

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 975 748**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
C40B 40/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2008 E 17159886 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2024 EP 3241842**

(54) Título: **Presentación de agentes de unión**

(30) Prioridad:

26.06.2007 US 946287 P
02.05.2008 US 49826 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2024

(73) Titular/es:

F-STAR THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Eddeva B920, Babraham Research Campus
Cambridge, CB22 3AT, GB

(72) Inventor/es:

HIMMLER, GOTTFRIED;
RÜKER, FLORIAN;
WOZNIAK-KNOPP, GORDANA;
MUDDE, GEERT y
REDL, GERDA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 975 748 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**Presentación de agentes de unión**

La invención se refiere a bibliotecas de dímeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares que comprende un dominio CH2 y un dominio CH3, capaz de unirse a una diana y a un ligando de armazón.

- 5 Se han usado ampliamente anticuerpos monoclonales como armazón para agentes de unión. La estructura de anticuerpo básica se explicará aquí usando como ejemplo una inmunoglobulina IgG1 intacta.
- 10 Se combinan dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos ligeras (L) idénticas para formar la molécula de anticuerpo en forma de Y. Las cadenas pesadas tienen cada una cuatro dominios. Los dominios variables del extremo amino (VH) están en las puntas de la Y. Éstos van seguidos de tres dominios constantes: CH1, CH2, y CH3 del extremo carboxílico, en la base del tallo de la Y. Un trecho corto, el cambio, conecta las regiones variables y constantes de las cadenas pesadas. La bisagra conecta CH2 y CH3 (el fragmento Fc) con el resto del anticuerpo (los fragmentos Fab). Pueden producirse un Fc y dos fragmentos Fab idénticos por escisión proteolítica de la bisagra en una molécula de anticuerpo intacto. Las cadenas ligeras se construyen de dos dominios, variable (VL) y constante (CL), separados por un cambio.
- 15 Los enlaces disulfuro en la región bisagra conectan las dos cadenas pesadas. La cadena ligera se acopla a las cadenas pesadas mediante enlaces disulfuro adicionales. Los restos de hidrato de carbono unidos en Asn están unidos en diferentes posiciones en dominios constantes dependiendo de la clase de inmunoglobulina. Para IgG1, dos enlaces disulfuro en la región bisagra, entre los pares Cys235 y Cys238, unen las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se acoplan a las cadenas pesadas por dos enlaces disulfuro adicionales, entre Cys229s en los dominios CH1 y Cys214s en los dominios CL. Los restos de hidrato de carbono están unidos a Asn306 de cada CH2, generando un bulto pronunciado en el tallo de la Y.
- 20 Estas características tienen profundas consecuencias funcionales. Las regiones variables de tanto las cadenas pesadas como ligeras (VH) y (VL) se encuentran en las "puntas" de la Y, donde están posicionadas para reaccionar con el antígeno. Esta punta de la molécula es el lado sobre el que el extremo N de la secuencia de aminoácidos se localiza. El tallo de la Y sobresale de una forma para mediar eficientemente en funciones efectoras tales como la activación del complemento y la interacción con receptores de Fc, o ADCC y ADCP. Sus dominios CH2 y CH3 sobresalen para facilitar la interacción con proteínas efectoras. El extremo C de la secuencia de aminoácidos se localiza en el lado opuesto de la punta, que puede llamarse la "parte inferior" de la Y.
- 25 Dos tipos de cadena ligera, llamadas lambda (λ) y kappa (κ), se encuentran en los anticuerpos. Una inmunoglobulina dada tiene o bien cadenas κ o bien cadenas λ , nunca una de las dos. No se ha encontrado diferencia funcional entre anticuerpos que tienen cadena ligera λ o κ .
- 30 Cada dominio en una molécula de anticuerpo tiene una estructura similar de dos hojas beta apiladas estrechamente la una contra la otra en un barril beta antiparalelo comprimido. Esta estructura conservada se llama el pliegue de inmunoglobulina. El pliegue de inmunoglobulina de los dominios constantes contiene una hoja de 3 hebras apilada contra una hoja de 4 hebras. El pliegue se estabiliza por el enlace de hidrógeno entre las hebras beta de cada hoja, por enlace hidrófobo entre restos de hojas opuestas en el interior, y por un enlace disulfuro entre las hojas. La hoja de 3 hebras comprende las hebras C, F y G, y la hoja de 4 hebras tiene las hebras A, B, E y D. Las letras A a G indican las posiciones secuenciales de las hebras beta a lo largo de la secuencia de aminoácidos del pliegue de inmunoglobulina.
- 35 35 El pliegue de dominios variables tiene 9 hebras beta dispuestas en dos hojas de 4 y 5 hebras. La hoja de 5 hebras es estructuralmente homóloga a la hoja de 3 hebras de dominios constantes, pero contiene las hebras C' y C'' adicionales. El resto de las hebras (A, B, C, D, E, F, G) tienen la misma topología y estructura similar como sus homólogos en los pliegues de inmunoglobulina de dominio constante. Un enlace disulfuro conecta las hebras B y F en hojas opuestas, como en dominios constantes.
- 40 40 Los dominios variables de tanto las cadenas de inmunoglobulina pesadas como ligeras contienen tres bucles hipervariables, o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las tres CDR de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDR son bucles que conectan hebras beta B-C, C'-C'' y F-G del pliegue de inmunoglobulina. Los restos en las CDR varían de una molécula de inmunoglobulina a la siguiente, confiriendo especificidad por antígeno a cada anticuerpo.
- 45 45 Los dominios VL y VH en las puntas de las moléculas de anticuerpo están estrechamente apilados de forma que las 6 CDR (3 en cada dominio) cooperen en la construcción de una superficie (o cavidad) para la unión específica al antígeno. Así, el sitio de unión al antígeno natural de un anticuerpo está compuesto por los bucles que conectan las hebras B-C, C'-C'' y F-G del dominio variable de la cadena ligera y las hebras B-C, C'-C'' y F-G del dominio variable de la cadena pesada.
- 50 50 Los bucles que no son bucles de CDR en una inmunoglobulina nativa, o no son parte del bolsillo de unión al antígeno como se ha determinado por los bucles de CDR y opcionalmente bucles adyacentes dentro de la región de bucles de CDR, no tienen especificidad de unión al antígeno o de unión al epítopo, pero contribuyen al correcto plegamiento de
- 55 55

