría de estos elementos funcionan en cis al transgén, pero además se ha reportado que las MAR funcionan cuando se cotransfectan en trans con el transgén (Zahn-Zabel y otros (2001) J. Biotechnology 87: 29-42). Los aislantes ilustrativos incluyen además un segmento de ADN que abarca el extremo 5' del locus de α globina de pollo y corresponde al sitio hipersensible constitutivo 5' del pollo como se describe en los elementos descritos en la publicación PCT 94/23046, en Bell y otros (2001) Science 291: 447-50, y STAR de Chromagenics B. V. (Amsterdam, The Netherlands).

Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor adecuado y además cualquier sitios de unión al ribosoma necesario, sitio de poliadenilación, sitios donador y aceptor, secuencias transcripcional de terminación y secuencias 5' no transcritas flanqueantes. La Figura 1A presenta una imagen esquemática del esqueleto del vector y de los casetes de expresión de las SPCBP en eucariotas y típicamente en células de mamíferos. La Figura 1B describe lo mismo para organismos procariontes como *E. coli*. Las secuencias reguladoras de expresión comprenden promotores, potenciadores, regiones de fijación al andamio, elementos reguladores negativos, sitios de iniciación transcripcional, sitios de unión a proteínas reguladores o combinaciones de dichas secuencias. Alternativamente, las secuencias que afectan la estructura o la estabilidad del ARN o proteína producida se reemplazan, eliminan, añaden o modifican de cualquier otra forma mediante el direccionamiento, que incluyen las señales de poliadenilación, los elementos de estabilidad del ARNm, los sitios de corte y empalme, secuencias líder para mejorar o modificar las propiedades de transporte o secreción de la proteína, u otras secuencias que alteran o mejoran la función o la estabilidad de las moléculas de proteína o ARN, que incluyen el iARN. Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifican las proteínas SPCBP, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que el vector se ha introducido (ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos núms. 4,399, 216,4, 634,665 y 5,179, 017). Típicamente es un gen y/o proteína cuya presencia puede detectarse directa o indirectamente en una célula, por ejemplo, un gen y/o una proteína que inactiva un agente de selección y protege la célula huésped de los efectos letales o inhibidores del crecimiento del agente (por ejemplo, un gen y/o proteína de resistencia a antibióticos). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que el vector se introdujo. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped *dhfr* con selección/amplificación de metotrexato), el gen *neo* (para la selección G418), la proteína marcadora seleccionable para la resistencia a la zeocina (*zeo*) y el marcador seleccionable de blasticidina (*bsd*). Para las células NSO, el sistema de Glutamina sintetasa se ha usado ampliamente y se ha revisado como sistema de amplificación. (Bebbington y otros, 1991, Bio/Technology 10: 169-175; Barnes y otros, Biotechnol Bio eng 73: 261). El único antibiótico que es particularmente ventajoso es la zeocina, porque la proteína de resistencia a la zeocina (*zeocina-R*) actúa uniéndose al fármaco y haciéndolo inofensivo. Por lo tanto, es fácil valorar la cantidad de fármaco que destruye a las células con bajos niveles de expresión de *zeocina-R*, mientras que permite que los expresores de alta expresión sobrevivan. Otra posibilidad es que dicho marcador de selección induzca fluorescencia o un depósito de color (por ejemplo, proteína fluorescente verde y derivados, luciferasa o fosfatasa alcalina).

En un sistema ilustrativo para la expresión recombinante de un anticuerpo modificado, o una porción de unión a antígeno de este, de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica al menos dos genes de SPCBP en células CHO *dhfr*- mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los dos genes de SPCBP se unen operativamente a elementos reguladores del potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante además porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de los dos genes de SPCBP. Se usan técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

Muchas de las SPCBP en virtud de su tamaño compacto y estructura de dominio único son ideales para expresarse como huéspedes unicelulares tales como células de levadura o huéspedes procariontes. Los fragmentos de las bibliotecas dAb de llama han demostrado excelentes propiedades de solución (Tanha y otros, 2002, J. Immunol. Methods 263: 97- 969), además en comparación con anticuerpos de ratón y humanos y regiones VH (Ewert y otros

2002, *Biochemistry* 41: 3628-36), y los fragmentos de anticuerpo VHH se han producido a altos niveles en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichiapastoris* (Thomassen y otros, 2002, *Enzyme Microb. Technol.* 30: 273-278; Frenken y otros, 2000, *J. Biotechnol.* 78: 11-21; Holt y otros, 2003, *Trends Biotechnol.* 11: 484-90). Se han descrito sistemas amplios para la expresión de proteínas heterólogas y, en particular, las SPCBP como fragmentos de anticuerpos, proteínas VHH, los dAb, dominios Kunitz, anticuerpos y fluorocuerpos, en procariontes y/o eucariontes inferiores. Además, se ha informado la expresión de proteínas multiméricas en estos huéspedes.

Las bibliotecas de células que expresan las SPCBP se producen mediante la introducción en las células de un vector, múltiples vectores, o en cromosomas artificiales (ACE; *Cytometry.* 1999 Feb 1; 35 (2): 129-33), en los que se han clonado genes que codifican múltiples SPCBP. Los plásmidos después de la transfección se integran en el genoma de la célula huésped o existen como un elemento genético independiente (por ejemplo, episoma, plásmidos). Los vectores de conformidad con la presente invención son vectores de copia única o vectores de copia múltiple. Los vectores preferidos de la presente invención incluyen vectores de expresión de levaduras, particularmente 211 vectores y vectores de centrómero. Muchos de los vectores preferidos para la expresión en eucariontes son vectores lanzadera, conocidos en la técnica como vectores que pueden replicarse en más de una especie de organismo. Por ejemplo, un vector lanzadera que puede replicarse tanto en *Escherichia coli* (*E. coli*) como *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) puede construirse mediante secuencias de enlace de un plásmido de *E. coli* con secuencias del plásmido de levadura 2 μ .

El huésped de la presente invención además es una levadura u otros hongos tales como *Aspergillus*. En la levadura, se usa una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Para una revisión, ver, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Ed. Ausubel y otros, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Cap. 13 (1988); Grant y otros, *Expression and Secretion Vectors for Yeast*, en *Methods in Enzymology*, Ed. Wu & Grossman, Acad. Press, N. Y. 153: 516-544 (1987); Glover, *DNA Cloning*, Vol. II, IRL Press, Wash., D. C., Ch. 3 (1986); Bitter, *Heterologous Gene Expression in Yeast*, en *Methods in Enzymology*, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N. Y. 152: 673-684 (1987); y *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Eds. Strathern y otros, Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II (1982). El huésped de la presente invención es además un organismo procarionte, tal como *E. coli*. Como un ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para bacterias pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos comercialmente disponibles que comprenden elementos genéticos del conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Dichos vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). Otros plásmidos de expresión procarionte se proporcionan como ejemplos: Bacterianos: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, y pRIT5 (Pharmacia). Los promotores bacterianos particulares incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P, y trc. Se usan secuencias de control transcripcional para dirigir la expresión de transcritos que codifican el gen o genes de SPCBP. Para la expresión de levadura, los siguientes plásmidos de expresión se proporcionan como ejemplos. Los vectores de expresión para su uso en levadura incluyen YRp7 (Struhl y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 1035-1039, 1979), YEpl3 (Broach y otros, *Gene* 8: 121-133, 1979), pJDB248 y pJDB219 (Beggs, *ibid.*), y sus derivados. Tales vectores generalmente comprenderán un marcador seleccionable, tal como el marcador nutricional TRP1, que permite la selección en una cepa huésped que porta una mutación trp1, o el marcador seleccionable pOT1, que permite la selección en una cepa tpi cultivada en medio rico (Kawasaki y Bell, *EP* 171, 142). Los promotores y los terminadores preferidos para su uso en vectores de expresión de levaduras incluyen aquellos de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman y otros, *J. Biol. Chem.* 255: 12073-12080, 1980; Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 419-434, 1982; Kawasaki, Patente de Estados Unidos núm. 4,599, 311) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young y otros, en Hollaender y otros (eds.), *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, Plenum, Nueva York, 1982, pág. 335; y Ammerer, *Meth. in Enzymology* 101: 192-201, 1983), los promotores inducibles por galactosa, pGALI, pGALI-10, pGal4 y pGallO; promotor de fosfoglicerato quinasa, pPGK; promotor del citocromo c, pCYC1; y promotor de alcohol deshidrogenasa I, pADH1. Para la expresión de *Pichia* como un ejemplo, el plásmido pPICZ de Invitrogen se cita como ilustración; en este plásmido, el casete de expresión para la proteína de interés es accionado por el promotor AOX1 inducible por metanol de *P. pastoris*. Después de la transformación de las células de *P. pastoris* KM71H, las células que han integrado de manera estable una copia del transgén se seleccionan con zeocina.

Las secuencias líder o señal se diseñan para la translocación de polipéptidos nacientes desde ribosomas en el citoplasma directamente a la luz del retículo endoplásmico. Las secuencias líderes, típicamente hidrofóbicas, incluyen una secuencia reconocida y escindida por peptidasas eucariontes. El evento de escisión produce un polipéptido maduro que, sin otras señales, se secreta de la célula. Otras señales opcionales que pueden proporcionarse a los genes de SPCBP son señales dirigidas a compartimientos subcelulares tal como el núcleo, la vacuola de las células vegetales, la mitocondria, señales de retención de ER (por ejemplo, KDEL en la región C terminal de la región de codificación) y regiones transmembranales para anclar directamente las SPCBP en la membrana de la célula o anclajes GPI equivalentes. Las personas expertas en la técnica conocen varias secuencias líder o de señal operativas en la presente invención; para incluir secuencias de señal operables en levaduras Mfal prepro, Mfal pre, fosfatasa ácida Pho5, Invertasa SUC2; secuencias de señal operables en *E. coli* pill, PelB, OmpA, PhoA; líder de gp64 operable en células de insectos; líder de IgK, secuencias de señal de secreción melitina de abejas operables en células de mamíferos. Las secuencias señal eucarióticas particularmente preferidas incluyen las del factor de acoplamiento α de levadura, α aglutinina de levadura, invertasa de *Saccharomyces*, inulina de *Kluyveromyces*, y con preferencia superlativa el péptido señal de la subunidad Aga2p de α aglutinina.

La introducción de la construcción recombinante en la célula huésped puede efectuarse, por ejemplo, mediante transfección de fosfato de calcio (Wigler y otros, *Cell* 14: 725,1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603,1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52: 456, 1973), DEAE, transfección mediada por dextrano o electroporación (Neumann, *EMBO J.* 1: 841-845, 1982 y Davis, L. y otros, *Basic Methods in Molecular Biology* (1986).

El ADN que codifica los anticuerpos de la invención se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales para clonación, preparación de ADN y secuenciación como se describe por Sambrook, y otros, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989), cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. Para la secuenciación, pueden usarse sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a las secuencias del vector que rodean los fragmentos del gen, y la secuencia de ADN determinada por secuenciación basada en didesoxi (Sanger, F. y otros (1977) *PNAS* 74: 5463-5467). Una vez aislado, el ADN que codifica la región apropiada del gen de SPCBP se coloca en uno o más vectores de expresión como se describe aquí y más abajo, que después se transfectan en células huésped. La célula huésped es una célula huésped eucariótica superior, tal como una célula de mamífero, una célula huésped eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped es una célula procarionta, tal como una célula bacteriana.

En una modalidad preferida, se fabrican bibliotecas de proteínas SPCBP en células de mamífero. Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos clon o fragmentos de unión a antígeno de estos incluyen el ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen las células CHO dhfr-, descritas en (Urlaub, G. y otros (1980) *PNAS* 77: 4216-4220)), usado con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en (Kaufman, R. J. y otros (1982) *J Mol Biol* 159: 601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NSO y células SP2, células C127,3T3, células A431 epidérmicas humanas, células Jurkat, U937, HL-60, células HEK-293, células C2C12, células L de ratón, células de riñón de hámster bebé, células COS o CV-1, PER. Células C6 (Pau, M. G. y otros (2001) *Vaccine* 19: 2716-2721), otras líneas celulares de primates transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria. Otros tipos de células adecuadas para la expresión, en particular para la expresión transitoria, son las células COS de simios (Gluzman, Y. (1981) *Cell* 23: 175-182), y las células de riñón embrionarias humanas de los linajes 293,295T y 911 (Hek293, 295T, 911).

En otra modalidad, se producen bibliotecas de células que expresan mezclas de proteínas SPCBP en eucariotas inferiores tales como levaduras o en procariontas tales como bacterias (Simmons, L. C. y otros (2002) *J Immunol Methods* 263: 133- 147.). Las cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas.

Para algunas aplicaciones, se requiere modificar la mezcla de proteínas producida, por ejemplo mediante fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, para obtener la proteína funcional. Tales adiciones covalentes de las mezclas de proteínas se llevan a cabo usando métodos químicos o enzimáticos conocidos. Los polipéptidos y proteínas recombinantes producidos en el cultivo bacteriano usualmente se aíslan, por ejemplo, por la extracción inicial a partir de los sedimentos celulares, seguido de una o más, precipitación por sales, cromatografía de intercambio de iones acuosos o de exclusión por tamaño. En algunas modalidades, el ácido nucleico molde además codifica una etiqueta de polipéptido, por ejemplo, penta o hexa-histidina. La mezcla de polipéptidos recombinantes puede purificarse después usando cromatografía de afinidad. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas puede romperse por cualquier método conveniente, que incluyen ciclo de congelación descongelación, sonicación, rotura mecánica, o el uso de agentes que lisan células. Preferentemente, se usan métodos de purificación independientes del reconocimiento de antígeno

Las modalidades preferidas de andamio de las SPCBP son anticuerpos de dominio único (dAbs) con segmentos de anticuerpo humanos, preferentemente basados en un segmento germinal de anticuerpo humano y preferentemente DP47, y además anticuerpos VHH de solo cadena pesada de camélido, preferentemente de animales inmunizados y preferentemente con sitios potencialmente inmunogénicos que se eliminan, cuando se usan en humanos. Preferentemente, los andamios codifican un dominio proteico globular compacto con preferentemente no más de 250 aminoácidos, preferentemente no más de 150 aminoácidos. Los métodos preferidos de aislamiento de las SPCBP de las bibliotecas de andamios son la presentación en fagos y levaduras, el tamizaje de bibliotecas de expresión, la presentación de ribosomas y las estrategias de complementación enzimáticas.

2.3.2. Producción de bibliotecas de mezclas de SPCBP

En una primera modalidad, se identifica una colección de diferentes genes que codifican SPCBP, y esto se clona en vectores de expresión apropiados (ver anteriormente y además más abajo para detalles sobre formatos específicos). La biblioteca de las SPCBP contiene múltiples SPCBP, al menos dos y preferentemente no más de 20 y preferentemente entre 2 y 10. Esta colección de genes de SPCBP se introduce después en las células del huésped de tal manera que las células huésped estarán fabricando las SPCBP múltiples y diferentes.

La introducción se realiza usando técnicas de transfección convencionales, que incluyen la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE dextrano, lipofección o electroporación. Además, pueden usarse vectores biológicos, por ejemplo, vectores virales tales como retrovirales y adenovirales (para células eucariotas) o tales como fagos filamentosos o fagos lambda (para células bacterianas tales como *E. coli*). Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3era edición., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001), y otros manuales de laboratorio adecuados.

En una modalidad preferida, se usan células eucariotas como células huésped, preferentemente CHO o PER. Células C6. En ese caso, la transfección puede hacerse de manera transitoria, de clones identificados que mantienen los vectores de expresión de forma estable dentro de la célula, esto es ya sea a través de la integración estable del transgén en el genoma de la célula o mediante vectores episomales. Si se usa la transfección estable, con la posibilidad de seleccionar líneas celulares transfectadas para copias integradas de forma estable de los ADN que codifican SPCBP, los anticuerpos o anticuerpos relevantes se clonan preferentemente mediante dilución limitante o selección de células. Además para tal transfección, frecuentemente se usan plásmidos linealizados digeridos por enzimas de restricción para aumentar el número de transfectantes.

En una modalidad preferida de esta invención, representada en la Figura 2A y la Figura 3, múltiples genes de SPCBP (3 se indican en la Figura 3) se clonan en un vector de expresión apropiado, y después se presentan como una mezcla de dos ADN introducidos en la célula huésped. Las células huésped se transfectan y cultivan en condiciones que permiten la selección para la integración del plásmido en el genoma del huésped. En una modalidad preferida, las células se someten a una etapa de clonación, en la que se manipulan y cultivan células de tal manera que se obtienen poblaciones de células que son genéticamente idénticas con respecto a la inserción de los ácidos nucleicos que codifican SPCBP y su lugar de inserción. Así, los clones celulares se expanden en los pocillos de cultivo de tejidos, de tal manera que los pocillos de cultivo de tejidos contendrán en medio clones individuales, con algunos de los clones que expresan los genes de SPCBP.

Puede determinarse la secreción de SPCBP específica de antígeno entre estos clones y pocillos mediante varios métodos, preferentemente mediante ELISA o prueba equivalente de las mezclas de proteínas de cada pocillo (ver además la descripción anterior de los ensayos de unión). En la Figura 3, se representa tres placas de ELISA diferentes que representan la reactividad del mismo sobrenadante en tres antígenos diferentes: los pocillos que son reactivos con los tres antígenos contienen células que secretan las tres SPCBP. Más abajo se describen procedimientos de detección más extensos.

La composición de la mezcla de SPCBP se influncia por la manipulación de cualquiera de los parámetros que afectan el nivel de expresión alcanzado en la célula huésped y su estabilidad a lo largo del tiempo. El nivel de expresión de un componente dado es una función de muchos factores, que incluyen las secuencias reguladoras que impulsan la expresión del componente, la elección de la célula huésped, el método de expresión (transitorio o estable) y, para la expresión estable, el número de copia y sitio de integración. Los niveles de expresión además pueden afectarse por muchos parámetros, que incluyen la elección de los elementos reguladores de la transcripción (que incluyen la elección del promotor, potenciador, aislantes, los antirrepresores, etcétera).

Así, la frecuencia en la biblioteca de clones celulares que expresan genes de SPCBP únicos o múltiples dependerá de muchos parámetros, que incluyen el lugar de inserción del (los) transgén (es), la cantidad de ADN usado, la presencia de los genes de SPCBP en el mismo plásmido, la frecuencia de transfección, etcétera. Existe una alta probabilidad de que el transgén se vuelva inactivo debido al silenciamiento de genes (McBurney y otros, 2002), resultando, para las tecnologías convencionales, en una fracción de las células huésped recombinantes que producen uno o múltiples SPCBP. Para construir una línea celular que produzca múltiples polipéptidos a niveles elevados, los diferentes transgenes generalmente se integran independientemente, pero eso conducirá a una reducción en la frecuencia de los clones celulares que expresan las SPCBP.

Si dos transgenes se transfectan de manera simultánea en dos plásmidos separados, la proporción de células que producirán ambos polipéptidos en niveles elevados será el producto de las proporciones para los transgenes únicos; si el 33% de la célula expresa una proteína de unión a un nivel mínimo establecido que está por encima de un cierto criterio de selección (por ejemplo, 3 veces la señal de fondo en ELISA), solo aproximadamente 10% expresará dos en este nivel, 3% expresará tres en el nivel establecido, etcétera. Cuantos más genes de SPCBP se usen para fabricar la biblioteca, más importante será usar un protocolo de transfección eficiente. Por ejemplo, los casetes de expresión con los genes de SPCBP además pueden ser parte de un sistema viral de manera que pueden lograrse altos niveles de eficacia de transfección/infección y múltiples infecciones por célula.

Una ventaja importante de usar las SPCBP es que muchas de estas proteínas tienden a ser moléculas de un dominio único de tamaño limitado (tamaño promedio de 100-130 aminoácidos, y en su mayoría por debajo de 200 aminoácidos). Con tales regiones de codificación relativamente pequeñas, en promedio 300-400 nucleótidos por SPCBP (sin el líder y las etiquetas opcionales), será mucho más fácil construir vectores de expresión que incorporen estos ácidos nucleicos que, por ejemplo, los genes de anticuerpos que codifican IgG. Las regiones codificantes para este último son

aproximadamente 600 y 1400 nucleótidos para las dos cadenas respectivamente, pero muchos vectores de expresión utilizan ADN de Ig genómica que son incluso de mayor tamaño. Así, las SPCBP son ideales para combinar en un plásmido de expresión, y la invención describe modalidades con 2,3, 4 a 10 SPCBP diferentes por plásmido. Por lo tanto existe una lista de posibilidades para combinar las varias SPCBP, elementos y procedimientos regulatorios, para hacer bibliotecas de células que expresan múltiples SPCBP y sus composiciones.

En una primera modalidad, para obtener bibliotecas con una frecuencia más alta de múltiples SPCBP expresadas, los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas se clonan en un mismo plásmido que porta un marcador de selección para seleccionar para la integración estable. La Figura 4A-H describe casetes de expresión de proteína adecuados con múltiples genes de SPCBP, con diferentes orientaciones, que se ajustan al esqueleto del vector de la Figura 1 o vectores equivalentes. Algunas de estas versiones portan en cis uno o dos elementos de control de la expresión. En una modalidad preferida, los elementos estabilizadores antirrepresores (los STAR, Kwaks y otros, 2003. Nat. Biotechnol 21: 553) se clonan en uno o ambos extremos de los genes de SPCBP (Figura 4A- D). Tales elementos confieren expresión estable y de alto nivel de un transgén dado como se muestra en esta cita y en los documentos de patentes WO03106674A2 y WO03004704A2. En esta invención, describimos su uso para mediar expresión estable y de alto nivel para cada copia individual del transgén (ver además más abajo, 2.3. 3). En una modalidad de esta invención, los vectores que incorporan cualquiera de estos casetes de expresión pueden combinarse con vectores que incorporan las mismas casetes de expresión diferentes enumerados en la Figura 4, durante el tiempo que la mezcla de vectores cuando se usa para la transfección introduce múltiples regiones de codificación SPCBP en las células huésped.

En otra modalidad, se usan vectores diferentes que cada uno porta un marcador de selección diferente (Figura 2B; 3 marcadores diferentes se describen como Seleccionar 1-3), usando las células cotransfectadas un método de transfección/transducción/infección altamente eficiente y dos o régimen de selección triple aplicado; esto reduce el número total de clones de células supervivientes pero asegura que cada célula superviviente habrá absorbido el ADN para cada una de las tres proteínas de unión. Los marcadores de selección se describen en la sección anterior. Otra modalidad es colocar el marcador seleccionable en el mismo plásmido y bajo el control del mismo promotor que el gen de la SPCBP, la última disposición que produce lo que se conoce como un mensaje dicistrónico o policistrónico. En una modalidad preferida, los genes marcadores seleccionables se enlazan a través de una secuencia IRES corriente abajo de los genes de SPCBP (Figura 4G-H). Este enlace genético directo entre la SPCBP y el marcador de selección proporciona una garantía de que las líneas celulares seleccionadas para el marcador además expresarán la proteína SPCBP (como además se describe en Rees y otros, Biotechniques 20: 102-10). Alternativamente al uso de una secuencia IRES, puede usarse un corte y empalme alternativo (Lucas y otros, Nucleic Acids Res 1996: 24: 1774-9).

En otras dos modalidades, la expresión de dos SPCBP se hace dependiente entre sí de una de las siguientes maneras (Figura 4F y Figura 5). En la primera modalidad, el ácido nucleico que codifica la primera SPCBP se clona en un casete de expresión, de manera que estará bajo el control de un promotor dado (típicamente el promotor de CMV fuerte u otro), y de manera que se sigue su secuencia de codificación por un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES). Esto es seguido inmediatamente por una segunda región de codificación de la SPCBP (como se representa en la Figura 4F). El promotor PI ahora impulsará la expresión de BP-1 y BP-2, lo que conduce a una relación de expresión aproximada de 1: 1 entre estas dos proteínas; frecuentemente aunque la segunda región de codificación está ligeramente menos bien expresada. Así, si la relación de expresión tiene que agitarse hacia un nivel predefinido, el uso de secuencias IRES es particularmente útil. Este nivel predefinido se influencia entre otros factores por la naturaleza de la secuencia IRES, y diferentes secuencias IRES mediarán diferentes relaciones finales. Similarmente, la relación de expresión entre tres SPCBP puede enlazarse entre sí mediante el uso de un casete de expresión tricistrónico, en el que el casete descrito anteriormente va seguido de otra región codificante de IRES y SPCBP. Se describen ejemplos de sistemas de expresión tricistrónicos y de secuencias y configuraciones IRES para otros sistemas en la literatura (Li y otros, J. Virol. Methods 115: 137-44; When y otros, Cancer Gene Therapy 8: 361-70; Burger y otros 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 345-53). Así, las bibliotecas de esta invención además pueden producirse variando las secuencias de IRES.

En la segunda aproximación para influenciar las relaciones de expresión, que se representa en la Figura 5, el casete bicistrónico que contiene como primera región de codificación la primera secuencia de SPCBP y después la secuencia IRES se sigue por la secuencia codificante del transactivador del elemento respuesta *tet* (TRE) fusionado al dominio de activación de la proteína VP16 del herpes simple (tTa). El ácido nucleico que codifica la segunda SPCBP se clona en un casete de expresión de manera que su expresión se regula a través de un promotor inducible, por ejemplo el elemento respuesta *tet* (TRE), existente de 7 copias del sitio del operador de tetraciclina procariótico fusionado a un promotor CMV mínimo. Al introducir ambos casetes de expresión en la misma célula (en diferentes vectores o en los mismos vectores, al mismo tiempo o uno antes que el otro), existirá la siguiente relación entre la expresión de las dos regiones variables: expresión de la primera SPCBP, que está bajo el control de, por ejemplo, un promotor constitutivo, conducirá a la expresión de la proteína tTa. Esta proteína activa el promotor basado en TRE que impulsará la expresión de la segunda SPCBP. Así, la producción de la segunda SPCBP depende ahora de la producción de la primera SPCBP. En otra modalidad, la producción de un conjunto de las SPCBP puede hacerse dependiente de la producción de otro conjunto de las SPCBP. En esta modalidad, la primera colección de genes de SPCBP se clona bajo el control del elemento TRE, mientras que se proporciona una segunda colección de otros genes de SPCBP con el gen IRES y tTa, como se describió anteriormente. Similarmente a la anterior, cada SPCBP individual que se expresa activará la producción de otra SPCBP. Esta biblioteca es ahora una biblioteca de células que expresan dos proteínas de unión de manera confiable. Se han descrito otros sistemas promotor transactivadores y además son aplicables en este concepto.

En el mismo campo de aplicación, en aquellos casos en los que las relaciones de dos SPCBP particulares necesitan controlarse o corregirse, este método de expresión dependiente se usa para enlazar la expresión de dos SPCBP.

5 En otra modalidad, los genes de SPCBP se transfectan secuencialmente en la célula huésped. Si se necesita hacer una biblioteca de un número limitado de las SPCBP de manera que se muestree una gran cantidad de variantes de un pequeño número de proteínas de unión (2-4), se usa el siguiente procedimiento. Primero consideramos la modalidad para bibliotecas de células que producen mezclas de 2 SPCBP. Las células se transfectan con los dos genes de SPCBP clonados en diferentes vectores, pero la transfección se realiza secuencialmente en el tiempo. En esta modalidad, un segundo gen de SPCBP se transfecta en una célula huésped que ya expresa un primer gen de SPCBP en alto nivel. 10 Esto es útil para hacer una biblioteca en la que solo una de las dos proteínas de unión está variegada. En otro enfoque, el primer gen de SPCBP se transfecta y no se identifica un clon celular, sino una colección de células que expresan una cantidad mínima de proteínas SPCBP (pero a una concentración variable). Estas células después se transfectan con el segundo gen de SPCBP como antes, y se identifican clones celulares que expresan múltiples relaciones de las dos SPCBP. Para hacer la mezcla de dos SPCBP, el ADN que codifica las dos SPCBP además puede codificarse en el mismo plásmido (ver más abajo). Este procedimiento de llevar a cabo transfecciones secuenciales (y, si procede, selecciones de integración entre ellas) además es adecuado para hacer colecciones de mezcla con hasta 10 SPCBP diferentes. En esta modalidad, las células se transfectan con una primera colección de máximo 5 genes de SPCBP y las células que expresan una cantidad mínima de las proteínas SPCBP (pero a una concentración variable) se aíslan. Para 20 aumentar el número de clones celulares que expresan múltiples SPCBP, la colección de genes se basa preferentemente en el mismo plásmido, que además porta un primer marcador de selección (ver más abajo una descripción de dichos casetes de expresión). La población celular seleccionada se transfecta posteriormente con un plásmido que contiene la segunda colección de máximo 5 genes de SPCBP y un segundo marcador de selección (Figura 6). Las células resultantes ahora expresan bibliotecas de hasta 10 proteínas de unión diferentes a proporciones muy variables y en muchas combinaciones diferentes. Como una modalidad alternativa para hacer que las células expresen una diversidad similar o mayor, se usa el siguiente procedimiento. Primero, como antes, se producen poblaciones de células que expresan hasta 5 SPCBP diferentes y son resistentes en base a un marcador de selección. En paralelo, se producen múltiples poblaciones de células transfectando cada una con plásmidos que cada uno lleva 5 genes de SPCBP diferentes y un marcador de selección diferente (por ejemplo, neo, gpt, zeo, bdl, etcétera). En segundo lugar, estas poblaciones celulares se fusionan y se seleccionan después para la presencia de ambos marcadores selectivos. Estas células híbridas tienen el potencial para expresar hasta 10 SPCBP diferentes. Similarmente, este procedimiento puede repetirse si deben realizarse colecciones de 15 o 20 SPCBP. Los métodos para la fusión celular se describen ampliamente en la literatura y son conocidos por quienes trabajan en el campo; son similares a los descritos en Norderhaug y otros, 2002 (Eur. J. Biochem 269: 3205-10), aunque aquí no se coexpresan subunidades sino las SPCBP. 35

En otra modalidad, los genes de SPCBP se proporcionan mediante fusión genética a un elemento apropiado que proporciona un anclaje en la superficie de la célula huésped. Los anclajes descritos para los procedimientos de tecnología de presentación descritos anteriormente además son adecuados como anclajes para múltiples SPCBP expresadas y ancladas por la misma célula huésped. Preferentemente, las señales de anclaje incluyen proteínas basadas en membranas, proteínas asociadas a membranas, proteínas de recubrimiento virales y componentes de la pared celular que se usan con éxito para presentar bibliotecas de proteínas en células huésped, que incluyen fusiones Lpp-OmpA, lamb y PhoE para presentar en la superficie de *E. coli* y Aga-2p para presentar en *Saccharomyces cerevisiae*. 40

45 Esto es particularmente interesante para las aplicaciones de terapia celular, por ejemplo, en la transferencia adoptiva de linfocitos humanos que se han modificado genéticamente para expresar múltiples SPCBP en su superficie celular y, como tales, se redirigieron hacia células tumorales o infectadas por virus. En la actualidad se aborda que una sola especificidad se injerta en tales células que se investigan en la clínica (Wang y otros, Nat. Med. 1998, 4: 168-72). Alternativamente al uso de una fusión genética, puede usarse un corte y empalme alternativo para obtener una fracción de la proteína de unión que se une a la superficie celular (similar a lo que se describió para genes de anticuerpos humanos; y Lucas y otros, Nucleic Acids Res 1996: 24: 1774-9). Esta configuración además permite un tamizaje directo para la unión de antígenos en la superficie de la célula huésped, por ejemplo, a través de citometría de flujo con antígeno (s) marcado (s) con fluorescencia o epítopos objetivo o mimotopos de SPCBP (ver más adelante), o una selección directa de células que expresan múltiples antígenos y en niveles diferentes, por ejemplo a través de métodos de clasificación. 55

En muchas aplicaciones, los genes de SPCBP se proporcionarán con una señal de localización. La modalidad preferida es proporcionar una señal de secreción o líder, que media la secreción de las proteínas en el medio (para las células eucariotas) o en el espacio periplásmico (para las bacterias gram negativas tales como *E. coli*). En otra modalidad, se usan protocolos de expresión transitoria, que son particularmente útiles para la prueba funcional inicial de combinaciones de SPCBP. Las células, por ejemplo, células HekT y COS, se transfectan con ADN plasmídico que codifica las múltiples SPCBP. La mezcla de SPCBP se recupera después del medio en el que se cultivan las células. En tales casos, la modalidad preferida es usar los genes de SPCBP clonados en plásmidos separados (por ejemplo, como en la Figura 2A y Figura 3); la relación entre los ADN del plásmido de entrada entonces además influyen enormemente y predetermina las relaciones entre las SPCBP expresadas. Después se elabora una biblioteca de mezclas de proteínas 65

al transfectar en experimentos separados diferentes cantidades de plásmidos en las células, y cosechar los productos. Con múltiples plásmidos usados durante más tiempo cultivando números de copias

- 5 La expresión de mezclas de las SPCBP en algunos casos se logra sin integrar el ADN en el genoma de la célula huésped. En una modalidad, los plásmidos de expresión para dirigir la expresión en eucariotas superiores se ajustan con elementos tales como el ori/EBNA-1 del virus Epstein Barr, que permite el mantenimiento episomal a largo plazo en células de mamíferos (ver por ejemplo Bode y otros 2001, Int. J. Gene Ther. Mol. Biol. 6: 33-46). En una modalidad, tales plásmidos se ajustan con múltiples genes de SPCBP, por ejemplo, usando los casetes de expresión representados en la Figura 4B-F. Es la modalidad preferida que en este caso las regiones codificantes de SPCBP se clonan en el mismo plásmido. En otra modalidad, se introducen múltiples genes de SPCBP en cromosomas artificiales que no se integran en el genoma de la célula huésped, sino que se replican de forma independiente. Esto se logra mediante inserción dirigida a un sitio desde un vector de orientación de ACE mediante una integrasa, y requiere que el plásmido incorpore sitios de reconocimiento (ver por ejemplo Nat Biotechnol. 2003 Jun; 21 (6): 652-9).
- 10
- 15 En los eucariotas inferiores, se han descrito plásmidos que pueden replicar de forma autónoma los plásmidos. En una modalidad, preferentemente dos o tres unidades de expresión (con cada una o múltiples regiones codificadoras de SPCBP) se clonan en uno de dichos vectores de expresión de replicación autónoma, preferentemente un plásmido de expresión basado en pUC19 o pBr322. En otra modalidad, la clonación de las dos o tres unidades de expresión preferidas (con cada una o múltiples regiones codificadoras de SPCBP) se realiza en dos plásmidos separados que pertenecen a diferentes grupos de compatibilidad y, así, se replican en la célula huésped sin interferencia. Los plásmidos basados en *E. coli* preferidos son plásmidos basados en pBR322 (con el Col E1 ori), por un lado, y plásmidos compatibles, tales como los de la serie pSC101 (Manen y otros, Gene. 1997 86 (2): 197-200). Un conjunto preferido incluye los derivados pBLUESCRIPT con ori que median un número de copias bajo y son compatibles, por ejemplo ori de pBR322 Col E1 y ori de pI5A (Mayer, Gene, 1995,163 (1): 41-6). Tales plásmidos preferentemente llevan diferentes marcadores seleccionables (kanamicina (KmR) o tetraciclina (TcR)). La variabilidad entre las SPCBP se logra aquí mediante el uso de plásmidos que se mantienen en números de copia diferentes, proporcionando así una dosificación genética baja o alta a la célula huésped de expresión. Se prefieren las combinaciones entre tales plásmidos si es conveniente grandes diferencias relativas entre las SPCBP particulares (relaciones 10: 1 o más).
- 20
- 25
- 30 Los sistemas de expresión transitoria de las células eucariotas son útiles para verificar rápidamente la actividad de una mezcla de SPCBP con proporciones particulares de las SPCBP. Las regiones codificantes de SPCBP se clonan preferentemente en plásmidos separados (como en la Figura 2A), y las bibliotecas de células que expresan diferentes proteínas de unión y en diferentes relaciones se preparan después mezclando los ADN de plásmidos en diferentes combinaciones y cantidades. En general, la cantidad de ADN introducida afectará la cantidad de proteína producida. Tales configuraciones tienen varias desventajas (ver anterior) y no son útiles para preparar grandes colecciones de las SPCBP; sin embargo, la expresión transitoria es útil para la producción rápida de ciertas combinaciones de sitios de unión.
- 35
- 40 En una modalidad, la región de codificación de SPCBP se flanquea por secuencias que median la integración dirigida al sitio en el genoma de la célula huésped (Figura 1). Sin estos, la integración de transgenes ocurre al azar y, usualmente, varias copias del transgén se integran al mismo tiempo, a veces en forma de tándem de cabeza a cola, con el sitio de integración y el número de copias integradas variando de una célula transfectada a otra. El uso de los sitios de recombinación como se representa en la Figura 1 permite que el sitio preciso de la integración se oriente por recombinación homóloga entre el vector y el genoma de la célula huésped. Esto proporciona un medio para insertar la región de codificación en un sitio de alta actividad transcripcional, con la opción de proporcionar un promotor en el transgén o usar el que está presente en el sitio de integración. Con la inserción mediada por la recombinación homóloga o aleatoria de los ácidos nucleicos que codifican SPCBP se entiende cualquier inserción en el genoma de la célula huésped, o en los ácidos nucleicos en un organelo subcelular, o en un cromosoma artificial.
- 45
- 50 En algunas de las modalidades descritas, se usan casetes de expresión en formatos de vector, elementos con una secuencia idéntica o altamente homóloga en el mismo plásmido. Preferentemente, elementos diferentes (tales como promotores diferentes, secuencias IRES diferentes), se usan ambos para crear bibliotecas con relaciones muy variables entre los compuestos de SPCBP, pero además para minimizar los efectos de las secuencias homólogas sobre la estabilidad del constructo global una vez introducidas en la célula huésped. Si es necesario, tales elementos se proporcionan con regiones no homólogas, por ejemplo, mediante el reemplazo o supresión de piezas no vitales del elemento. En una otra modalidad, se crean bibliotecas de células con relaciones altamente variables de un conjunto limitado de las SPCBP mediante la combinación elementos reguladores variegados con este conjunto limitado de las SPCBP. Por ejemplo, ciertos nucleótidos dentro del(os) promotor(es) o secuencia IRES se variegan, lo que en algunos casos conducirá a la expresión alterada de la región codificante de SPCBP que está bajo el control de dicho(s) elemento(s).
- 55
- 60
- En todos estos casos, pueden tamizarse grandes cantidades de líneas celulares usando dispositivos automáticos de selección de células y procedimientos de clasificación de células.
- 65 En una modalidad adicional, preferentemente al menos dos SPCBP obtenidas mediante los métodos de la invención se combinan con un anticuerpo con dominios apareados, preferentemente un fragmento de Fv de cadena única con

dominios VH y VL apareados o un dominio Fab, con cadena pesada Fd y cadenas ligeras apareadas, de manera que preferentemente estas proteínas de unión comparten características similares que proporcionan un único camino para la purificación de la mezcla. En otra modalidad, una SPCBP obtenida mediante los métodos de la invención se combina con un anticuerpo con dominios apareados, preferentemente un fragmento de Fv de cadena única con dominios VH y VL apareados o un dominio Fab, con cadena pesada Fd y cadenas ligeras apareadas, de manera que preferentemente estas proteínas de unión comparten características similares que proporcionan un único camino para la purificación de la mezcla.

2.3.3. Regulación de la estabilidad de la expresión génica de SPCBP en el contexto de la producción de múltiples proteínas de unión en la misma célula huésped

Los ácidos nucleicos que codifican cadenas polipeptídicas individuales pueden coexpresarse en la misma célula para preparar mezclas de diferentes sitios de unión funcionales. Sin embargo, será importante controlar además, la expresión de las regiones variables individuales y sus relaciones de expresión, ya que esto afectará la composición de la mezcla final de proteínas de unión.

El nivel de expresión y la estabilidad de la expresión es, entre otras, una función del sitio de integración del transgén: si el transgén se integra cerca o dentro de la cromatina inaccesible, es probable que su expresión se silenciará. En esta invención se describe el uso para la producción de mezclas de SPCBP en la misma célula, de elementos que, al flanquear los genes del anticuerpo, aumentarán la predictibilidad del nivel de expresión, el rendimiento y mejorarán la estabilidad. Una secuencia STAR (Anti-Represor Estabilizador) (o anti-represor, o elemento STAR, los términos se usarán indistintamente en la presente descripción) es un elemento de ADN de origen natural que se aisló de los genomas eucariotas sobre la base de su capacidad para bloquear la represión transgénica. Preferentemente, los elementos STAR se derivan del genoma humano. Una secuencia STAR comprende la capacidad de influir en la transcripción de genes en *cis* y/o proporcionar un efecto estabilizante y/o potenciador. Se ha demostrado que cuando los elementos STAR flanquean transgenes, el nivel de expresión transgénica de las líneas celulares recombinantes seleccionadas aleatoriamente puede aumentarse a niveles que se aproximen a la expresión potencial máxima del promotor del transgén. Además, el nivel de expresión del transgén es estable en muchas generaciones de células, y no manifiesta el silenciamiento estocástico. Por lo tanto, las secuencias STAR confieren a los transgenes un grado de expresión independiente de la posición que no es fácilmente posible con los sistemas transgénicos convencionales. La independencia de posición significa que los transgenes que se integran en las ubicaciones genómicas que resultarán en el silenciamiento transgénico se mantienen, con la protección de los elementos STAR, en un estado transcripcionalmente activo. Así, los elementos antirrepresores proporcionan un alto nivel de predictibilidad de la expresión, altos niveles de expresión y expresión estable a lo largo del tiempo (Kwaks y otros, 2003. Nat. Biotechnol 21: 553). Tales elementos confieren expresión estable y de alto nivel de un transgén, como se muestra en esta cita, y en esta invención se describe su uso para mediar en una expresión estable y de alto nivel para cada copia individual de una mezcla de transgenes, que codifica múltiples SPCBP. Una variedad de tales elementos y otros sistemas para lograr un resultado similar se han identificado en la técnica, que incluyen las regiones de control del locus (las LCR), elementos de apertura de cromatina, cromosomas artificiales (por ejemplo, tecnología ACE de Chromos Molecular Systems Ltd), regiones de fijación a la matriz (MAR), región de fijación al andamio y los elementos de apertura de la cromatina ubicuo (UCO). Por ejemplo, las LCR son elementos reguladores de la transcripción que poseen una remodelación de cromatina dominante y la capacidad de activación transcripcional que confiere niveles fisiológicos completos de expresión en un gen unido en *cis*, cuando se integra en el genoma de la célula huésped. En la siguiente sección, la invención se describe para 'elementos antirrepresores', pero otros elementos de control diferentes, como los mencionados, y considerando que proporcionan la oportunidad de regular el alto nivel de expresión de múltiples genes, son igualmente adecuados para lograr una expresión controlada de los diferentes genes de SPCBP.

En la modalidad preferida, al menos uno del gen de SPCBP se flanquea por un elemento antirrepresor, o por dos elementos antirrepresores idénticos o dos diferentes ubicados en cualquier extremo del gen de SPCBP (Figura 4B, C); en otra modalidad, más de uno o posiblemente todos los genes de SPCBP que necesitan expresarse se flanquean por elementos antirrepresores. En una modalidad, todos de un máximo de 5 genes de SPCBP diferentes se basan en el mismo plásmido, en otro, se encuentran en plásmidos separados. En otra modalidad, se usan células CHO como huésped; en otra forma de modalidad células PER. Se usan las células C6.

La fabricación de mezclas de las SPCBP expresadas en la misma línea celular requerirá una relación estable de las diversas cadenas, de manera que la mezcla de SPCBP resultante después de la fabricación incluso en condiciones de GMP, tiene una composición estable. Tales composiciones estables pueden traducirse después en una actividad biológica estable y un perfil de toxicidad estable. Si la expresión de una sola SPCBP puede cambiar, puede afectarse la composición y, por lo tanto, alterar además, su actividad biológica. La provisión de elementos que producen un nivel de expresión más predecible y asociado con el número de copias es importante además para construir líneas celulares que expresan niveles estables de diferentes SPCBP. Si, por ejemplo, en la biblioteca tienen que expresarse en total cinco SPCBP, los elementos antirrepresores se usan para bordear esos genes de SPCBP, cuyas relaciones relativas deben ser aproximadamente equimolar. Mediante el uso de tales elementos, puede introducirse un mayor número de genes de SPCBP sin que se comprometa la estabilidad de la línea celular resultante. Por lo tanto, pueden introducirse múltiples genes de SPCBP, donde el número de copias integradas para cada gen de SPCBP estará además a cierto nivel que refleje su nivel de expresión absoluto. Con tales elementos será mucho más fácil y más rápido alterar o predeterminar la

relación de los niveles de expresión de algunos o todos los genes de SPCBP, por ejemplo, mediante la manipulación de la relación de los ADN que codifican los genes de SPCBP en el momento de la transfección.

5 Esto además explica la incorporación preferida de tales elementos antirrepresores en los vectores que se usan para crear las bibliotecas de células que expresan SPCBP; los elementos antirrepresores insertados preferentemente son los elementos STAR citados anteriormente.

10 Otra modalidad utiliza como elementos de control de expresión, las regiones de fijación a la matriz o MAR. Se ha demostrado que las MAR se asocian con la remodelación de la cromatina circundante, promoviendo así la expresión transgénica en forma de un dominio transcripcional artificial activo. Los elementos MAR son muy activos cuando un casete transgénico se cointegra dentro del cromosoma de la célula huésped eucariota, pero además cuando un casete transgénico no se integra. Las MAR funcionan por el aislamiento de genes cercanos del efecto de la cromatina circundante, lo que aumenta, de ese modo, la expresión de genes dependiente del número de copias, independiente de la posición. Por esta razón, las MAR aumentan el número de células transformadas independientemente que expresan la proteína y promueven una mayor cantidad de proteína recombinante producida por estas células. En general, las MAR aceleran el aislamiento clonal y permiten mayores velocidades de producción. Ejemplos de las MAR pueden encontrarse en Zahn-Zabel y otros (2001) J. Biotechnology 87: 29-42 y en el documento de patente WO02074969A2. Se ha descrito la lisozima de pollo 5'MAR para mejorar significativamente la expresión transgénica estable en las células CHO.

20 Las MAR y STAR pueden ubicarse en cualquier lado de la secuencia de ADN a transcribir. Por ejemplo, los elementos pueden ubicarse de aproximadamente 200 pb a aproximadamente 1 kb, 5' del promotor y al menos aproximadamente 1 kb a 5 kb del promotor, en el extremo 3' del gen de interés. Además, más de un elemento puede ubicarse 5' del promotor o en el extremo 3' del transgén. Por ejemplo, dos o más elementos pueden colocarse 5' del promotor. El elemento o elementos en el extremo 3' del transgén pueden ubicarse en el extremo 3' del gen de interés, o en el extremo 3' de una secuencia reguladora 3', por ejemplo, una región 3' no traducida (UTR) o una secuencia flanqueante 3'. Los elementos de apertura de cromatina pueden estar flanqueando en ambos extremos del casete de expresión (Figura 4D), o colocados 5' del casete de expresión (Figura 4C). En particular, cuando además, deben introducirse múltiples casetes de expresión de las SPCBP y múltiples elementos reguladores tales como STAR y los UCO en los mismos plásmidos, existen limitaciones de tamaño y, preferentemente, se usan elementos que tienen actividad hacia ambos extremos del elemento, de manera que pueden proporcionarse en el medio de un casete de expresión (Figura 4C). Dado que se ha informado que las MAR funcionan además cuando se cotransfectan con el transgén en *trans* (Zahn-Zabel y otros (2001) J. Biotechnology 87: 29-42), tienen la ventaja de que ninguna etapa de clonaje de ADN se requiere para unirlos físicamente al (a los) casete(s) de expresión de SPCBP. En ese caso, el tamaño del elemento MAR o del vector de expresión que transporta los casetes de SPCBP ya no es una limitación. Sin embargo, se han descrito elementos MAR tan pequeños como 1,3 kb, así son posibles múltiples inclusiones en *cis*. Se ha informado además que las MAR se añaden tanto en *cis* como en *trans*, y en esta configuración aumentan 14 veces los niveles de expresión de anticuerpos en las células CHO. Otra función de estos elementos, además de su efecto sobre la estabilidad, es que además aumentarán el número de células transformadas independientemente que expresan la proteína y produce mayores cantidades de la proteína recombinante. El aislamiento y los niveles de producción de clones son en general más altos, así, en la modalidad preferida, esta invención se practica mediante el uso de estos elementos para preparar líneas celulares que produzcan múltiples SPCBP y sus bibliotecas.

45 Las modalidades preferidas son emplear por vector de expresión usado en la construcción de la biblioteca no más de 5 regiones codificadoras de proteínas de unión y preferentemente 3 por vector. Preferentemente, por plásmidos no contienen más de 3 promotores y 3 secuencias IRES y no más de 6 elementos STAR o MAR. Se prefiere limitar el tamaño del vector de expresión a 20 kb y si se requieren más de 5 proteínas de unión en la mezcla, y estas no pueden codificarse funcionalmente en un plásmido que es de un tamaño inferior a 20 kb, usar dos plásmidos diferentes. La ruta preferida para las bibliotecas con más de 5 proteínas de unión es usar dos conjuntos de vectores de expresión, y la ruta preferida se representa en la Figura 6.

55 Para construir la biblioteca se prefiere que la SPCBP de partida muestre valores de afinidad para la unión a su objetivo de al menos 1 micromolar, preferentemente al menos 100 nanomolar, preferentemente al menos 10 nanomolar, y preferentemente entre 0,1 y 10 nanomolar. Un epítipo objetivo para una SPCBP es la región en el objetivo que se reconoce o une con la SPCBP. Dos o más SPCBP pueden tener epítopos objetivo superpuestos pero diferentes, por ejemplo, si las proteínas de unión compiten por unirse entre sí pero muestran una química de sitio de unión diferente para el reconocimiento del objetivo debido al uso de diferentes aminoácidos en el sitio de unión. Por ejemplo, dos SPCBP que reconocen a TNF y neutralizan esta citocina y compiten entre sí para unirse al TNF, se definen que reconocen diferentes epítopos objetivo en TNF si los aminoácidos que se localizan en o cerca del sitio de unión de la SPCBP son diferentes entre las dos SPCBP.

60 Las bibliotecas contienen preferentemente menos de 10 proteínas de unión que están presentes en preferentemente menos de 5 plásmidos diferentes, preferentemente entre 3 y 5 plásmidos diferentes. Las composiciones preferidas seleccionadas para la actividad óptima contienen mezclas de SPCBP con preferentemente no más de 10 proteínas de unión separadas. Se prefieren al menos dos y no más de 5 proteínas de unión separadas, y preferentemente tres

proteínas de unión separadas. Las bibliotecas preferentemente no tienen más de 100.000 clones celulares de tamaño, preferentemente entre 10 y 1.000 clones celulares de tamaño.

2.3.4 Tamizaje y análisis de mezclas de proteínas

La invención es adecuada además para el tamizaje de mezclas de proteínas que tienen una especificidad de unión definida. Los genes que codifican estos compuestos se introducen como una mezcla en una célula huésped como se indicó anteriormente (en la Figura 3, se proporciona un ejemplo de 3 proteínas SPCBP diferentes) y clones individuales que han integrado algunas o múltiples copias de los genes que codifican las diversas regiones variables expandidas. En una primera modalidad, se usa un ensayo de unión para tamizar estas bibliotecas. Como se describió anteriormente, aplicado a los anticuerpos, los sobrenadantes de las líneas celulares resultantes se tamizan para la reactividad hacia los diversos antígenos o en un bioensayo, como se describió el ELISA, el SPR, etcétera. Para este gran número de líneas celulares pueden tamizarse usando robots para manipular cultivos de tejidos y placas de ELISA. Además de la unión en un ensayo *in vitro*, se describe además, que las mezclas de las SPCBP se prueban en bioensayos y actividad funcional. Los siguientes ensayos se describen a modo de ejemplos, pero muchos más se aplicarán a esta etapa de tamizaje.

Las mezclas de las SPCBP se ensayan para la actividad funcional, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

Ensayos inmunológicos y de eficacia. Algunos ensayos funcionales pueden monitorear una actividad que depende de un brazo del sistema inmune. La mayoría de las SPCBP carecerán de las funciones efectoras mediadas por Fc, pero si se proporcionan, por ejemplo, mediante ingeniería genética del propio andamio, mediante combinación con otras SPCBP o con una región Fc o anticuerpo anti-SPCBP, son factibles los siguientes ensayos inmunológicos. Ensayos *in vitro* para la actividad del dominio efector de inmunoglobulina, por ejemplo, la actividad citotóxica se usa para detectar la capacidad de las SPCBP para administrar las funciones efectoras inmunes contra un objetivo. Por ejemplo, los ensayos de cultivo celular pueden usarse para evaluar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) mediada por una mezcla de SPCBP. Un ensayo ADCC se describe más abajo. El ensayo de liberación de Cr puede usarse para analizar la citotoxicidad mediada por células. Linfocitos de sangre periférica (PBL) se preparan como células efectoras, mientras que las células objetivo que expresan la molécula objetivo se cargan con ⁵¹Cr. Las células objetivo se lavan y después se siembran en una placa de microtitulación de fondo plano. Se agregan los PBL a las células objetivo en combinación con las SPCBP. La liberación máxima se determina mediante la adición de Tween-20 a las células objetivo, mientras que la liberación mínima se determina en ausencia de los PBL. Después de la incubación durante la noche, el ⁵¹Cr liberado en el sobrenadante se mide en un contador de centelleo. Los ensayos *in vivo* incluyen inyectar una mezcla de SPCBP en un animal, por ejemplo, un modelo animal de un estado enfermo. Por ejemplo, el animal puede ser un animal transgénico, por ejemplo, que expresa un oncogén en un tejido en particular. En otro ejemplo, el animal es un ratón con un xenoinjerto de células tumorales (por ejemplo, células tumorales humanas). La eficacia de la mezcla de SPCBP (u otro ligando) puede ensayarse mediante la comparación del tiempo, tamaño y número de tumores formados en comparación con los animales no tratados o tratados con control. En una implementación en la que el ratón xenoinjertado es un ratón desnudo, el ratón puede inyectarse con los PBL humanos para reconstituir el sistema inmunitario. Pueden controlarse además otros parámetros fisiológicos de la mezcla de SPCBP, que incluyen la inmunogenicidad, el aclaramiento, y así sucesivamente.

Ensayos de actividad celular. Otros ensayos de actividad celular incluyen las evaluaciones del pH celular y el flujo de calcio, y evaluaciones de un comportamiento celular, por ejemplo, apoptosis, migración celular, proliferación celular y diferenciación celular.

En la técnica se conocen numerosos ensayos de cultivo celular para la diferenciación y la proliferación. Algunos ejemplos son los siguientes:

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

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

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

Los análisis dependientes de células dendríticas (que identificarán, entre otras, proteínas expresadas por células dendríticas que activan las células T vírgenes) incluyen, sin limitación, los descritos en: Guery y otros, J. Immunol. 134:

536-544,1995; Inaba y otros, *Journal of Experimental Medicine* 173: 549-559,1991; Macatonia y otros, *Journal of Immunology* 154: 5071-5079,1995; Porgador y otros, *Journal of Experimental Medicine* 182: 255-260, 1995; Nair y otros, *Journal of Virology* 67: 4062-4069,1993; Huang y otros, *Science* 264: 961-965,1994; Macatonia y otros, *Journal of Experimental Medicine* 169: 1255-1264, 1989; Bhardwaj y otros, *Journal of Clinical Investigation* 94: 797-807, 1994; y Inaba y otros, *Journal of Experimental Medicine* 172: 631-640,1990.

Los ensayos para la proliferación de células T o timocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, Ed por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience (capítulo 3, -Tn vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3. 19; capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Takai y otros, *J. Immunol.* 137: 3494 3500, 1986; Bertagnolli y otros, *J. Immunol.* 145: 1706 1712,1990; Bertagnolli y otros, *Cellular Immunology* 133: 327-341,1991; Bertagnolli, y otros, *I. Immunol.* 149: 3778-3783,1992; Bowman y otros, *I. Immunol.* 152: 1756-1761,1994.

Los ensayos para la producción y/o proliferación de citocinas de las células de bazo, células de ganglios linfáticos o timocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M. y Shevach, E. M. In *Current Protocols in Immunology*. Coligan eds. Vol 1, págs. 3.12. 1-3.12. 14, John Wiley y Sons, Toronto. 1994; y Measurement of mouse and human interleukin gamma, Schreiber, R. D. In *Current Protocols in Immunology*, Coligan eds. Vol 1 pág. 6. 8. 1-6.8. 8, John Wiley y Sons, Toronto. 1994. Los ensayos para la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas y linfopoyéticas incluyen, sin limitación, los descritos en: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L. S. y Lipsky, P. E. In *Current Protocols in Immunology*. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1 pág. 6.3. 1-6.3. 12, John Wiley y Sons, Toronto. 1991; de Vries y otros, *J. Exp. Med.* 173: 1205 1211,1991; Moreau y otros, *Nature* 336: 690-692, 1988; Greenberger y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 2931-2938, 1983; Measurement of mouse and human interleukin-6, Nordan, R. In *Current Protocols in Immunology*. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1 pág. 6.6. 1 6. 6.5, John Wiley y Sons, Toronto. 1991; Smith y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 1857-1861, 1986; Measurement of human Interleukin-11, Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. y Turner, K. J. In *Current Protocols in Immunology*. Coligan eds. Vol 1 pág. 6.15. 1 John Wiley y Sons, Toronto. 1991.

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

Otros ensayos, por ejemplo, pueden determinar la actividad biológica con respecto al comportamiento de las células endoteliales, crecimiento de las células nerviosas, migración de las células nerviosas, espermatogénesis, oogénesis, apoptosis, angiogénesis, señalización endocrina, metabolismo de glucosa, metabolismo de aminoácidos, metabolismo del colesterol, eritropoyesis, trombopoyesis, y así sucesivamente.

Ensayos de unión celular. La funcionalidad de una mezcla de SPCBP puede usarse además, en un ensayo de unión celular. La mezcla de SPCBP puede marcarse unida a una población de células que incluye las células que presentan un objetivo reconocido por la mezcla de SPCBP. La población puede incluir además, células que no presentan el objetivo, o que presentan una molécula relacionada que es discriminada por la mezcla de SPCBP.

En un primer ejemplo, la mezcla de SPCBP se prueba usando el análisis por FACS. La mezcla de SPCBP se marca con un fluoróforo, ya sea directamente o usando un anticuerpo secundario y se une a las células. Después, las células se pasan a través de un aparato FACS para contar el número de células unidas por la mezcla de SPCBP. Las células pueden ponerse en contacto además con otro anticuerpo marcado con un fluoróforo que es detectable usando un canal diferente. La unión de la mezcla puede correlacionarse sobre la base de célula por célula con la unión de la mezcla de SPCBP (por ejemplo, usando un gráfico de dispersión 2D).

En un segundo ejemplo, la mezcla de SPCBP se ensaya usando inmunohistoquímica. La mezcla de SPCBP se pone en contacto con una sección histológica. La sección se lava y se detecta la mezcla de SPCBP unida, por ejemplo, usando métodos estándar.

En un tercer ejemplo, la mezcla de SPCBP se ensaya *in vivo*, por ejemplo, en un organismo de un sujeto. La mezcla de SPCBP se marca, por ejemplo, con un reactivo de contraste de NMR u otro reactivo localizable. La mezcla de SPCBP se administra al sujeto y, después de un intervalo apropiado, se detecta su localización dentro del sujeto, por ejemplo, mediante imagenología del organismo de un sujeto.

Cualquiera de los ensayos descritos anteriormente puede usarse para determinar la mezcla con la máxima eficacia óptima y, así, el clon celular que produce esta mezcla. Las mezclas de las SPCBP tienen efectos antagonistas, agonistas (o de activación) en ciertos ligandos, y los efectos son aditivos o sinérgicos en comparación con los componentes individuales. La mezcla puede contener una SPCBP que anula el efecto positivo ejercido por otras

SPCBP, por lo tanto, es importante tamizar las actividades funcionales netas en lugar de añadir la actividad de los compuestos individuales de la mezcla. La presencia de efectos aditivos y sinérgicos implica además que ciertas SPCBP que están por debajo de un cierto criterio de selección, cuando se prueban como compuestos individuales y que normalmente no se buscan, en combinación con otras SPCBP muestran un efecto biológico fuerte y significativo.

El uso preferido de las mezclas de SPCBP en enfermedades inflamatorias e infecciosas está en aplicaciones en las que los diferentes compuestos proteicos de la mezcla ejercen un efecto antagonista, como la inhibición de una interacción receptor ligando debido a un impedimento estérico o efectos indirectos tales como interferencia con el sitio de unión a ligando en el receptor o el sitio de unión a receptor en el ligando. Otros usos preferidos incluyen el uso de mezclas de SPCBP con más potencia o actividad por masa en comparación con los anticuerpos con dominios apareados tales como moléculas de scFv, Fab e IgG; tal potencia aumentada se debe a los efectos sinérgicos entre los componentes individuales de la mezcla. Se han descrito que los anticuerpos de dominio único son particularmente adecuados para reconocer los sitios de los cañones virales, además en particular, de los sitios conservados que normalmente están ocultos en el interior de la proteína del recubrimiento genéticamente variable del patógeno. Las aplicaciones preferidas, por lo tanto, incluyen la neutralización del virus y patógenos que son más fácilmente reconocidos por las SPCBP que por los anticuerpos con dominios apareados tales como las moléculas scFv, Fab e IgG. Similarmente, la inhibición de las enzimas es un uso preferido para las SPCBP. Dado que las SPCBP basadas en el andamio de la inmunoglobulina (dAbs, anticuerpos de camello) se producen en eucariotas inferiores a niveles más altos que los fragmentos de anticuerpos con dominios apareados tales como las moléculas scFv, Fab y de diacuerpo, el huésped de producción preferido para las mezclas de SPCBP basadas en tales andamios son las eucariotas inferiores tales como *Pichia pastoris*, *Hansenula Polymorpha* y *Saccharomyces cerevisiae*. Para la producción de mezcla de las SPCBP que se fusionan a dominios glicosilados, el huésped preferido es CHO.

En una modalidad, la biblioteca de células que expresa múltiples SPCBP que se asocian además con la superficie celular (ver anteriormente), está sujeta a la clasificación por FACS. Similarmente, la clasificación celular puede usarse para una clonación más rápida de clones celulares. Con respecto a FACS, las células se clasifican usando un clasificador de células activadas por fluorescencia (por ejemplo, un clasificador disponible de Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose California; ver además las patentes de Estados Unidos núms. 5.627. 037; 5.030. 002; y 5.137. 809). A medida que cada célula pasa a través del clasificador, un rayo láser excita los compuestos fluorescentes que están unidos a la célula. Un detector evalúa la cantidad de luz emitida por dichos compuestos fluorescentes, si está presente. La cantidad de marcador unido a cada célula se cuantifica y, si se detecta al menos un nivel fijo de cantidad de marcador, se genera un campo electrostático para desviar la célula de su ruta predeterminada. Así, las células desviadas se separan y se recogen. Como resultado, las células con baja o ninguna expresión de SPCBP pueden descartarse y las células que demuestran una expresión de SPCBP de alto nivel pueden recolectarse y cultivarse. La expresión de múltiples SPCBP puede detectarse en la misma célula huésped usando diferentes marcadores fluorescentes y análisis multidimensionales.

Para los anticuerpos, se ha descrito una correlación cuantitativa relativa entre los niveles de la superficie celular y la proteína secretada, una característica que se ha usado para seleccionar transfectantes de línea celular con niveles de expresión de anticuerpos mejorados (Brezinsky y otros, J. Immunol. Methods 277: 141-55). En una modalidad, las bibliotecas celulares de SPCBP se someten a clasificación FACS, después de que se han cultivado las células transfectadas tales como células CHO en un medio de baja permeabilidad. El medio de baja permeabilidad puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene aproximadamente el 40% de gelatina con o sin suero de ternera fetal. El medio de baja permeabilidad reduce la difusión de las proteínas secretadas en el cultivo, permitiendo de ese modo, que las proteínas secretadas se unan a la superficie de la célula CHO de la que se expresan en lugar de difundirse y unirse a otra célula. Las células se eliminan después de los medios de baja permeabilidad y se exponen a anticuerpos marcados que se unen selectivamente a una porción de las SPCBP secretadas que no se unen a la superficie de la célula. El anticuerpo marcado (que se une a la SPCBP secretada/asociada a la superficie puede conjugarse con un fluoróforo o un marcador metalizado. Las células se clasifican en función de la detección del anticuerpo marcado, por ejemplo, mediante el uso de la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o la clasificación celular magnética, respectivamente. Mediante FACS o la clasificación de células magnéticas, se detecta el nivel de las SPCBP secretadas y unidas a la célula CHO y se seleccionan las células que secretan altos niveles de las SPCBP, o las que expresan las SPCBP en una relación relativa específica.

Alternativamente, las células de la biblioteca se encapsulan en matrices de afinidad de microgotas en gel. En el primer caso, las células se incuban en una matriz específica para el producto secretado de interés. Los productos secretados se unen a la matriz de afinidad en la superficie de la célula secretora y posteriormente se marcan con los reactivos fluorescentes específicos para el análisis citométrico de flujo y la clasificación celular. La propia matriz se crea mediante la unión, por ejemplo, de un anticuerpo de captura específico avidinilado a la superficie celular previamente biotinilada. El uso de un medio de baja permeabilidad (como antes) impide la alimentación cruzada del producto (Frykman y otros, 1998, Biotechnol Bioeng 59: 214-226 y Holmes y Al-Rubeai, 1999, J. Immunol. Methods 230: 141-147). En otro enfoque, se usan microgotas de gel (como en Gray y otros, 1995, J. Immunol. Methods 182: 155-63). En dicho sistema, las células de la biblioteca se encapsulan individualmente en perlas de agarosa que contienen reactivos de captura específicos. Las células se cultivan durante un corto período de tiempo mientras producen las SPCBP y las perlas se recolectan y clasifican en un citómetro de flujo.

Una vez establecida una relación óptima, se determina la presencia de proteínas de unión individual en esta mezcla de la siguiente manera. La identidad de la SPCBP se revela mediante un ensayo de unión, si todos los genes de SPCBP de entrada codifican proteínas que se unen a diferentes objetivos y los objetivos están disponibles para la prueba. Al carecer de algunos o todos los objetivos para el ensayo de unión, la identidad se determina analizando la presencia de los genes de SPCBP en el genoma de la célula huésped, por ejemplo mediante transferencia de membrana tipo Southern o mediante PCR con sondas y oligonucleótidos específicos de SPCBP, respectivamente. Alternativamente, el ADN que codifica los genes de SPCBP puede recuperarse mediante la amplificación con los oligonucleótidos diseñados para unirse a todos los genes de SPCBP, y el material se clona y se secuencian. En otra modalidad, se preparan reactivos específicos de SPCBP (ver el Ejemplo 5) y las pruebas de unión de 'sustitutos' empleadas para este análisis. Así, la invención proporciona muchos métodos para tamizar rápidamente cientos de mezclas de diferentes mezclas de proteínas.

2.3.4. Purificación mezclas de proteínas

Tradicionalmente antes de su uso para la terapia humana, los fármacos proteicos se expresan y se purifican hasta la homogeneidad, que consiste en una especie molecular principal. En algunos casos, la terapia es más eficaz con combinaciones de proteínas u otros fármacos. Esta invención describe métodos para preparar una mezcla proteica que contendrá al menos dos especies moleculares principales, compuestas por al menos dos SPCBP. La fabricación a gran escala de la mezcla proteínica es un requisito previo para su uso clínico, y un procedimiento de purificación simple es una característica importante del proceso de desarrollo. Para purificar proteínas biofarmacéuticas y, en particular, anticuerpos, el material de grado de investigación se purifica frecuentemente mediante el uso de cromatografía de afinidad de antígeno. Dado que esto a escala industrial y para la producción biofarmacéutica no es una opción comercial, y en particular para las mezclas de SPCBP que reconocen objetivos múltiples, puede no ser una ruta comercialmente viable para las mezclas de proteínas terapéuticas, una modalidad preferida de esta invención es usar métodos de purificación que no se hacen dependientes del antígeno u objetivo que se reconoce por el componente o los componentes de SPCBP. En una modalidad, los genes que codifican los componentes de los dos compuestos proteicos se coexpresan en la misma célula huésped y las diferentes especies moleculares principales que se presentan en la mezcla y tienen una especificidad de unión funcional purificada usando técnicas bioquímicas/biofísicas bien conocidas en la técnica. En una modalidad, el método se usa para preparar una mezcla de un número definido de proteínas de unión en una relación seleccionada. En una modalidad, las principales especies moleculares que comprenden una o más especificidades de unión diferentes comparten una proporción mínima de su información genética de codificación (por ejemplo, una región Fc, una etiqueta común u otro dominio o característica compartida); dicha característica compartida proporcionará un mecanismo/ensayo común para seguir los compuestos individuales en la mezcla. En otra modalidad, las principales especies moleculares se copurifican preferentemente debido a un comportamiento biofísico/bioquímico similar que surge debido a una homología entre los ácidos nucleicos que codifican las diversas SPCBP. Por ejemplo, algunas moléculas químicas como las inmunoadhesinas muestran un dipolo de carga debido a los diferentes pI de un dominio frente al otro (Wurm y otros, in *Antibody Fusion Proteins*, pág. 281; Ed. Wiley, Nueva York, 1999). Tales moléculas no se comportarán de manera ideal con técnicas de separación basadas en la carga iónica. Las SPCBP en la mezcla se relacionan preferentemente entre sí mediante la secuencia y preferentemente se basan en el mismo andamio de la proteína. Aunque su sitio de unión será diferente, la estructura general, la distribución de carga y el tamaño de dichas moléculas serán muy similares. Por lo tanto, se prefieren las regiones de codificación de SPCBP que tienen una homología de secuencia de al menos 70%. Además, en la modalidad preferida, las SPCBP en la mezcla tienen preferentemente valores de pI que no difieren en más de 2 unidades de pH.

La invención se refiere además a las mezclas biofarmacéuticas producidas usando este método. Los métodos para la purificación de proteínas son bien conocidos en la técnica e incluyen cromatografía de afinidad basada en matrices de proteína A, proteína G, proteína L, albúmina y otras sustancias, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC, para proteínas de unión con etiquetas de histidina) cromatografía en gel tiorfílico, filtración en gel preparativa, FPLC y HPLC, cromatografía de intercambio iónico, etcétera. Además, es aplicable la distribución a través de la extracción en dos fases acuosa o recuperación por cromatografía en lechos expandidos. Preferentemente, los compuestos proteínicos comparten características fisicoquímicas, de manera que pueden copurificarse usando los mismos procedimientos. La razón de esto es que, dado que para las aplicaciones terapéuticas se requieren frecuentemente, múltiples etapas de purificación, una modalidad preferida de la invención es usar proteínas de unión que tienen una homología de secuencia mínima del 70% de manera que puedan usarse los mismos métodos de purificación fisicoquímicos para purificar todas las proteínas de unión en la mezcla. Ejemplos de ello son el uso de proteínas de unión que se unen todas a los ligandos de matrices de afinidad genéricas tales como la proteína A (muchos dAb humanos que contienen un segmento VH humano se unen a la proteína A (Akerstrom, B. y otros (1994) *J Immunol Methods* 177: 151-163)), o proteína L (para dominios VL humanos, (Holt, L. J. y otros (2003) *Trends Biotechnol* 21: 484-490.)), o la albúmina (ciertas variantes de anticuerpos), o para usar un anticuerpo o anticuerpos seleccionados a la medida u otra proteína o proteínas de unión que reconocen todas las proteínas de unión en la mezcla. Se han descrito métodos para proporcionar sitios genéricos de ligando de unión en todos los miembros de una biblioteca de proteínas de unión (documento de patente WO9920749A1).

La homología de secuencia entre los ácidos nucleicos que codifican las cadenas polipeptídicas individuales de las proteínas de unión minimiza el número de etapas de la purificación requerida para obtener el componente activo de la mezcla de proteínas y proporciona un medio para recuperar de manera simultánea las diferentes proteínas de unión de las proteínas de unión de la misma fuente de célula huésped recombinante. Por ejemplo, las unidades de unión de un

dominio único, tales como los dominios variables derivados de camélidos, se producen fácilmente y convenientemente en huéspedes eucariotas inferiores como se describió anteriormente y en el documento de patente núm. WO94/25591 (Unilever), en sistemas de producción y purificación sintonizados hacia el producto SPCBP particular. Si el andamio base para un conjunto de las SPCBP es idéntico, son altas además, las probabilidades de que serán similares muchas características de las proteínas de unión en la mezcla que se determinan con este andamio. Por ejemplo, muchas VHH son extremadamente estables al calor, lo que permite la pasteurización u otros tratamientos con calor sin pérdida de la capacidad de unión al antígeno de mezclas de tales VHH. Cuanto mayor sea el porcentaje de homología entre las SPCBP, mayor será la probabilidad de que las proteínas compartan características fisicoquímicas similares, y que estas proteínas puedan copurificarse con múltiples métodos. Preferentemente, las proteínas comparten una homología del 70%, con mayor preferencia del 80%, preferentemente del 90%. Preferentemente, las regiones dentro del andamio de la SPCBP que no se usan como sitio permisivo en la construcción de la biblioteca son 85% homólogas, preferentemente 95%. El porcentaje de homología se determina ya sea clasificando en el ácido nucleico las diferencias entre las regiones codificantes de SPCBP, o sus partes, o por métodos empíricos, por ejemplo mediante experimentos de hibridación en los que una región codificante de SPCBP o parte de esta se usa como sonda para determinar en condiciones de rigurosidad establecidas si se hibrida con las otras regiones codificantes de SPCBP. Estos métodos se han descrito ampliamente en la técnica.

Se prefiere, además, un método simple de purificación antes de realizar muchos bioensayos. Así, será necesario algunas veces eliminar los contaminantes que interfieren con el bioensayo, y/o concentrar las proteínas de unión en la mezcla antes del ensayo.

El tamizaje de la biblioteca y la composición identifica ciertas mezclas óptimas de las SPCBP asociadas con un formato de expresión particular y las líneas celulares que producen tal mezcla óptima. En una modalidad, la información que se genera usando los métodos y composiciones de la invención se utiliza para desarrollar una línea celular o célula o línea celular de producción, por ejemplo, que producen una mezcla equivalente de las SPCBP. En otra modalidad, las células que expresan SPCBP con composiciones seleccionadas, ya sea como células completas o como ácido nucleico que contienen fragmentos de estas, se usan para producir una célula de producción que expresa las regiones codificantes de SPCBP. Por ejemplo, la fusión celular se usa para combinar las características de la célula de producción con las de la célula que expresa SPCBP.

3. Aplicaciones de las composiciones de mezclas de SPCBP

La mayoría de los experimentos hasta la fecha se han realizado con anticuerpos, y en particular, con anticuerpos monoclonales. La siguiente sección describe las aplicaciones de la mezcla de proteínas, ejemplificadas con el uso de MoAb, pero de manera similar, pueden contemplarse mezclas de las SPCBP. Para muchas aplicaciones terapéuticas se ha contemplado el uso de proteínas de unión que reconocen diferentes epítomos combinados en una molécula. Por ejemplo, las moléculas dirigidas a dos objetivos diferentes, tales como una célula cancerosa y un linfocito efector, que se desarrollan en el campo de la inmunoterapia del cáncer (Repp, R. y otros (2003) Br J Cancer 89: 2234-2243.). Las proteínas de unión únicas se han combinado a través de la tecnología recombinante para proporcionar reactivos biespecíficos, usando fusión directa o fusión a dominios de multimerización. Sin embargo, particularmente, las proteínas de fusión producidas de forma recombinante han mostrado limitaciones importantes en su estabilidad, por ejemplo, debido a la degradación proteolítica y frecuentemente, muestran niveles de expresión reducidos en comparación con los componentes individuales. En comparación con los anticuerpos monoclonales y los interferones, por ejemplo, su desarrollo biofarmacéutico, frecuentemente, es un proceso largo, más arriesgado y mucho más difícil. Además, no siempre es conveniente retener un enlace físico entre los sitios de unión y obtener múltiples proteínas de unión tales como entidades separadas no asociadas con otras proteínas de unión en la mezcla. Se utiliza en nuestra invención cócteles de proteínas de unión separadas que se producen en la misma célula. Una aplicación de esta invención es construir colecciones de proteínas de unión dirigidas al mismo objetivo, en las que las diferentes proteínas de unión reconocen diferentes epítomos en el objetivo. Otra aplicación de esta invención es construir colecciones de proteínas de unión dirigidas a epítomos en diferentes objetivos. A modo de ejemplo, se describen ejemplos en los que se han usado mezclas de anticuerpos; de manera similar a las mezclas de anticuerpos, existen aplicaciones para mezclas de diferentes SPCBP en el mismo objetivo o antígeno, para mezclas de diferentes SPCBP en diferentes objetivos o antígenos, para mezclas de las SPCBP en diferentes objetivos o antígenos en el mismo o diferente objetivo o antígeno.

55 *Virus neutralizantes*

Las mezclas de MoAb antivirales aumentan la eficacia clínica del tratamiento en comparación con la terapia MoAb. Además, se reduce la probabilidad de aparición de mutantes de escape viral y la probabilidad de resistencia viral con la terapia prolongada. Se incluyen anticuerpos que se unen a múltiples epítomos o subtipos diferentes del virus. Pueden usarse anticuerpos antivirales dirigidos a epítomos lineales, que son menos propensos al efecto de los mutantes de escape que los anticuerpos dependientes de la conformación. El efecto de las múltiples especificidades de unión presentes en la mezcla de anticuerpos proporciona una señal más fuerte para el aclaramiento viral que cuando se usa un MoAb.

65 Las mezclas de los MoAb han demostrado efectos superiores en la neutralización y eliminación de una serie de virus:

- 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Virus de inmunodeficiencia humana (HIV). La infección con HIV-1 conducirá al desarrollo del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) si no se trata. Durante la infección con HIV-1, se desarrollan anticuerpos neutralizantes que se dirigen contra diversos epítomos en las moléculas de glicoproteína de la envoltura de HIV-1 gp41 y gp120. En los últimos años, se han aislado y caracterizado extensivamente diversos anticuerpos monoclonales humanos contra el HIV. Estos MoAb se han probado independientemente y en combinación, en primates no humanos por su eficacia en el bloqueo de la transmisión viral del HIV. En un ensayo clínico publicado en 1992, la administración de plasma de seropositivo para HIV-1 que contenía altos títulos de anticuerpos neutralizantes de HIV, se asoció con una reducción de la viremia del HIV-1 y una serie de infecciones oportunistas. Posteriormente, varios grupos publicaron que la administración de plasma de seropositivo para HIV-1 resulta en el retraso del primer evento definitorio del SIDA y la mejora de los síntomas clínicos. Sin embargo, el entusiasmo por la inmunoterapia pasiva disminuyó cuando se descubrió que los anticuerpos no eliminaron el virus y resultó en la aparición de variantes de escape de neutralización en los pacientes. Se demostró que los anticuerpos que se inducen durante la infección natural por el HIV-1 neutralizan de manera pobre el virus, dando como resultado una baja potencia de suero hiperimmune usado para la inmunoterapia pasiva de la infección por HIV-1. Además, se demostró que algunos anticuerpos que surgen durante la infección natural pueden incluso mejorar la infección. Se observó que para la terapia de anticuerpos del HIV-1, se necesitaban anticuerpos monoclonales neutralizantes potentes y bien caracterizados. Estos hallazgos iniciales estimularon el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos contra las glicoproteínas de la envoltura del HIV-1. En los últimos años, se han aislado y caracterizado una serie de anticuerpos monoclonales humanos contra las glicoproteínas de la cubierta viral gp41 y gp120 de HIV-1 por su actividad neutralizante del virus *in vitro*. Experimentos posteriores en modelos de primates no humanos de infección por HIV y transmisión han demostrado que los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos a diferentes epítomos de la glicoproteína de la envoltura del HIV-1 exhiben una fuerte sinergia cuando se usan en combinación. Se ha sugerido que las combinaciones de anticuerpos monoclonales anti-HIV humanos pueden explotarse clínicamente para la inmunoprofilaxis pasiva contra el HIV-1. Estos experimentos demuestran inequívocamente que las mezclas de 3-5 MoAb anti-HIV evitan eficientemente la transmisión del HIV peri y postnatal.
- Virus de la rabia. La rabia es una enfermedad neurológica aguda causada por la infección del sistema nervioso central con el virus de la rabia. Casi invariablemente fatal una vez que aparecen los síntomas clínicos, el virus de la rabia continúa siendo una amenaza importante de infección humana y veterinaria debido a los extensos reservorios en diversas especies de vida silvestre. Para la inmunoterapia pasiva, se usa IgG del suero mezclado de individuos inmunes a la rabia o caballos inmunizados; la inmunoglobulina antirrábica es costosa y escasea o no existe. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones y métodos para producir mezclas de anticuerpos, preferentemente anticuerpos humanos, para usar en inmunoterapia pasiva de infecciones de Rabia. Se ha demostrado que una mezcla de tres MoAb humanos es tan efectiva como la Ig policlonal antirrábica humana para proteger a los ratones contra una infección letal de la rabia.
- Virus de la Hepatitis B. Las vacunas HBV recombinantes proporcionan un medio seguro y eficaz para la prevención del VHB que confiere inmunidad a largo plazo mediante la inmunización activa. A diferencia de la lenta aparición de protección después de esta vacunación, la inmunoterapia pasiva con anticuerpos contra el HBV proporciona protección inmediata pero a corto plazo contra la transmisión e infección viral. El tratamiento de la infección crónica por hepatitis B con los fármacos antivirales se caracteriza por la falta de aclaramiento del virus, la pérdida de respuesta o la aparición de mutantes resistentes a los fármacos. Se ha demostrado la importancia de los anticuerpos neutralizantes en el aclaramiento de la infección viral persistente y la combinación de tratamientos de fármacos quimioterapéuticos y anticuerpos conduce a un efecto terapéutico adicional. Se cree que los anticuerpos inhiben la infección bloqueando al HBV para entrar en las células. Dicha inmunoterapia pasiva es recomendable para las personas que estuvieron expuestas al material positivo a HBV (lesiones por aguja o corte) y para los recién nacidos cuyas madres son portadoras de HBV, para pacientes sometidos a un trasplante de hígado. En la actualidad, este tratamiento se lleva a cabo con inmunoglobulina de hepatitis B, una preparación de anticuerpo policlonal derivada de plasma obtenido de donantes que tuvieron anticuerpos positivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B. La disponibilidad de este suero es limitada y las preocupaciones adicionales por el precio y la seguridad con respecto al uso de productos sanguíneos, hacen necesario el desarrollo de un tratamiento alternativo. Un anticuerpo monoclonal humano puede ser ventajoso al presentar una fuente estable y reproducible para la inmunoterapia prolongada. Sin embargo, los estudios demuestran que un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno S y con capacidad neutralizante contra el HBV en los chimpancés retrasó pero no previno la infección con HBV. En parte, esto puede provocarse por la aparición de variantes de escape, mutantes en el antígeno S que ya no pueden unirse al anticuerpo monoclonal. Similarmente, los mutantes de escape surgen en los pacientes después del trasplante de hígado en los ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales. Por lo tanto, el tratamiento con un solo anticuerpo monoclonal puede ser ineficaz e insuficiente. Se probaron dos MoAb humanos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en un modelo murino y de chimpancé de infección crónica por hepatitis B (Eren, R. y otros, (2000) *Hepatology* 32: 588-596). La administración de una mezcla de estos dos anticuerpos en ambos modelos resultó en una reducción inmediata de la carga viral. La combinación de anticuerpos funcionó mejor, tanto en la reducción de la carga viral como en la inhibición de la infección hepática, después de una preparación de anticuerpos policlonales comerciales a partir de suero humano mezclado. La mezcla de dos anticuerpos se ha probado en un ensayo clínico de Fase I en pacientes con infecciones crónicas de HBV y se ha demostrado que son seguros y

reducen la carga viral y los niveles del antígeno de superficie de la hepatitis B (Galun, E. (2000) Hepatology 35: 673-679).

- En general, para las enfermedades virales, el ensamblaje funcional de mezclas de las SPCBP antivirales puede aumentar la eficacia clínica del tratamiento en comparación con la terapia monoclonal, al disminuir la probabilidad de mutantes virales de escape resistentes al tratamiento y al reducir la probabilidad de la resistencia viral con la terapia prolongada. En la mezcla, pueden incluirse los anticuerpos que se unen a muchos epítomos diferentes del virus. Es factible además, incluir anticuerpos para los diferentes subtipos del virus, para ampliar la utilidad del fármaco en una población de pacientes más amplia. Pueden agregarse otras SPCBP antivirales dirigidos a los epítomos lineales, que son menos propensos al efecto de los mutantes de escape que las SPCBP dependientes de la conformación. El efecto de las múltiples especificidades de unión presentes en la mezcla de SPCBP puede proporcionar una señal más fuerte para el aclaramiento viral que cuando se usa un anticuerpo monoclonal. Esencialmente, hay aplicaciones además para mezclas de un sitio de unión con diferentes especificidades finas para unir su antígeno. Por ejemplo, cuando el antígeno es propenso a la mutación como es el caso de muchos antígenos virales, en el curso de un tratamiento, el epítomo en el antígeno puede alterarse de manera que se pierde la unión de una primera proteína de unión. Al usar una mezcla, por ejemplo, basada en el mismo andamiaje pero con cambios mínimos con respecto a la primera y con la actividad de unión similar, pero que proporciona un intervalo de alteraciones de aminoácidos en el sitio de unión, existe la posibilidad de que las mutaciones afecten la unión de algunas especies en la mezcla, pero no de otras con una química de unión diferente y resistencia aun similar. En tal caso, será preferible usar distintas químicas de unión para la interacción con el antígeno, por lo tanto, el SPCBP debe estar lo menos relacionado posible en secuencia.

Toxinas neutralizantes

La inmunización pasiva se ha establecido desde hace mucho tiempo como un valioso enfoque profiláctico y terapéutico contra las toxinas. A pesar de disminuir la aceptación general debido a la prevalencia de enfermedades infecciosas entre los donantes de plasma y de los requisitos de control de seguridad y eficacia exagerados impuestos a los fabricantes por las autoridades reguladoras, las preparaciones convencionales de anticuerpos policlonales derivados del plasma en muchos casos siguen siendo los únicos productos disponible para los pacientes.

- Toxina tetánica (Lang, A. B. y otros, (1993) J. Immunol. 151: 466-472). Se demostró que una mezcla de tres MoAb humanos anti-toxide tetánico actúa sinérgicamente y proporciona protección completa contra la toxina en un modelo animal. Solo 0,7 mg de la mezcla de anticuerpo monoclonal humano dio la misma potencia que 170 mg de antisuero policlonal humano comercialmente disponible usado para la inmunización pasiva.
- Toxina botulínica (Nowakowski, A. y otros Proc. Natl. Acad. Sci. 2002,99, 11346-11350). Las toxinas botulínicas causan el botulismo, la enfermedad humana paralítica, y son uno de los agentes de alto riesgo para el bioterrorismo. Tres MoAb diferentes generados contra una de las toxinas no neutralizaron significativamente la toxina como agentes únicos. En contraste, las combinaciones de dos MoAb la bloquearon a las dosis de 20 veces la LD50. Una combinación de tres MoAb neutralizó 450 000 dosis letales del 50% de la toxina en experimentos con animales: una potencia 90 veces mayor que la globulina hiperinmune humana. Es importante destacar, que se encontró que la mezcla de los anticuerpos causó un gran aumento en la avidez de unión funcional. Estos estudios demuestran que la potencia de la respuesta inmune policlonal natural puede desplegarse en solo tres anticuerpos, lo que sugiere que se pueden esperar actividades igualmente potentes a partir de las mezclas de SPCBP que comprenden solo un número limitado de anticuerpos.

Destrucción de células tumorales

La destrucción de las células tumorales mediada por anticuerpos involucra una serie de mecanismos diferentes. La unión de anticuerpos a la superficie de la célula tumoral puede reclutar componentes del sistema del complemento y/o células efectoras inmunes que atacan a las células malignas. Se supone que estos procesos de destrucción se benefician de una alta densidad de moléculas de anticuerpos en la superficie celular. Puede lograrse una alta densidad de anticuerpos unidos a la superficie celular al dirigir moléculas que se regulan positivamente en la superficie de la célula tumoral. De hecho, los exitosos MoAb antitumorales Herceptin y Rituximab se unen a objetivos tumorales altamente expresados y se cree que esto es fundamental para su eficacia. Puede lograrse además, una alta densidad de anticuerpos unidos a la superficie celular dirigiendo múltiples moléculas sobre la superficie de la célula tumoral. Los objetivos individuales no necesitan ser altamente expresados ya que múltiples objetivos contribuyen a la decoración de anticuerpos de alta densidad. Así, los objetivos tumorales que se han considerado subóptimos para la terapia de anticuerpos son valiosos en el contexto de una mezcla de proteínas de unión.

La unión de anticuerpos a la superficie de la célula tumoral puede ejercer además un efecto directo, tal como la inducción de la apoptosis (muerte celular programada). Los procesos que gobiernan la apoptosis inducida por anticuerpos no se comprenden completamente, pero se ha demostrado que el entrecruzamiento de orden superior de muchas moléculas de superficie celular diferentes induce la apoptosis. Similarmente a algunos fragmentos de anticuerpos monovalentes, algunas mezclas de SPCBP inducen de manera eficiente la apoptosis.

- Cáncer de mama (Spiridon, C. I. y otros, Clin. Can. Res. 2002: 8,1720-1730). Herceptin™ es un MoAb humanizado registrado para el tratamiento de mujeres con carcinoma de mama que sobreexpresan el receptor Her-2/neu. En estudios preclínicos, se ha demostrado que una mezcla de tres MoAb contra diferentes epítomos

del receptor Her-2/neu demostró ser más potente que los MoAb individuales para prevenir el crecimiento tumoral en estudios de animales.

- Linfoma de no-Hodgkin (NHL). Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une a la molécula CD20 sobreexpresada en los tumores de células B, incluyendo NHL. Recientemente, Amgen ha iniciado ensayos clínicos de Fase II combinando epratuzumab, su anticuerpo monoclonal humano anti-CD22 con rituximab. Igualmente que CD20, CD22 es una molécula de superficie celular expresada por las células B y tumores de células B. Aunque el ensayo aún está en curso, los datos disponibles muestran que la terapia de combinación de los dos MoAb es segura y aumenta el número de pacientes respondedores y las remisiones completas. Estos resultados muestran que la combinación de dos MoAb aumenta la potencia del tratamiento antitumoral como se midió con los términos clínicos objetivos.

Citocinas neutralizantes

El factor de necrosis tumoral alfa de la citocina proinflamatoria (TNF- α) está implicado de manera crítica en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas. Los MoAb contra el TNF- α se usan actualmente para el tratamiento de la artritis reumatoide (RA) y la enfermedad de Crohn y, desde el punto de vista clínico y comercial, pertenecen a los biofarmacéuticos más exitosos generados por la industria de la biotecnología.

La interleucina 1 (IL-1) es otra citocina que juega un papel dominante en la mediación de la progresión de la RA. IL-1 parece ser principalmente responsable de la destrucción del cartílago, mientras que el TNF- α es un importante mediador de la reacción inflamatoria. Se ha demostrado en modelos animales que el bloqueo ya sea de TNF- α o IL-1 controla parcialmente la RA, mientras que la combinación de moléculas anti-TNF- α y anti-IL-1 logra una eficacia superior (Feige, U. y otros, (2000). *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1457-1470). Así, pueden desarrollarse mezclas de sitios de unión que bloquean simultáneamente TNF- α e IL-1 u otras combinaciones de citocinas que interfieran en dos vías patológicas aparentemente independientes en las enfermedades inflamatorias crónicas tal como RA.

Aunque los datos aún son escasos, se ha demostrado que las combinaciones de MoAb anti-TNF neutralizan sinérgicamente el TNF a través de los efectos complementarios de los mecanismos de bloqueo de TNF competitivo y alostérico. Así, las proteínas de unión anti-TNF cooperativas presentes en las mezclas de SPCBP neutralizarán con mayor eficiencia, resultando en una reducción de la dosificación y el costo.

Así, las mezclas de las SPCBP son adecuadas para luchar contra patógenos que incluyen virus como el HIV y la rabia, bacterias, hongos y parásitos. Otros ejemplos en los que actualmente se usa un suero policlonal o gamma-globulina que puede reemplazarse con una mezcla de SPCBP definida, incluyen enfermedades tales como la rabia, la hepatitis, el virus de la varicela-zóster, el herpes o la rubéola. Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse con mezclas de SPCBP incluyen las meningitis, las enfermedades causadas por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Hemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas* y *Actinomicetos*. Los objetivos incluyen además los implicados en la sepsis bacteriana, como el lipopolisacárido (LPS), el lípido A, el factor de necrosis tumoral alfa o las proteínas de unión a LPS. Algunos de estos patógenos poseen múltiples serotipos y no uno, por lo que se requieren múltiples SPCBP para neutralizar los diversos serotipos. Una mezcla de SPCBP proporcionará, mediante la elección de las especificidades de unión, una cobertura más amplia de los serotipos que se tratan y, por lo tanto, se pueden tratar más pacientes con la misma mezcla de SPCBP. Por esta y otras razones, las mezclas pueden formar además diagnósticos adecuados y parte de estuches de diagnóstico para la detección de una enfermedad o trastorno en los pacientes.

Las mezclas de las SPCBP pueden ser más efectivas que los anticuerpos monoclonales además en el tratamiento de enfermedades oncológicas como el linfoma no Hodgkin (NHL) y tumores de células epiteliales como el carcinoma de mama y de colon. Ya se ha demostrado que apuntar CD20 y CD22 en el NHL con anticuerpos puede ser más efectivo que apuntar las células tumorales con los anticuerpos individuales. Antígenos objetivo adecuados para mezclas de las SPCBP en las enfermedades oncológicas son muchos, incluyendo CD19, CD20, CD22, CD25 (receptor de IL-2), CD33, el receptor de IL-4, receptor de EGF, receptor de EGF mutante, antígeno de carcinoma embrionario, antígeno específico de próstata, ErbB2/HER2, carbohidrato Lewis^Y, mesotelina, Mucina-1, el receptor de la transferrina, el antígeno de membrana específica de la próstata, el VEGF y los receptores, EpCAM y CTLA-4. En particular para aquellos antígenos que al apuntarse con una mezcla de SPCBP pueden modularse sin depender necesariamente de la función efectora mediada por la región Fc del anticuerpo, esto será útil. Los ejemplos incluyen el bloqueo eficiente de múltiples interacciones entre ligandos y receptores, o de interacciones entre receptores y apareamientos tales como en la familia de receptores EGFR, o la inducción de efectos agonistas en los receptores, o la inducción de apoptosis. Pueden observarse efectos sinérgicos cuando se usan mezclas de las SPCBP que se unen a diferentes objetivos y vías en la enfermedad, tales como las SPCBP con efectos antiangiogénesis y antiproliferativos. Además existen aplicaciones en este campo para una mezcla de las SPCBP esencialmente muy relacionadas que se unen a un epitopo objetivo pero con químicas de unión ligeramente diferentes que se traducen en diferentes afinidades por la unión al antígeno. Esta mezcla es, por ejemplo, una SPCBP aislada combinada con sus variantes de mutación puntual con afinidades alteradas (mejoradas o reducidas). La eficacia de la penetración del tumor sólido *in vivo* está limitada para los anticuerpos de alta afinidad debido a la barrera del sitio de unión, aunque se requiere una afinidad mínima para lograr una acumulación sustancial en el tumor. Con los métodos descritos en este documento, puede establecerse una mezcla de las SPCBP. Tales mezclas pueden usarse para aumentar la acumulación en el tumor, y el mejor cóctel equilibrado se encuentra al

elegir los componentes y sus niveles de expresión. Tales mezclas son preferentemente más activas que los componentes individuales, y actúan sinérgicamente.

5 Las mezclas de las SPCBP son adecuadas además para neutralizar múltiples objetivos diferentes, por ejemplo en el campo de las enfermedades inflamatorias, donde múltiples factores se involucran de una manera u otra al mediar la enfermedad o agravar sus síntomas. Los ejemplos de estas enfermedades son la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, la diabetes dependiente de insulina, la mellitus y la psoriasis. El tratamiento óptimo de muchas de estas enfermedades implica la neutralización o inhibición de agentes patológicos circulantes y/o aquellos en la superficie de las células dirigidas a la respuesta inflamatoria específica en el paciente. En las enfermedades autoinmunes e inflamatorias, los objetivos adecuados, generalmente, son los interferones, las citocinas, las interleucinas, las quimiocinas y los marcadores específicos en las células del sistema inmune, y en particular, el interferón alfa, el receptor de interferón alfa, el interferón gamma, el receptor de interferón gamma, el factor de necrosis tumoral alfa, el receptor del factor de necrosis tumoral, el receptor de antígeno de HLA clase II, la interleucina-1 beta, el receptor de interleucina-1 beta, la interleucina-6, el receptor de interleucina-6, la interleucina-15, el receptor de interleucina-15, la IgE o su receptor, el CD4, el CD2 y el ICAM-1.

20 Las mezclas son adecuadas además para la neutralización de los efectos mediados por los agentes de la guerra biológica, incluidas toxinas tales como la neurotoxina botulínica derivada de Clostridium botulinum, el ántrax, la viruela, los virus de la fiebre hemorrágica y la plaga. La neutralización de las toxinas botulínicas se analiza en la presente como un ejemplo. Las toxinas botulínicas, las sustancias más venenosas conocidas, causan el botulismo, la enfermedad humana paralítica, y son uno de los agentes de amenaza de alto riesgo del bioterrorismo. El anticuerpo neutralizante de la toxina puede usarse para la profilaxis previa o posterior a la exposición o para el tratamiento. Existen pequeñas cantidades tanto de la antitoxina equina como de la inmunoglobulina botulínica humana y actualmente se usan para tratar el botulismo en adultos e infantes. El anticuerpo monoclonal recombinante podría proporcionar un suministro ilimitado de antitoxina sin riesgo de enfermedad infecciosa y no requiere de donantes humanos para la plasmáfesis. Se generó un panel de anticuerpos monoclonales humanos y murinos a partir de los linfocitos B de donantes hiperinmunes y ratones inmunizados usando la tecnología de presentación de anticuerpos en el fago. Se probaron anticuerpos monoclonales simples y combinaciones para determinar su capacidad de proteger a los ratones de las dosis letales de la neurotoxina (Nowakowski, A. y otros, (2002) PNAS 99: 11346-11350.). Mientras que los anticuerpos monoclonales simples no mostraron una protección significativa en los ratones contra dosis letales de toxinas, las combinaciones de solo tres anticuerpos monoclonales contra diferentes epítomos en la toxina ofrecieron una protección muy potente. La combinación de tres anticuerpos monoclonales neutralizó dosis letales de 450.000 de la toxina botulínica, una potencia 90 veces mayor que la globulina hiperinmune humana. Es importante destacar que la potencia de la mezcla de anticuerpos monoclonales se debió principalmente a un gran aumento en la afinidad de unión del anticuerpo funcional. Así, los métodos que permiten una producción rentable, controlada y eficiente de mezclas de las SPCBP contra la neurotoxina botulínica proporcionan una ruta para el tratamiento y la prevención del botulismo y otros agentes patógenos y agentes de amenaza biológica. Como se muestra en este estudio, una mezcla de tres anticuerpos que unen los epítomos no superpuestos sobre la neurotoxina botulínica, tuvo un efecto sinérgico en la neutralización de la toxina debido a una mayor avidéz total.

40 Las mezclas de proteínas de unión pueden aplicarse además, para retrasar la aparición de las respuestas antiidiotípicas en pacientes, proporcionando múltiples idiotipos de una familia de SPCBP, todos unidos al mismo objetivo, en los mutantes de aminoácidos del mismo SPCBP de forma más simple con una especificidad y afinidad de unión que resulta similar, a una mezcla más compleja de múltiples SPCBP dirigidos al mismo epítomo.

45 Pueden aplicarse además, mezclas de proteínas de unión para desarrollar derivados de las mezclas de proteínas, incluyendo inmunotoxinas, inmunoliposomas, versiones marcadas con radioisótopos, inmunoconjugados, conjugados anticuerpo-enzima para terapia profármaco (ADEPT) e inmunopolímeros (Allen, (2002) Nat Rev Cancer 2: 750-763). Las mezclas de los anticuerpos pueden modificarse por lotes con las sustancias apropiadas o fusionarse genéticamente a una toxina o enzima o gen que codifica el efector como se describe en la técnica para los anticuerpos monoclonales.

Ejemplos

55 Ejemplo 1. Vector de expresión de mamíferos para dirigir la coexpresión de dos anticalinas

Un punto de partida para preparar una mezcla de dos SPCBP mediante la expresión de un único vector de expresión de mamífero, es el plásmido pRRV (un derivado de VHEXpress y descrito en el documento de patente US20030224408A1). pRRV (Figura 7B) es un plásmido que se usa para la expresión de anticuerpos en el formato IgG, mediante la coexpresión de cadenas ligeras y pesadas bajo el control de un único promotor de CMV y las dos regiones codificantes separadas por una secuencia IRES. El plásmido contiene una serie de sitios de restricción únicos para la clonación de genes de SPCBP.

65 Dos genes de SPCBP se clonan mediante clonación direccional de las regiones codificantes en los sitios de restricción ApaLI & AscI y BssHII & BclI de pRRV. Como ejemplo, se describe la clonación de dos anticalinas, pero igualmente pueden clonarse otras SPCBP con el mismo procedimiento. Si se encuentran sitios internos para las enzimas de restricción en el gen de SPCBP de interés, pueden eliminarse rápidamente mediante mutagénesis dirigida al sitio. Las

dos anticalinas son las siguientes: AC-1: Lipocalina Flua modificada por ingeniería genética, una anticalina antilfluoresceína, seleccionada de una biblioteca de lipocalinas modificadas por ingeniería genética y cuya estructura en complejo con el antígeno se resolvió (pdb número 1NOS) (Korndorfer, I. P. y otros, (2003) *Proteins* 53: 121-129.). AC-2: DigA16 es una proteína de unión a digoxigenina artificial, que se derivó de la proteína de unión a la bilina, una lipocalina de *Pieris brassicae*, mediante la remodelación de su bolsillo de ligando natural. Se determinó a una resolución de 1.9Å, las estructuras cristalinas de DigA16 en presencia de digoxigenina o digitoxigenina y para la apoproteína (Korndorfer, I. P. y otros, (2003) *J Mol Biol* 330: 385-396.) Las reacciones de PCR se llevan a cabo con el molde de los genes AC-1 y AC-2, durante 25 ciclos, desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 60 segundos y elongación a 72°C durante 90 segundos, usando Taq ADN polimerasa (Promega, Madison, WI) con iniciadores que están diseñados para hibridar con regiones codificantes de 5' y 3', y este última proporciona además, un codón de terminación después del último codón que se traduce. Estos iniciadores incorporan además los sitios de enzimas de restricción que se localizan a ambos extremos y en el extremo 5' de los genes de manera que el marco de lectura se mantiene después de la clonación direccional de los genes en pRRV (como se indica en la Figura 7A). El producto resultante AC-1 se purifica, se digiere con las enzimas de restricción ApaI y AclI, y se clona en pRRV, resultando en p2-I-AC-1. La segunda región de codificación de AC-2 se amplifica después a partir de su molde para la clonación como un fragmento BssHII-XbaI. En los oligonucleótidos usados para la PCR, se proporcionan tanto las etiquetas poli-His como un codón de parada siguiendo las regiones codificantes de AC y antes de las posiciones AclI y XbaI para garantizar que la región codificante AC-1 y AC-2 se traduzcan correctamente como productos solubles, separados y pueden detectarse con anticuerpos poliHis. Los dos genes se clonan paso a paso en el vector, para producir el primer vector p2-I-AC1 y después el vector p2-I-AC1xAC2. La integridad de las secuencias se confirma mediante el uso del estudio de secuenciación de ciclos AmpliTaq (Perkin-Elmer, Foster City, EE. UU.) con iniciadores específicos basados en el esqueleto del vector justo adyacente a las inserciones que codifican anticalina; las secuencias de ADN de la inserción se verifican para mantener las secuencias correctas de las regiones codificantes de la anticalina y las uniones con el plásmido de expresión.

25 Ejemplo 2. Vectores de expresión para la coexpresión de 3 proteínas de VHH de camélidos

En este ejemplo, se describen los vectores de expresión para la expresión simultánea de 3 proteínas de unión derivadas de anticuerpos de una única cadena pesada de dromedario/camellos y que tienen especificidad para la lisozima de diferentes especies. cAb-1. Anticuerpo cAb-Lys3 es una 'VHH' que inhibe la lisozima de clara de huevo de gallina y su estructura en complejo con el antígeno se determinó por cristalografía (Desmyter, A. y otros, (1996) *Nat Struct Biol* 3: 803-811; Transue, T. R. y otros, (1998) *Proteins* 32: 515-522.). cAb-2. El segundo anticuerpo es cAb-TEM02 descrito en (Conrath, K. y otros (2001) *J Biol Chem* 276: 7346-7350). cAb-3. La tercera proteína de unión es un anticuerpo VHH, clon cAb-HuL6, un fragmento derivado de un anticuerpo de 'cadena pesada' de dromedario con alta especificidad para lisozima humana nativa y sus variantes amiloidogénicas (Dumoulin, M. y otros, (2002) *Protein Sci* 11: 500-515.). Se demostró que la proteína inhibe la formación de fibrillas amiloides con la lisozima humana (Dumoulin, M. y otros, (2003) *Nature* 424: 783-788.). Tiene un valor de k_a para la lisozima de $8,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una k_d de $5,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Su secuencia de aminoácidos se representa en la sec. con núm. de ident.: 1 (QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCSASGYTYISGWFRQAPGKEREGVAAIRSSDGTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAMYYCAATEVAGWPLDIGIYDYWGQGTEVTVSS). Además, se determinó su estructura en complejo con la lisozima (nombre de estructura en pdb es IOP9).

El primer punto inicial para expresar estos 3 cAb en una célula de mamífero como proteínas secretadas es el plásmido pBRV, un derivado de VExpress descrito en el documento de patente núm. US20030224408A1 (representado esquemáticamente en la Figura 7A). Las mezclas de estos plásmidos se usan para construir bibliotecas (según la Figura 2A). La clonación se realiza para pBRV con regiones codificantes cAb que se amplifican mientras se anexas los sitios ApaI y XbaI en el extremo 5' y extremo 3' del gen, respectivamente. El iniciador basado en 3' introduce además una etiqueta poliHis. Esto se lleva a cabo para cAb-1, produciendo el plásmido pl-cAb-1. Este plásmido dirige la expresión del fragmento cAb1 soluble que porta una etiqueta poli-His que es reconocida por varios anticuerpos monoclonales de fuente comercial, así como además puede usarse para la purificación por IMAC.

Los otros dos genes cAb se clonan en un vector que dirigirá la expresión no vinculada a IRES de las dos regiones codificantes. Además, se introduce un elemento STAR. Los elementos STAR confieren a las células de mamíferos una expresión estable y de alto nivel de proteínas en una forma dependiente del número de copias (Kwaks y otros, (2003), *Nat. Biotechnol* 21: 553-558). El vector usado para esto, pABExpress40, se describe en la Solicitud de patente europea núm. 03076671.1 y se representa en la Figura 7C. pABExpress40 contiene tanto casetes de cadena pesada como ligera con su respectiva orientación transcripcional en direcciones opuestas, y el elemento anti-represor se posiciona en el medio de las dos unidades de transcripción. Este plásmido, pABExpress40 se usa primero en la clonación del primer gen de la proteína de unión elegida, cAb-2 (usando los sitios de clonaje de ApaI y SpeI que se anexas a la región codificante del gen cAb-2 usando oligonucleótidos diseñados para clonación direccional y mantenimiento en el constructo resultante el marco de lectura en el gen de la proteína de unión seguida la secuencia líder del vector), lo que resulta en pABExpress40-cAb-2. Este plásmido se usa para recibir el segundo gen que codifica la proteína de unión, cAb-3 (como el fragmento BssHII-XbaI) (todos estos 4 sitios son únicos en pABExpress40; generalmente si los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción son endógenos para el gen que codifica la proteína de unión, puede o bien eliminarse primero mediante mutagénesis in vitro dirigida al sitio, o el producto de PCR puede someterse a una digestión parcial con esta enzima (y una digestión completa con la otra enzima), después el material de longitud

completa se purifica en gel y este fragmento se clona; además, otros sitios de restricción únicos equivalentes en su uso para este experimento de clonación están disponibles en el vector, ver la Tabla 5 en Persic y otros, Gene 187 (1997): 9-18). En la reacción de PCR, el oligonucleótido basado en 3' se incorpora además a un tramo de 6 histidinas seguido de un codón de terminación, de manera que las proteínas pueden purificarse por IMAC como se describió anteriormente.

5 Después de la clonación secuencial de los dos genes de proteína de unión, cAb-2 y cAb-3, el plásmido que contiene ambos genes VHH se designa p2-ST-cAb2/3, se identifica mediante análisis de restricción y secuenciación y su ADN se prepara para experimentos de transfección.

10 Para construir una biblioteca de células que expresan tres proteínas de unión diferentes, alternativamente puede construirse un vector tricistrónico. Dichos vectores se describieron para otras aplicaciones y usan secuencias de IRES y sitios de clonación diferentes. Para acelerar la clonación de múltiples genes de SPCBP, es importante proporcionar en dicho vector sitios únicos de enzimas de restricción que limitan las regiones codificantes de SPCBP, de manera que tres genes diferentes pueden clonarse fácilmente en dicho vector, secuencialmente en dos etapas o más rápido a través de ligación de 3 vías. Se describieron vectores tricistrónicos retrovirales y de adenovirus que coexpresan IL-12 (IL-12p40 más IL-12p35) y CD80 utilizando dos secuencias internas de sitio de entrada de ribosoma (IRES) para unir los tres

15 ADNc. Un vector retroviral a base de virus de células madre murinas (MSCV) (MSCV-hIL12. B7) utilizó distintas secuencias IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y el virus de la fiebre aftosa (FMCV), mientras que los vectores de adenovirus basados en Ad5 contenían unidades transcripcionales con dos secuencias EMCV IRES bajo el control de promotores de citomegalovirus murinos (AdMh12. B7) o humanos (AdHh12. B7). Al combinar diferentes

20 secuencias de promotor e IRES, tales como las que se enumeran en la presente y anteriormente en el texto, pueden construirse plásmidos que median la expresión de las 3 SPCBP.

Ejemplo 3. Producción de una biblioteca de expresión de dos y tres células de diferentes cAb en diferentes relaciones.

25 Los plásmidos pl-cAb1 y p2-ST-cAb2/3 se usan para hacer múltiples transfectantes estables. El plásmido p2-ST-cAb2/3 se transfecta solo o en combinación con el plásmido pl-cAb1. Mediante la selección con el gen de resistencia neo y los métodos de cultivo y tamizaje conocidos por aquellos expertos en la técnica, se obtienen las líneas celulares estables derivadas de PER.C6™ que expresan los 2 o 3 cAb y en diferentes relaciones. Esencialmente 5×10^6 PER.C6™ células se transfectan usando Lipofectamina de conformidad con las instrucciones del fabricante, y 3 microgramos de ADN del plásmido (o 2+1 microgramos si los dos se usan juntos). Después de 5 horas, las células se lavan y el medio se intercambia con medio no selectivo. Al día siguiente, el medio se reemplaza con medio fresco que contiene 500

30 microgramos/ml de G418 (Sigma-Aldrich) y además, cada 2-3 días el medio de cultivo se recambia hasta que aparecen los clones (15-20 días después de la siembra). Los clones se recogen y se clonan para limitar las condiciones de dilución, de manera que 2-3 semanas más tarde comienzan a aparecer líneas celulares clonales. Estas se expanden en los pocillos y frascos más grandes, y eventualmente se omite el medio selectivo. El primer análisis de las líneas celulares es analizar la presencia de los dos o tres genes cAb diferentes en las líneas celulares creadas, mediante la amplificación del ADN genómico de estas líneas celulares con oligonucleótidos específicos (vector y basados en la región codificante) para cAb-1 y cAb-2 y cAb-3, y la confirmación de la presencia mediante la secuenciación del material amplificado. El número de copia de los casetes de expresión (supuestamente el mismo para ambos cAb-1 y cAb-2) se

35 determina mediante transferencia de membrana de tipo Southern o hibridación fluorescente in situ (FISH). El sobrenadante de estas líneas celulares se recolecta para el análisis de las mezclas de cAb secretadas. Las proteínas cAb se purifican del sobrenadante por IMAC de conformidad con las instrucciones del fabricante. Las mezclas de cAb se aíslan, purifican y prueban en una serie de ensayos. En segundo lugar, la mezcla se caracteriza bioquímicamente usando SDS-PAGE y transferencia Western (para sobrenadante no purificado) y usando SDS-PAGE y enfoque isoeléctrico con proteínas purificadas con IMAC. En tercer lugar, los ensayos de unión a la lisozima y de neutralización de lisozima se llevan a cabo mediante el ensayo ELISA como se describió anteriormente y el ensayo catalítico para la lisozima. Dado que los cAb se unen a diferentes especies de lisozima, la presencia de las proteínas de unión múltiple en la mezcla se detecta además usando lisozima de diferentes especies, incluidas la clara de huevo de gallina y de humanos. Las intensidades relativas de las señales, en los geles o en el ELISA, revelan relaciones relativas

40 diferenciales de los cAb en las diferentes líneas celulares.

45

50

Ejemplo 4. Producción de bibliotecas de células CHO que producen diversas mezclas de proteínas.

55 Los plásmidos p2-I-AC1xAC2 (Ejemplo 1) y pl-cAb-1 (Ejemplo 2) se usan en una relación 2: 1 en el experimento de cotransfección de las células CHO. K1 esencialmente como se describe para las células PER.C6 (Ejemplo 3). Las líneas celulares transfectadas de forma estable se generan mediante la selección de células en G418 y el sobrenadante de clones obtenidos en la dilución limitante probada por la presencia de anticualinas o el cAb mediante ELISA en fase sólida utilizando los 3 antígenos diferentes, digoxigenina, fluoresceína y lisozima como antígenos de recubrimiento. Las intensidades relativas en el ELISA revelan relaciones relativas diferenciales de las AC y CAb en diferentes líneas celulares.

60

Ejemplo 5. Análisis detallado de mezclas de proteínas de unión usando ELISA y el uso de reactivos específicos del sitio de unión.

65 Los tres cAb del ejemplo 3 y la mezcla de anticualinas y un cAb se analizan con más detalle de la siguiente manera. Se expande el cultivo de los clones de células individuales que expresan una mezcla y se aíslan los fragmentos de proteína

de unión a través de sus etiquetas de histidina usando IMAC. Las mezclas de proteínas resultantes se analizan como sigue.

5 En primera instancia, se considera el caso de una mezcla compuesta de múltiples proteínas de unión, cada una dirigida a diferentes epítomos, pero todas presentes en el mismo antígeno objetivo (la mezcla de cAbl, 2 y 3). Los siguientes métodos están disponibles para analizar la mezcla. La región del sitio de unión en cada proteína de unión producirá diferentes composiciones de aminoácidos y permite el siguiente análisis, independiente del antígeno: (1) Electroforesis en gel basada en tamaño, tal como SDS-PAGE: para proteínas de unión de pequeño tamaño relativo como las citadas en el Ejemplo 1, las diferencias en el peso molecular causadas por la composición de aminoácidos única en o cerca del sitio de unión pueden revelarse mediante electroforesis en gel. Al usar los métodos de alta resolución (por ejemplo, geles con gradientes), pequeñas diferencias en el peso molecular resultan en un cambio en la movilidad y, por lo tanto, se revela la presencia de proteínas de unión individuales en la mezcla. (2) Análisis de gel por enfoque isoeléctrico: este análisis se basa en un valor de pI diferente para las diferentes proteínas de unión. Cada molécula mostrará un único punto isoeléctrico. Las proteínas con un pI diferente se separan mediante electroforesis en un gradiente de pH. El método es semicuantitativo. Si dos proteínas de unión en la mezcla sólo tienen una diferencia mínima en su valor pI, será difícil separarlas usando esta prueba, y se usan las otras pruebas citadas. (3) Análisis de espectrometría de masas: este análisis se basa en la composición diferencial de aminoácidos (u otros cambios que alteran el peso molecular y/o la composición) de las proteínas de unión, que, después de la digestión con enzimas proteolíticas, produce un espectro único de péptidos en el análisis MassSpec. Este método es predominantemente cualitativo, pero se puede combinarse con otros métodos analíticos. (4) Análisis de unión basado en anticuerpos 'antiidiotipo': este análisis requiere la disponibilidad de reactivos que reconozcan específicamente un sitio de unión de proteína de unión en presencia de los otros sitios de unión en la mezcla. Adecuados para este análisis son los anticuerpos 'antiidiotipo', anticuerpos que únicamente reconocen el área en la proteína de unión que es equivalente al idiotipo de un anticuerpo. Dado que las proteínas de unión son diferentes en la secuencia de aminoácidos, además habrá otros 'idiotipos' y, por lo tanto, pueden obtenerse los reactivos que los reconozcan. En el ejemplo con las anticalinas, las proteínas de unión comparten un alto nivel de homología de secuencia y, por lo tanto, las características únicas del idiotipo se forman principalmente por regiones que originalmente se diversificaron. Se seleccionan los anticuerpos antiidiotipos usando la proteína de unión individual como antígeno en una selección de una gran biblioteca de proteínas de unión presentada en un fago usando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Típicamente, se usa una biblioteca de anticuerpos no inmunes (de Haard, H. J. y otros, (1999) J Biol Chem 274: 18218-18230), que produce fragmentos Fab, y una biblioteca de anticuerpos scFv semisintéticos en fagos (de Kruif y otros, (1995) J. Mol. Biol. 248: 97). Se seleccionan los anticuerpos antiidiotipo en proteínas de unión AC-1 y AC-2 inmovilizadas o biotiniladas de la biblioteca de proteínas de unión no inmune citada, usando el tamizaje por ELISA de los anticuerpos del fago seleccionados en estas dos proteínas usadas para la selección, se identifican los anticuerpos antiidiotipo que reconocen únicamente el 'idiotipo' de una de las dos proteínas de unión. Los respectivos reactivos Fab y scFv seleccionados de esta biblioteca, se expresan como fragmentos del anticuerpo y se purifican usando métodos estándar, por ejemplo descritos en estas citas y en 'Antibody Engineering (2001), Eds. Kontermán y Dubel, Springer Lab Manual). Los fragmentos se usan en el ELISA para determinar qué idiotipo está presente en la mezcla de las proteínas de unión, que se lleva a cabo en un ensayo cuantitativo. Los anticuerpos antiidiotipo específicos para los sitios de unión de AC-1 y AC-2 se usan además en experimentos de competencia con antígenos con la preparación hecha en el Ejemplo 4, para delimitar la contribución de un sitio de unión individual a la actividad biológica de la mezcla de proteínas de unión. (5) Análisis de unión basado en los péptidos de unión de proteínas de unión: Alternativamente, las proteínas de unión individuales se usan para derivar péptidos asociados al idiotipo, péptidos lineales o conformacionales derivadas de la secuencia del antígeno y aún reactivos con la proteína de unión, por ejemplo a través del análisis de PepScan, como se demostró para el anticuerpo neutralizante del virus de la rabia MAb 6-15C4 (van der Heijden y otros, (1993), J. Gen. Virol. 74: 1539-45). Una alternativa es aislar mimotopos de péptidos, con secuencias no relacionadas con el antígeno original pero que se unen específicamente a las secuencias asociadas con el sitio de unión de la proteína de unión. Siempre que la reacción proporcionada sea específica para una proteína de unión dada en el contexto de la otra u otras en la mezcla, además dichos péptidos son adecuados para un análisis específico de la mezcla de proteínas de unión. Se seleccionan péptidos con una reactividad única para una proteína de unión dada de bibliotecas de péptidos de presentación de fagos utilizando métodos esencialmente similares a los de las bibliotecas de proteínas de unión a fago. La prueba de unión con los anticuerpos antiidiotipo y los péptidos mimotopos es cualitativa o cuantitativa, y una serie grande de pruebas de unión son factibles, incluyendo ELISA, RIA, análisis por citometría de flujo, BIAcore, etcétera.

55 Se describe además el análisis de una mezcla que comprende múltiples proteínas de unión en las que cada una de las proteínas de unión originales se une a un antígeno diferente (como en la generación de mezclas en el Ejemplo 4). Esto se asemeja a la situación en la que las proteínas de unión reconocen el mismo antígeno u objetivo, y se disponen de reactivos antiidiotipo o miméticos de péptidos. El análisis de múltiples especificidades en una mezcla se lleva a cabo de la siguiente manera (teniendo en cuenta que el antígeno es sinónimo de antiidiotipo). La reactividad a antígenos individuales se prueba en ELISA en todos los antígenos por separado, con ensayos estandarizados que usan los anticuerpos monoclonales y la prueba cuantitativa de ELISA IgG. El antígeno se recubre directa o indirectamente, las placas se incuban con la mezcla de proteínas de unión y la proteína de unión se detecta con un reactivo que reconoce todas las proteínas de unión. Por ejemplo, los anticuerpos anti-etiqueta son particularmente útiles para esto, o reactivos que reconocen la región dentro de las proteínas de unión que se comparten entre ellos debido al nivel de identificación entre las proteínas. Esto conduce a una actividad 'específica' de la preparación, es decir, una reactividad en unidades relativas de actividad por cantidad de proteína de unión.

Ejemplo 6. Una mezcla de tres dominios VHH expresados en una célula huésped de *E. coli*

5 Los tres genes cAb, cAb-1,2 y 3 se clonan en un vector de expresión procariótico, usando los métodos de clonación anteriores. En primer lugar, los genes de la región codificante se amplifican con los oligonucleótidos que hibridan con los extremos 5' y 3' de las secuencias de nucleótidos y proporcionan sitios de enzimas de restricción apropiados para la clonación. Las técnicas estándar de clonación se describen en Sambrook y otros, 'Molecular cloning', segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987). Los genes cAb se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los métodos bien conocidos en la técnica. El plásmido receptor es pSCFV-3 que se describió en la solicitud de patente europea núm. 03076671.1, y contiene 3 sitios para la inserción de las regiones de codificación cAb (Figura 9). pSCFV-3 porta sitios de restricción únicos para el clonaje de los genes de cAb, dos detrás del mismo promotor lacZ y separados mediante un nuevo sitio de unión a ribosomas (rbs) y la secuencia señal (L), y uno detrás de un promotor inducible por arabinosa, rbs y L. Además porta diferentes etiquetas, una para cada uno de los casetes cAb, etiqueta c-myc (secuencia EQKLISEEDL), etiqueta VSV (secuencia YTDIEMNRLGK) y la etiqueta (HA) de la hemaglutinina de influenza (secuencia YPYDVPDYA), y todo seguido de una extensión de 3 alaninas y 5 histidinas. Esta configuración proporciona un método para la detección de anticuerpos individuales en la mezcla, y un método genérico para la purificación, basado en cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) usando los métodos bien conocidos en la técnica. Las tres regiones codificantes de cAb se clonan secuencialmente en este plásmido, corriente abajo de una secuencia líder bacteriana, y en marco con la secuencia de etiqueta.

20 La expresión de la mezcla de los cAb se realiza de la siguiente manera. Los fragmentos de cAb solubles se expresan después de la inducción con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) del promotor lacZ que impulsa la expresión del cAb en los plásmidos basados en pSCFV y con y sin el inductor del promotor arabinosa, y las mezclas de proteínas cAb recolectadas a partir del espacio periplásmico de las células *E. coli* TG1. Para confirmar la unión de los cAb individuales, se realiza un ELISA usando las placas de Polysorb (Nunc) recubiertas con lisozima de clara de huevo de gallina y humana. Por inducción con IPTG, se logra la expresión de una mezcla de dos fragmentos funcionales de cAb. Mediante inducción adicional con arabinosa, se coexpresó un fragmento de cAb adicional. La contribución a la unión en la mezcla de cada uno de los fragmentos de cAb se confirma usando uno de los tres anticuerpos antietiqueta (el anticuerpo monoclonal de ratón 9E10 se une a la etiqueta del epítipo c-Myc humano (código de producto de abcam, www.abcam.com: ab32), y anticuerpos policlonales para la etiqueta HA (ab3413) o etiqueta VSV (ab3556). Para verificar si la producción se lleva a cabo por una bacteria y su progenie y no por tres clones que cada uno produce uno de los fragmentos de anticuerpo, el cultivo se purifica en colonias después de 4 horas en la fase de inducción y se prueba para la producción de los tres clones independientes, lo que confirma que la expresión es clonal.

35 Para un análisis detallado, la mezcla de cAb se purifica y concentra. Para determinar correctamente el porcentaje de la mezcla de cAb, se purifica primero del extracto periplásmico de *E. coli* usando IMAC. Brevemente, un cultivo de 500 ml inducido por IPTG y arabinosa (mantenido durante 4 horas a 30°C), se centrifuga a 4600 x g durante 20 min a 4°C y el sedimento bacteriano se resuspende en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene inhibidores de proteasa (fluoruro de fenil-metilsulfonilo y benzamidina). La solución se sonica a 24°C usando un desintegrador ultrasónico (MSE Scientific Instruments), y la suspensión se centrifuga a 50.000 x g durante 30 min a 4°C. La fracción del sobrenadante se incuba con la resina TALONTM de conformidad con las instrucciones del fabricante (Clontech). Después de un lavado prolongado, las proteínas se eluyen usando imidazol 100 mM. Siguiendo este procedimiento, los fragmentos cAb se purifican adicionalmente mediante filtración en gel usando una columna Superdex 75 (Amersham Pharmacia Biotech) conectada a un instrumento Biologic (Biorad). Se cuantifican las concentraciones de cAb usando el estuche de ácido bicinconínico (Pierce).

Alternativamente al uso de un plásmido, los tres casetes de expresión de cAb pueden clonarse además en plásmidos separados, por ejemplo, en plásmidos compatibles tales como pBR322 y pACYC y se mantienen en la misma célula huésped antes de la inducción.

50 Ejemplo 7. Aislamiento de anticuerpos de un dominio único contra una glicoproteína de la Rabia a partir de una biblioteca de fase VL, producción de una biblioteca de células que expresan múltiples VL y tamizaje de las mezclas para la mezcla de neutralización óptima.

55 Los fragmentos de anticuerpo VL de dominio único específicos de la Rabia se seleccionan de un repertorio de presentación de fagos aislado de los PBL humanos y se diversifican mediante aleatorización de ADN, como se describe en van den Beucken y otros, (2001), *J. Mol. Biol.* 591-601 (bibliotecas B y C). Las partículas de fagos se elaboran de los cultivos de estas dos bibliotecas. El rescate de las partículas fagémidas con el fago auxiliar M13-KO7 se realiza de conformidad con (Marks y otros, (1991), *J. Mol. Biol.* 222: 581-597) en una escala de 1 L, usando números representativos de bacterias de la biblioteca para la inoculación, para garantizar la presencia de al menos 10 bacterias de cada clon en el inóculo inicial. Para la selección de los VL, se usa la proteína G de la rabia. La purificación del virus y la purificación de glicoproteínas se han descrito en otra parte (Dietzschold y otros, (1996) *Laboratory Techniques in Rabies*, Eds Meslin, Kaplan y Korpowski. World Health Organization, Ginebra, pág. 175). Para las selecciones, se usan 10¹³ cfu ((unidades formadoras de colonias) con 10 microgramos/ml de glicoproteína de la Rabia recubierta en inmunotubos (tubos Maxisorp, Nunc) o con 250 nM de la proteína G biotinilada soluble. El antígeno se biotinila en una proporción de una a cinco moléculas de NHS-Biotina (Pierce) por antígeno de molécula de conformidad con las

recomendaciones de los proveedores. Se llevan a cabo tres rondas de selección con estas bibliotecas. Los protocolos detallados para cultivar y seleccionar las bibliotecas de presentación de fagos se han descrito en otra parte (como en Marks y otros, (1991), J. Mol. Biol. 222: 581-597) y se conocen bien por los que trabajan en la técnica. En resumen, la selección con el antígeno biotinilado se lleva a cabo de la siguiente manera. Las partículas de fagos se incuban en una rueda rotatoria durante 1 hora en M-PBST al 2% (PBS suministrado con leche desnatada en polvo al 2% y Tween-20 al 0,1%). Mientras tanto, 100 microlitros de perlas paramagnéticas conjugadas con estreptavidina (Dyna, Oslo, Noruega) se incuban en una rueda rotatoria durante 2 h en M-PBST al 2%. El antígeno biotinilado se agrega al fago preincubado y se incuban en una rueda rotatoria durante 30 min. A continuación, se agregan las perlas y la mezcla se deja en la rueda rotatoria durante 15 minutos. Después de 14 lavados con M-PBST al 2% y un lavado con PBS, las partículas de fagos se eluyen con 950 µl de trietilamina 0,1 M durante 5 minutos. El eluato se neutraliza inmediatamente con la adición de 0,5 ml de Tris-HCl (pH 7,5) y se usa para la infección de células de *E. coli* TG1 en fase logarítmica. Las células TG1 se infectan durante 30 minutos a 37°C y se colocan en placas de agar 2xTY (16 g de Bacto-triptón, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro), que contienen glucosa al 2% y 100 µg/ml de ampicilina. Después de la incubación durante la noche a 30°C, las colonias se raspan de las placas y se usan para el rescate del fago como se describe en (Marks y otros, (1991), J. Mol. Biol. 222: 581-597). Los sobrenadantes de cultivo de los clones seleccionados individualmente que albergan los fagos rescatados o fragmentos de VL solubles se ensayan en el ELISA con el antígeno recubierto directamente o el antígeno biotinilado capturado indirectamente mediante BSA biotinilado-estreptavidina inmovilizada. En la presente se describe el procedimiento con el antígeno biotinilado para la detección de fragmentos solubles de VL. Para la captura de la glicoproteína de la Rabia biotinilada, primero, el BSA biotinilado se recubre a 2 µg/ml en PBS durante 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-0,1% (v/v) Tween 20 (PBST), las placas se incuban durante 1 hora con estreptavidina (10 µg/ml en PBS/0,5% de gelatina) (24). Después del lavado como anteriormente, se añade el antígeno biotinilado para una incubación durante la noche a 4°C a una concentración de 3 µg/ml. Las placas se bloquean durante 30 minutos a temperatura ambiente con leche en polvo semidesnatada al 2% (p/v) (Marvel) en PBS. El sobrenadante del cultivo se transfiere a estos pocillos y se diluye 1 o 5 veces en Marvel/PBS al 2% (p/v) y se incuban durante 2 h; el VL unido se detecta con el anticuerpo anti-*myc* 9E10 (5 µg/ml) que reconoce la etiqueta del *myc*-péptido en el carboxiterminal de la cadena VL1 y el conjugado anti-HRP de ratón en conejo (DAKO). Después de la última incubación, la tinción se realiza con tetrametilbenzidina (TMB) y H₂O₂ como sustrato y se detiene mediante la adición de medio volumen de H₂SO₄ 2N; la densidad óptica se mide a 450 nm. Los clones que dan una señal positiva en ELISA (más de 2 veces el fondo), se analizan adicionalmente mediante secuenciación. Puede ser un gran trabajo purificar cada reactivo individual del clon VL y probarlos individualmente para neutralizar el virus. En cambio, 5 VL reactivas a antígeno que además son reactivas con la proteína L ((Holt, L. J. y otros, (2003) Trends Biotechnol 21: 484-490.) se identifican y se seleccionan para la elaboración directa de mezclas usando los métodos de los ejemplos anteriores, y el comportamiento de la neutralización de las mezclas probadas. La purificación de proteína L hace que la provisión de etiquetas sea obsoleta y proporciona un esquema de purificación genérico para todas las VL seleccionadas.

Ejemplo 8: Una biblioteca de células CHO que expresan una mezcla de las SPCBP neutralizantes de parásitos

Las proteínas de unión de cadena polipeptídica única usadas en este experimento son 5 fragmentos de anticuerpos de camélido descritos para unirse al dímero de la glicoproteína de superficie específica de variante (VSG) de los tripanosomas africanos (Stijlemans, B. y otros, (2004) J Biol Chem 279: 1256-1261). Los cinco fragmentos de anticuerpo se seleccionaron de una biblioteca de presentación de fagos de 5x10⁷ linfocitos diferentes de dromedario inmunizado mediante los pasos de selección en un VSG purificado. De las cinco proteínas, hay una, cAb-An33, que se une a un epítipo conservado en la superficie expuesta a carbohidratos unidos por Asn presentes en VSG (Stijlemans, B. y otros, (2004) J Biol Chem 279: 1256-1261). Este pequeño fragmento de anticuerpo, a diferencia de lectinas más grandes o fragmentos de anticuerpos convencionales, es capaz de penetrar las glicoproteínas de superficie variantes (VSG) que son comunes a múltiples clases de VSG.

Los clones con los nombres originales cAb-An02, cAb-An33, cAb-An04, cAb-An05 y cAb-An06 se toman para crear una mezcla de células que expresan niveles diferentes de estas SPCBP. Las secuencias de estas SPCBP se describen en los números de acceso GenBank™ AY263486, AY263490, AY263487, AY263488 y AY263489, respectivamente.

Las regiones codificantes de cAb se amplifican a partir de su molde mediante los oligonucleótidos que se unen a las regiones equivalentes en el ADN que codifica las regiones terminales N y C para estas SPCBP. Para cAb-AN33, el plásmido que contiene el gen cAb-An33 obtenido después de las adsorciones (Stijlemans, B. y otros, (2004) J Biol Chem 279: 1256-1261) se usa como molde en una reacción de PCR con los iniciadores de Sec. con núm. de ident. 1: 5'-AGTGTACAGG CGCGCACTCC GATGTGCAGC TGTTGGAGTC-3' y la Sec. con núm. de ident. 2: 5'-TGAGGAGACG GTGACCTGGG TCCC-3'. Esto amplifica la región codificante de VHH y en un iniciador se anexa un sitio de restricción (en este caso BssHII) para la clonación, en este caso fuera de su propia región codificante, y se basa en el sitio de restricción único natural en el otro (BstEII). El diseño de los iniciadores para estos y los otros iniciadores para la clonación se realiza de manera que el marco de lectura se mantiene con la secuencia líder eucariota anterior y la secuencia que codifica la etiqueta siguiente.

Tres clones, cAb-An02/33 y 04 se clonan en varias etapas en un plásmido que mediará en la expresión de las 3 SPCBP. El iniciador cAb-An33 se amplifica y se clona en pAbExpress como fragmento BssHII-BstEII en pABExpress40 (Figura 7C), para producir pAn33. En segundo lugar, se prepara un fragmento de PCR a partir de pRRV para amplificar la

secuencia IRES en este plásmido mientras que se anexa en el extremo 5' un sitio BstEII, seguido de una secuencia que codifica el extremo 3' de la región codificante An33, seguido de la secuencia que codifica la etiqueta myc, como se usa en muchos vectores de presentación de fagos tales como pHEN1 (Hoogenboom y otros, Nucl. Acids Res. 1991), un codón de parada 'taa', seguido por 35 nucleótidos de la secuencia de hibridación 5' del elemento IRES (todo esto con un iniciador, que comenzará de la siguiente manera: Sec. con núm. de ident. 3: 5'-GATAAATCTG GTCACCGTCT CCTCAGAACA AAAACTCATC TCAGAAGAGG ATCTGAAT TAATAA-.. (región de codificación de la etiqueta myc subrayada, esta secuencia seguida por los 35 nucleótidos a base de IRES). El iniciador 3' para la amplificación IRES se basa en el dominio CH1 de la región constante humana. Esta amplificación produce un fragmento de PCR que contiene IRES que se corta con BstEII y BssHIII. Este fragmento se liga junto con un fragmento de PCR digerido con BssHIII-XbaI que el mismo se prepara mediante amplificación del molde de cAb-An04 con los siguientes dos iniciadores, Sec. con núm. de ident. 4: 5'-AGTGTACAGG CGCGCACTCC CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC-3', y Sec. con núm. de ident. 5: 5'-ATACGCTCTA GATTAGCTGG AGACGGTGAC CTGGGTCCCC GG-3' (los sitios de restricción están subrayados). Estos dos fragmentos de ADN se ligan a pAn33 digerido con BstEII-XbaI en una etapa de ligación de 3 vías. Se identifican los clones que han insertado tanto en IRES como en cAb-An04 y el clon después de la confirmación de secuencia se designa pAn33x04. Finalmente se amplifica cAb-An02 de su molde con dos iniciadores que añaden un sitio ApaI en el extremo 5'y un codón de terminación y el sitio de restricción Ascl en el extremo 3' (con los iniciadores de Sec. con núm. de ident. 6: 5'-GCATTATCTG GCGTGCCTC TGATGTGCAG CTGGTGGAGTC-3' y con Sec. con núm. de ident. 7: 5'- TACAGATATG GCGCGCCTTA TGAGGAGACG GTGACCTGGG TCCCCT-3'. El fragmento de PCR se digiere con ApaI y Ascl y se clona en pAn33x04 digerido de manera similar, para producir ahora un plásmido con las tres SPCBP de camélidos, pAn02x33x04, en los que cAb-An02 está bajo el control de un promotor de CMV separado como las otras dos regiones codificantes de cAb, de cAb33-An04, y en el que la expresión de estas dos últimas regiones codificantes se une mediante una secuencia IRES. Uno de los cAb, cAb-An33, está equipado además con una etiqueta myc para la detección rápida de la expresión de esta proteína. El plásmido se representa esquemáticamente en la Figura 8.

Este plásmido se usa para la transfección de las células CHO como se describe en los Ejemplos 3 y 4 y los clones celulares obtenidos mediante dilución limitativa se aíslan a través del marcador de neoselección. Las células que expresan al menos un cAb se identifican mediante ELISA usando material de VSG recubierto. VSG se prepara de la siguiente manera. Los estabilizadores congelados de los parásitos de la corriente sanguínea *Trypanosoma brucei* *brucei* que expresan el VSG respectivo se expanden por la infección de las ratas (Charles River). Las ratas con parasitemia sistémica (típicamente, 4-5 días después de la infección) se desangraron, y los parásitos se purifican de sangre heparinizada mediante cromatografía DEAE-celulosa (DE52, Whatman). Después, se aísla el VSG mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel (como en (Stijlemans, B. y otros, (2004) J Biol Chem 279: 1256-1261). Para el ELISA, se recubre el VSG (a 1 µg/ml de NaHCO₃, 0,1 M pH 8,2) durante la noche (4°C) en placas de 96 pocillos. Después del bloqueo (2 h, temperatura ambiente) con FCS al 5% en PBS, los sobrenadantes de las células se cargan en diluciones seriadas de 1: 2 y se detecta la unión de cAb-An33 usando un anticuerpo anti-etiqueta myc de ratón (9E10, Roche, código 1667149) y un anticuerpo anti-IgG de ratón en cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante. Treinta minutos después de agregar el sustrato de peroxidasa, la reacción se detiene con 0,1 N de H₂SO₄ y la densidad óptica se mide a 450 nm. Las células clonales reactivas con el anticuerpo 9E10 y expresando, por lo tanto, al menos cAb-An33, se mezclan y expanden para la siguiente transfección. En vez de analizar la expresión de los otros 2 cAb, el grupo de células se usa directamente para introducir los cAb adicionales a través de otra transfección de plásmidos.

CABsAn-05 y-06 se clonan como se explicó anteriormente mediante la clonación direccional de un fragmento de PCR equipado con los sitios de clonación apropiados. El vector de clonación ahora es pRRV-zeo, que es pRRV en el que el marcador de selección neo se ha intercambiado por el marcador de selección de pEM7-zeo (Invitrogen) para poder seleccionar un nuevo marcador de selección. En este caso, ambos cAb están provistos de una etiqueta, cAb-An05 con una extensión de 6 histidinas (ya provista en el plásmido seleccionado por la presentación en fago como etiqueta para todos los cAb), y el cAb-An06 con una etiqueta HA (hemaglutinina). Los anticuerpos de ambas marcas están disponibles por los proveedores comerciales (Roche, Pharmacia). El plásmido resultante que porta tanto cAb-An05 como cAb-An06 se designa como p05x06. La mezcla de células que expresa el conjunto de cAbs33/02 y 04 se transfecta con p05x06, y los clones seleccionados para la resistencia a zeo, mientras que se cultivan además en medio que contiene G418 para seleccionar la presencia de las primeras 3 regiones codificantes de cAb. Se amplían los múltiples clones estables identificados después de las diluciones limitativas. La unión del antígeno se realiza como antes, pero ahora se realiza la detección con tres anticuerpos diferentes en paralelo, anti-myc (detección de cAb-An33), anti-His (detección de cAb-An05) y anti-HA (detección de cAb-An06). El resultado de ELISA indica cuál de las células expresa al menos 1,2 o 3 de los cAb (como se muestra esquemáticamente en la Figura 3). Para analizar la presencia de los otros cAb. Otros experimentos pueden primero introducir etiquetas de histidina en todas las regiones codificantes de SPCBP (como se hizo en los ejemplos anteriores), de manera que el grupo de proteínas puede purificarse mediante IMAC y analizarse. Esto confirmará la expresión de múltiples y hasta 5 SPCBP diferentes.

Lista de secuencias:

65 Sec. con núm. de ident.:1
5'- AGTGTACAGG CGCGCACTCC GATGTGCAGC TGGTGGAGTC-3'

ES 2 646 560 T3

Sec. con núm. de ident.:2
5'-TGAGGAGACG GTGACCTGGG TCCC-3'
Sec. con núm. de ident.:3

5 5'- GATAAATCTG GTCACCGTCT' CCTCAGAACA AAAACTCATC TCAGAAGAGG
ATCTGAAT TAATAA-3'

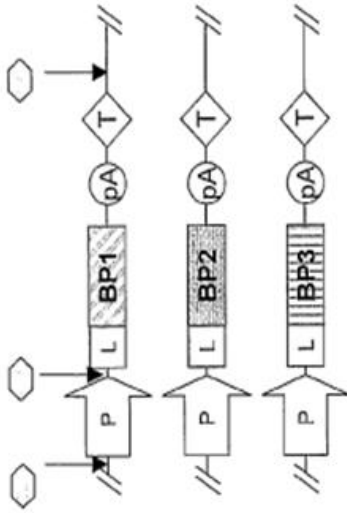
10 Sec. con núm. de ident.: 4
5'-AGTGTACAGG CGCGCACTCC CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC-3'
sec. con núm. de ident.:5
5'-ATACGCTCTA GATTAGCTGG AGACGGTGAC CTGGGTCCCC GG-3'
Sec. con núm. de ident.: 6

15 5'-GCATTATCTG GCGTGCCTC TGATGTGCAG CTGGTGGAGTC-3'
Sec. con núm. de ident.: 7
5'- TACAGATATG GCGCGCCTTA TGAGGAGACG GTGACCTGGG TCCCCT-3'

Reivindicaciones

1. Un método para identificar, a partir de una biblioteca de células huésped, una célula huésped que exprese una mezcla de diferentes proteínas de unión de cadena polipeptídica simple con la actividad biológica óptima, en donde dichas proteínas de unión de cadena polipeptídica simple son anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos que no se asocian y, así, pueden recuperarse como proteínas separadas, dicho método comprende:
 - producir una biblioteca de células, en donde cada célula codifica al menos dos anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos separados que tienen diferentes epítomos objetivos, de manera que las células expresan los anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos en diferentes relaciones, que comprende transfectar y permitir la integración en el genoma de todas las células de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos al menos dos anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos y seleccionar según la integración exitosa, de manera que dichas secuencias de ácidos nucleicos comprenden una señal de secreción o una secuencia codificante para localizar y anclar la proteína de unión resultante en una membrana celular; y
 - evaluar las mezclas de anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos expresados por dichas células huésped en un ensayo de actividad biológica para determinar la mezcla con la actividad biológica óptima; e
 - identificar la célula huésped que produce dicha mezcla.
2. Un método de conformidad con la reivindicación 1, en donde las células transfectadas se someten a una etapa de clonación.
3. Un método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dichos al menos dos anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos se codifican por secuencias de ácidos nucleicos separadas.
4. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos al menos dos anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos están bajo el control de diferentes elementos reguladores.
5. Un método de conformidad con la reivindicación 4, en donde dichos elementos reguladores diferentes se seleccionan de un promotor, preferentemente inducible, un potenciador, un terminador, un elemento estabilizador antirrepresor, un sitio interno de entrada al ribosoma, una región de fijación a la matriz, un elemento de apertura de la cromatina ubicuo, un elemento de límite, una región de control del locus o una región de fijación al andamio.
6. Un método de conformidad con la reivindicación 4 o 5, en donde dichos elementos reguladores diferentes dan lugar a diferentes niveles de expresión de diferentes anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos.
7. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde cada célula codifica 2-10 anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos diferentes y separados.
8. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos al menos dos anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos son parte del mismo ácido nucleico.
9. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dichas al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos al menos dos anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos son parte de dos ácidos nucleicos diferentes.
10. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde cada célula es una célula inmortalizada.
11. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dichas secuencias de ácidos nucleicos comprenden al menos un marcador seleccionable.
12. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde se proporcionan medios para la integración dirigida a un sitio de dichas secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos de dominio único o anticalinas o aficuerpos.
13. Un método de conformidad con la reivindicación 12, en donde dichos medios son medios para la recombinación homóloga.
14. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dichas células son células eucariotas.

Casetes de expresión eucariota para diferentes proteínas de unión.



Vector de expresión eucariota basado en casete(s) de (A).

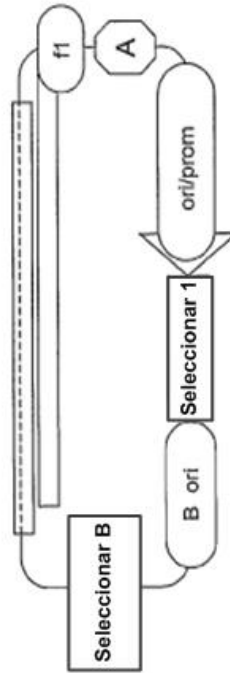
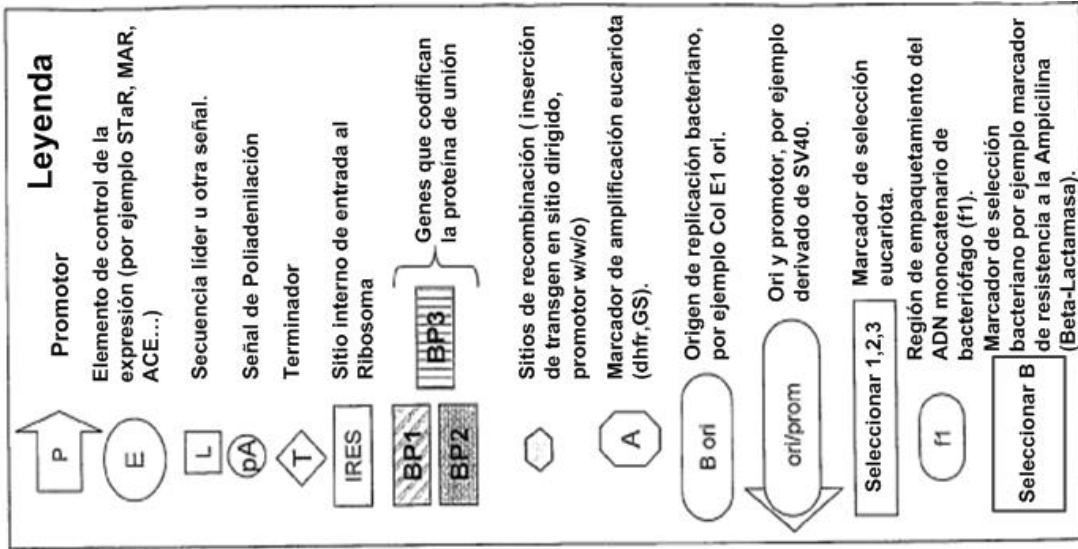
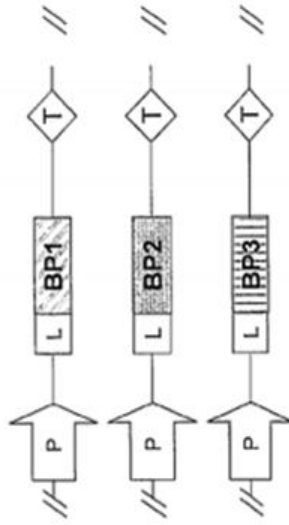


Figura. 1A



Casetes de expresión procariota para diferentes proteínas de unión.



Vector de expresión procariota basado en casetes de (A)

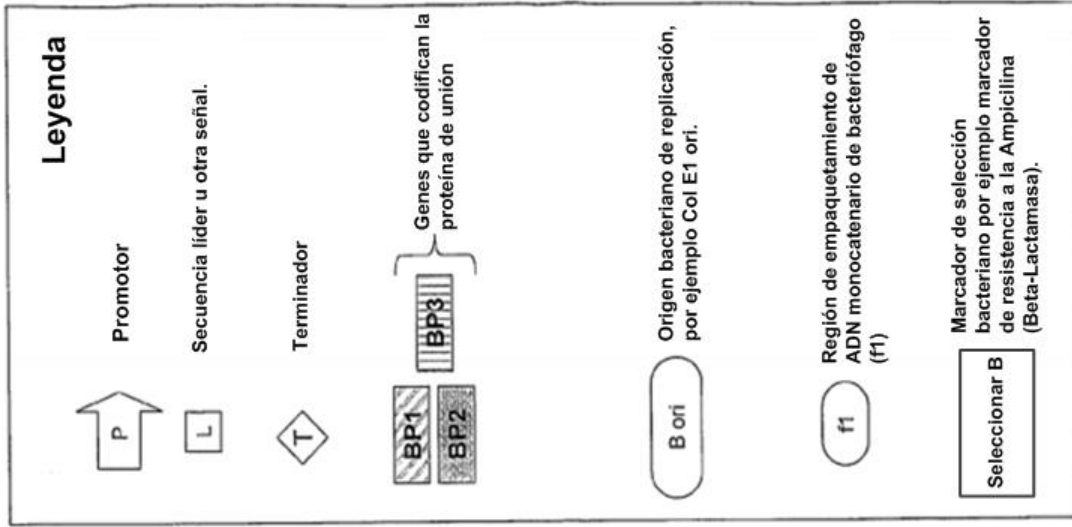
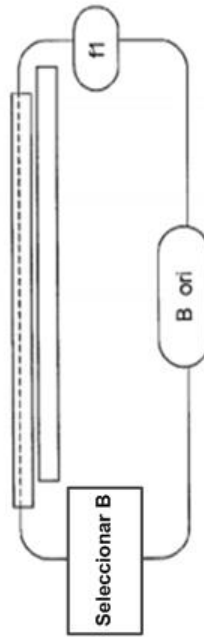
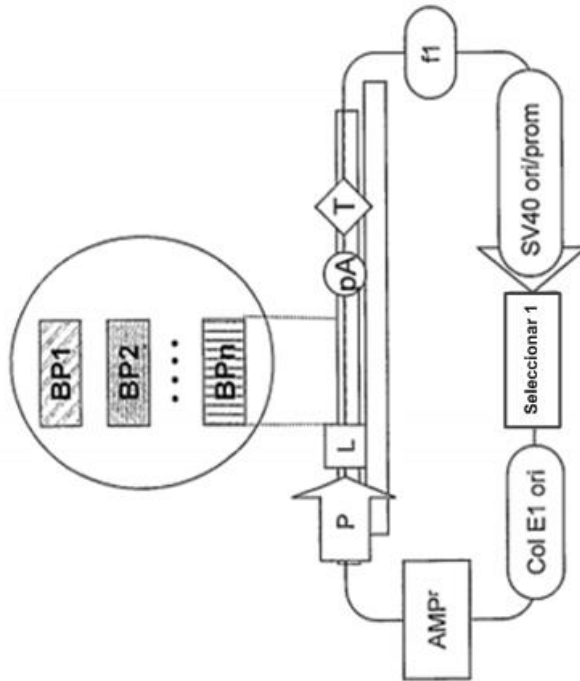


Figura. 1B

A. Una biblioteca de proteínas de unión que codifica todos los genes clonados en un vector de expresión.



B. Una biblioteca de proteínas de unión que codifica los genes clonados en los vectores de expresión que difieren en su marcador de selección.

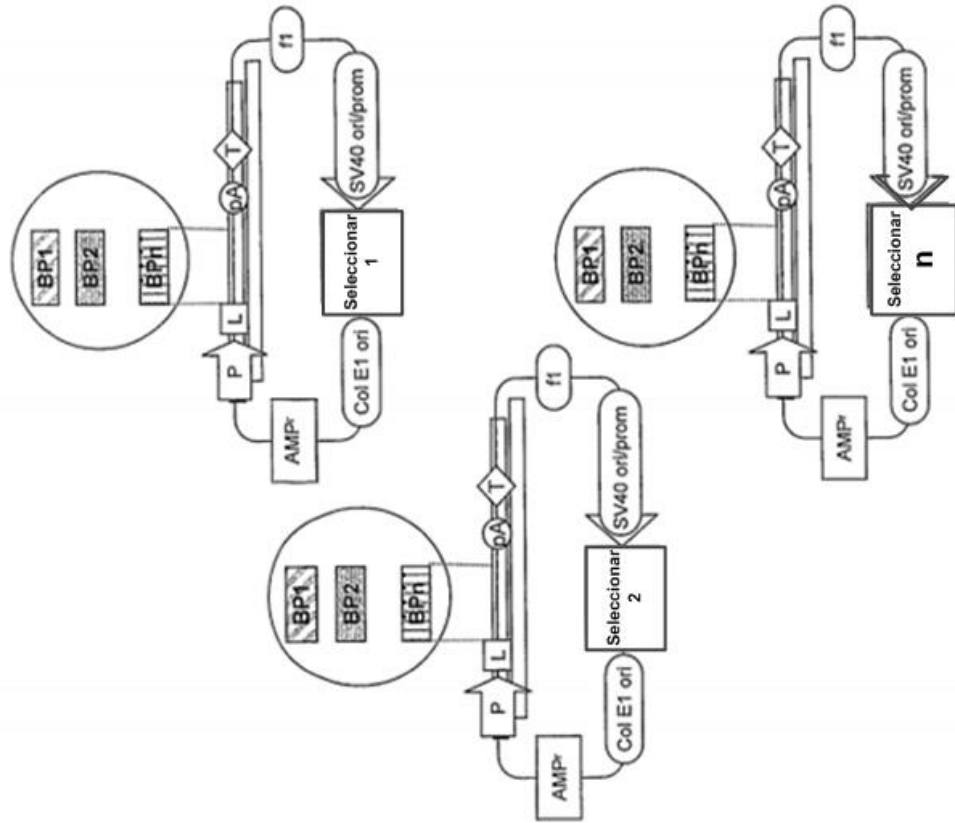
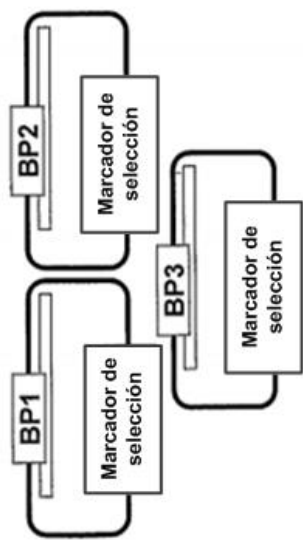


Figura. 2

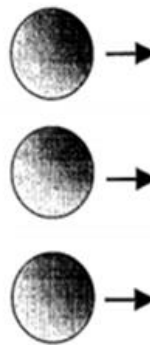
Casete de expresión con 3 genes que codifican 3 proteínas de unión diferentes clonadas en un vector de expresión con marcador de selección.



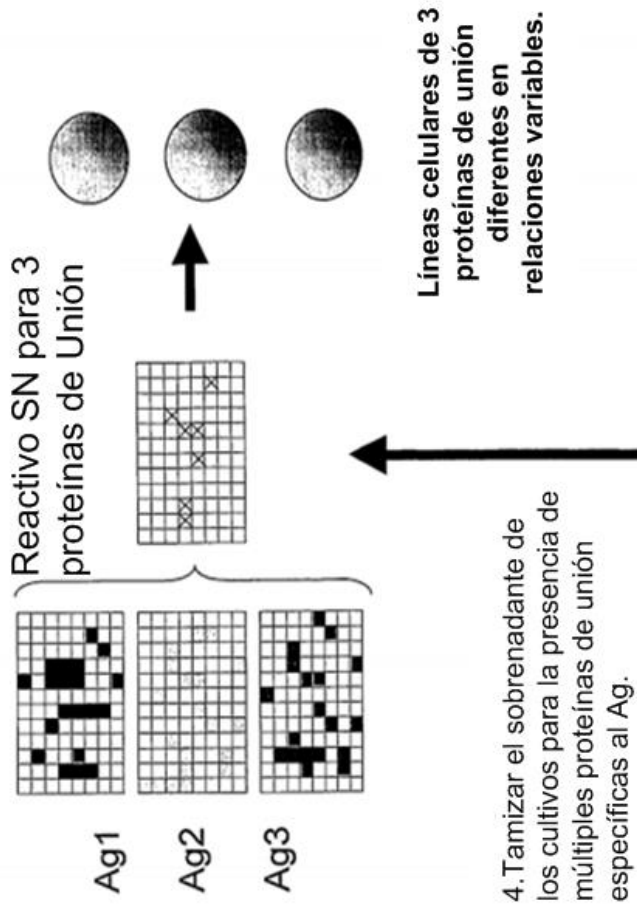
1. Transfectar en

lote los plásmidos en las células.

2. Seleccionar las células para la presencia de marcador de selección



Algunas células fabrican ~ 2-3 proteínas de unión diferentes en relaciones diferentes



4. Tamizar el sobrenadante de los cultivos para la presencia de múltiples proteínas de unión específicas al Ag.

3. Clonar las células para obtener líneas celulares clonadas positivas al marcador de selección.

Figura. 3

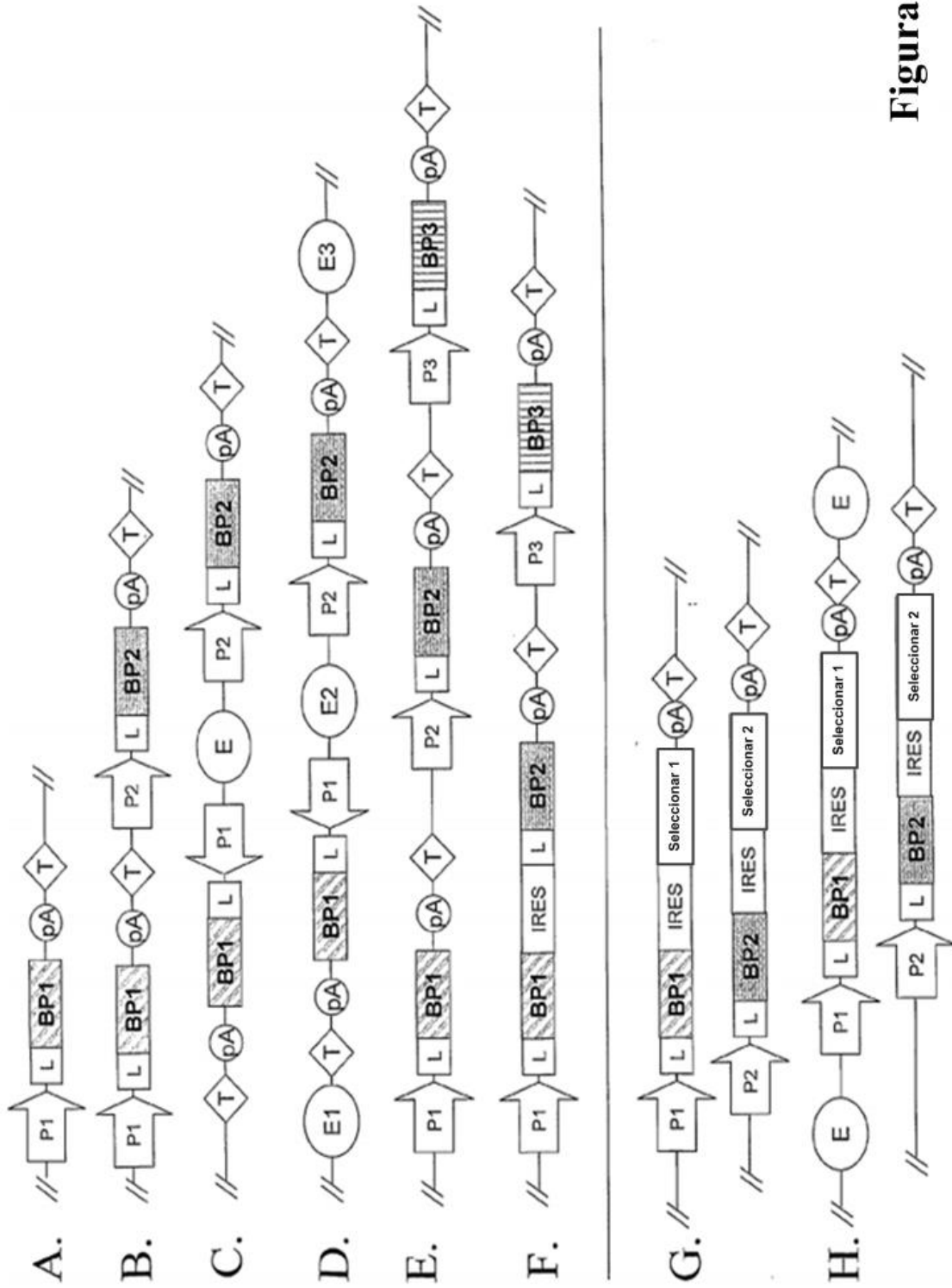


Figura. 4

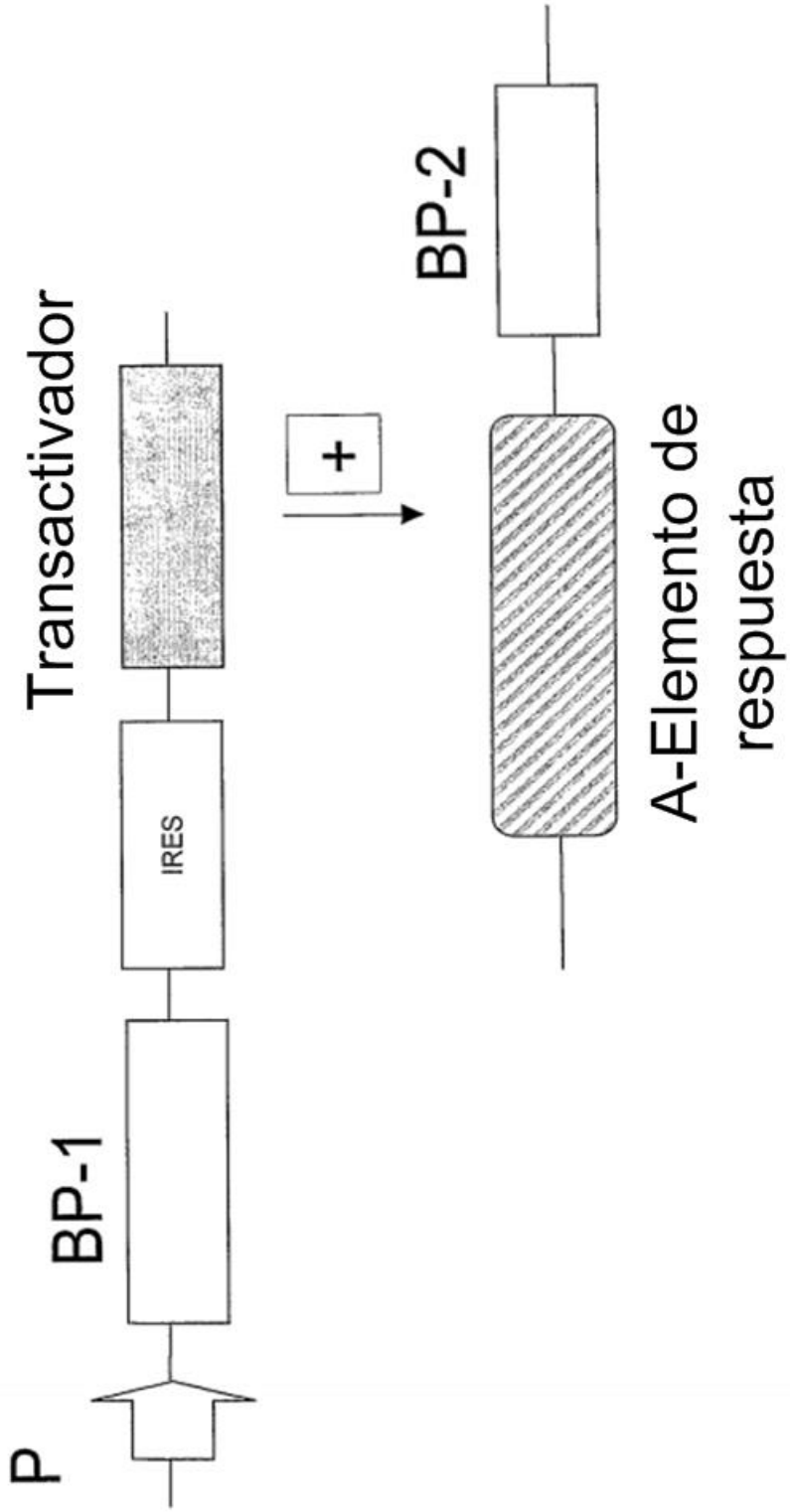


Figura. 5

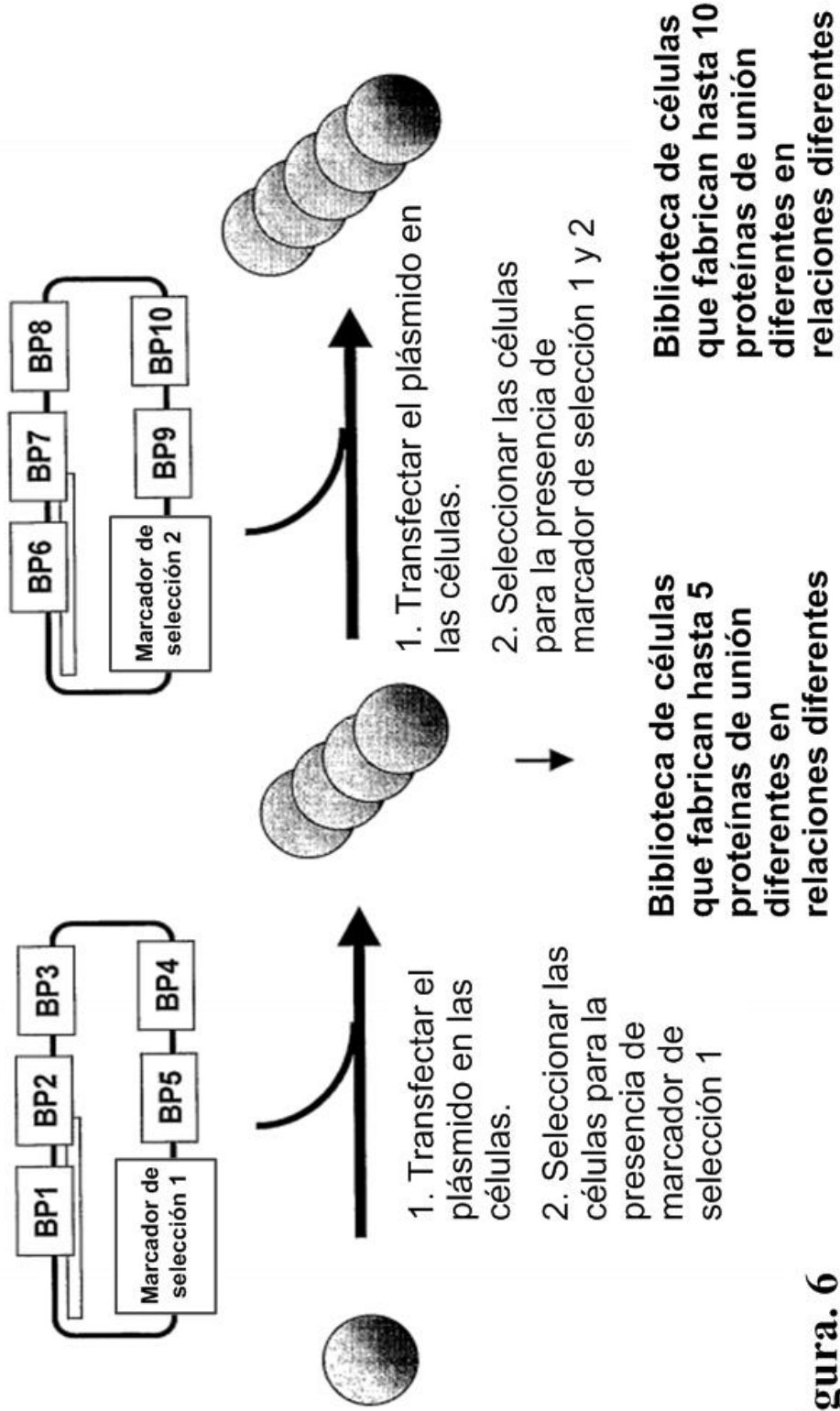


Figura. 6

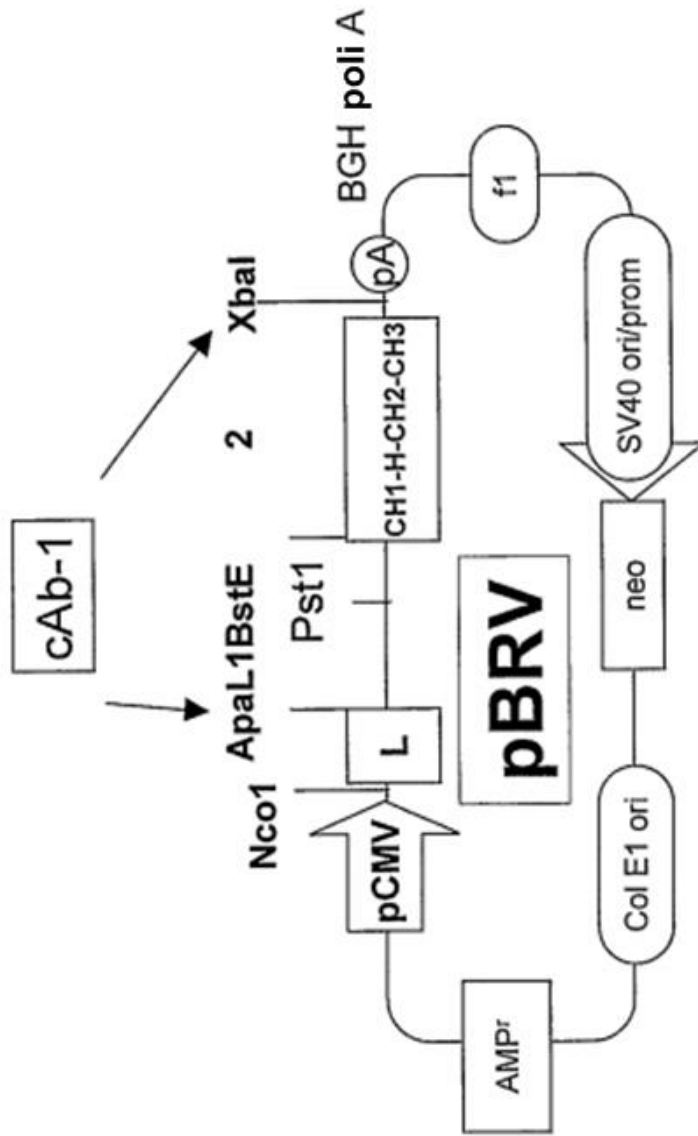


Figura. 7A

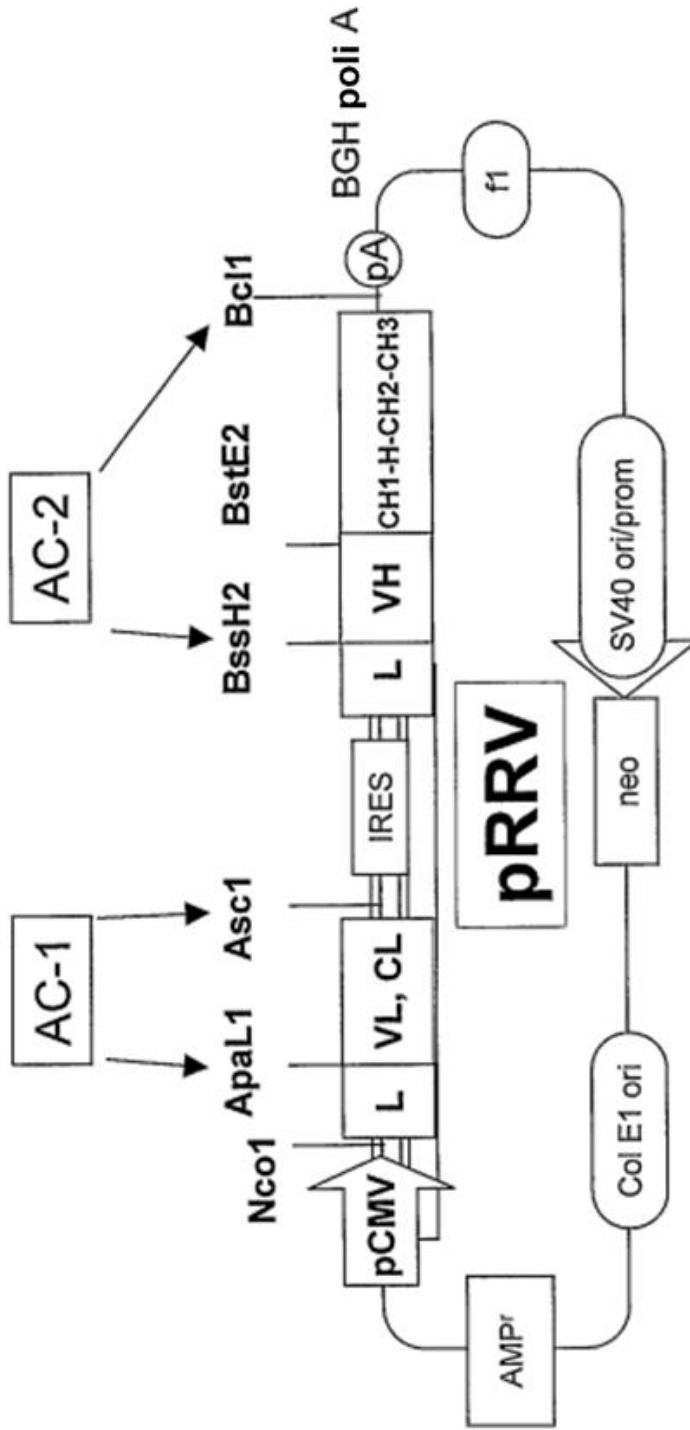


Figura. 7B

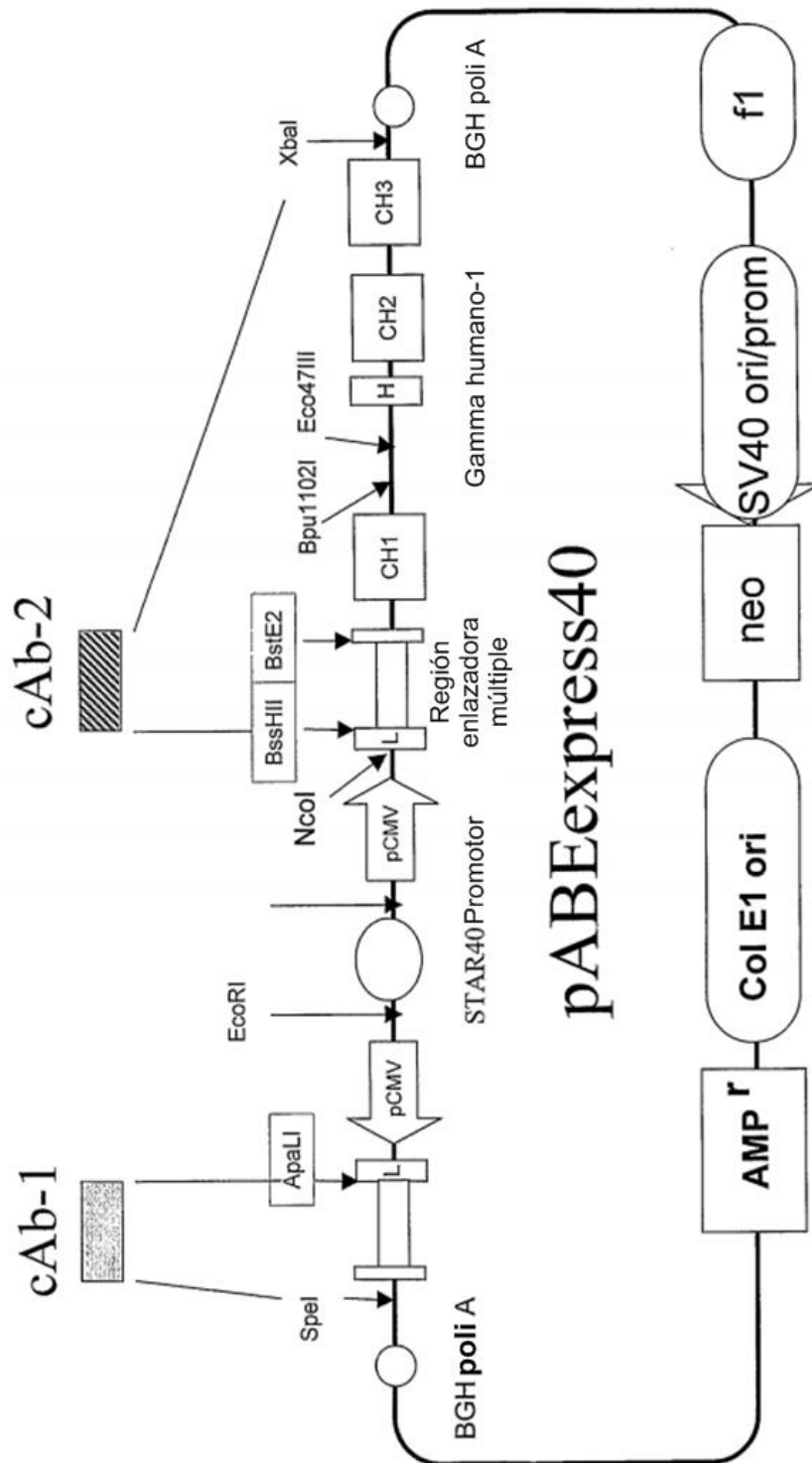


Figura. 7C

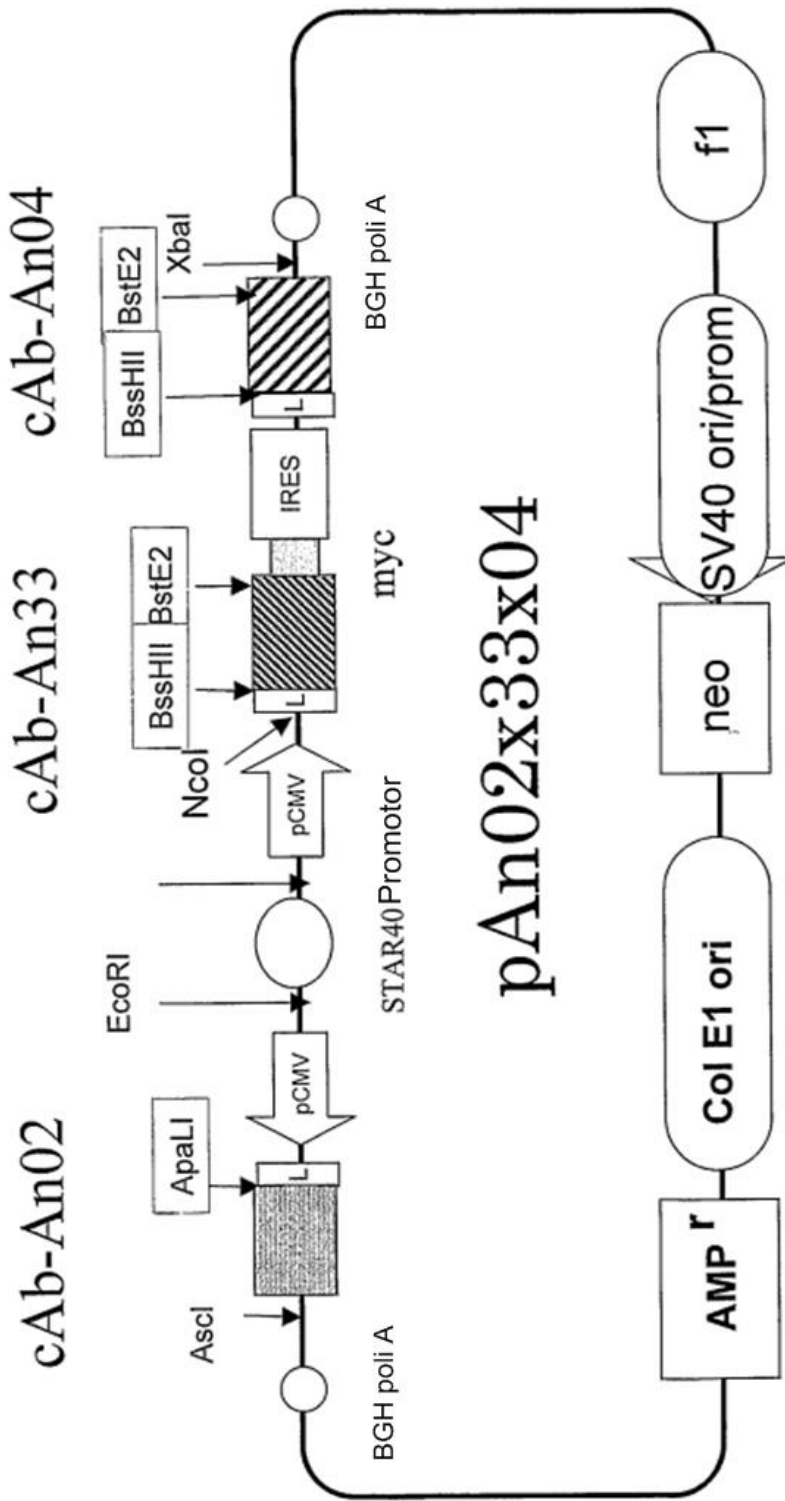


Figura. 8

Plásmido pSCFV-3

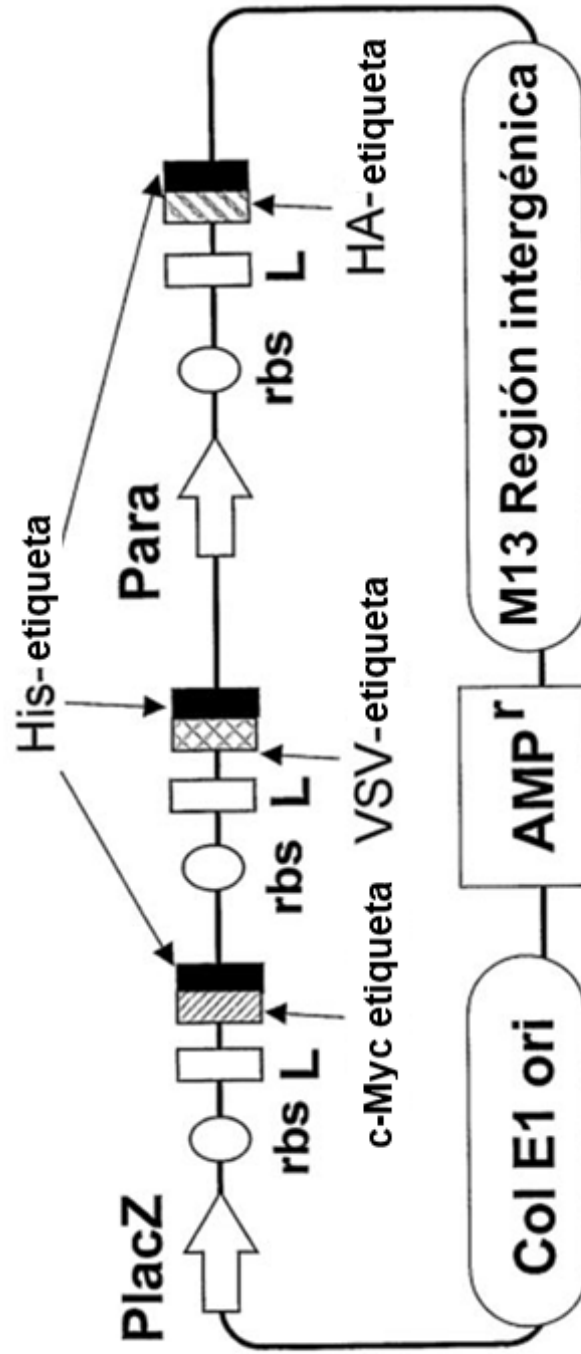


Figura. 9