la molécula de inmunoglobulina entera y/o sus funciones efectoras u otras y, por tanto, se llaman bucles estructurales con el fin de la presente invención.

Los documentos del estado de la técnica muestran que el armazón similar a inmunoglobulina ha sido empleado hasta la fecha con el fin de manipular el sitio de unión al antígeno existente, introduciendo así novedosas propiedades de unión. En la mayoría de los casos, las regiones CDR han sido manipuladas para la unión al antígeno, en otras palabras, en el caso del pliegue de inmunoglobulina, solo el sitio de unión al antígeno natural se ha modificado con el fin de cambiar su afinidad o especificidad de unión. Existe un amplio conjunto de bibliografía que describe diferentes formatos de tales inmunoglobulinas manipuladas, frecuentemente expresadas en forma de fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab, tanto presentados sobre la superficie de partículas de fago como solublemente expresados en diversos sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

El documento WO06072620A1 describe un método de manipulación de una inmunoglobulina que comprende una modificación en una región de bucle estructural para obtener nuevos sitios de unión al antígeno. Este método es ampliamente aplicable a inmunoglobulinas y puede usarse para producir una serie de inmunoglobulinas que se dirigen a varios antígenos. Se ha mostrado que una biblioteca de CH3 es útil para seleccionar ligantes específicos para un antígeno.

Aunque se ha descrito la presentación multivalente de proteínas en paquetes genéticos (tal como la clonación y presentación de fagos directa, presentación bacteriana, presentación en levadura), el estado de la técnica se refiere a la presentación monovalente monomérica de dominios de unión, en general. El documento WO9209690 describe partículas de fagémido que presentan una única copia de una proteína de fusión sobre la superficie de la partícula. Así, se describió obtener ligantes de alta afinidad de una biblioteca de partículas de fagémido, también llamados bacteriófagos. Se proporcionan vectores de expresión replicables que comprenden genes que codifican un polipéptido de unión y una proteína de la cubierta de fago para formar una fusión de gen que codifica una proteína de fusión, que es una proteína químérica de una partícula de fagémido, la proteína de la cubierta de fago y el polipéptido de unión.

El documento US5223409 describe en general el método de fusión de un gen que codifica una proteína de interés con el dominio del extremo N de la proteína de la cubierta del gen III del fago filamentoso M13. La fusión de gen se muta para formar una biblioteca de proteínas de fusión estructuralmente relacionadas que se expresan en baja cantidad sobre la superficie de una partícula de fagémido. Se emplean selección y cribado biológico para identificar ligandos novedosos útiles como candidatos a fármaco.

Sin embargo, hay algunas limitaciones en usar tal "fago de fusión" o presentación en fagos monovalente y proteínas de fusión individuales respectivas. Muchos biológicos se producen naturalmente en forma oligomérica. Con el fin de la presente invención, oligomérico significa formas poliméricas diméricas, triméricas o incluso superiores, hasta 24 monómeros.

Se describe que los fagos de fusión según el estado de la técnica muestran proteínas de fusión monoméricas, principalmente debido a que se creyó que los ligantes de afinidad más alta solo podrían seleccionarse de una biblioteca si proteínas de fusión individuales se presentaran por las partículas de fagémido. Las proteínas nativas frecuentemente se ensamblan, sin embargo, como un dímero o incluso a un grado de oligomerización más alto. Para obtener presentación dimérica con una proteína de fusión individual, se han desarrollado algunas técnicas que implican codones de terminación condicionales localizados entre la proteína de la cubierta y el polipéptido de unión (Dall'Acqua et al., *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 5171-5180). Así, se expresan monómeros solubles de los polipéptidos, además de aquellos fusionados con el fago, permitiendo así la formación de un dímero. Sin embargo, tales codones de terminación requieren la propagación en células huésped supresoras específicas que pueden traducir un codón de terminación en un aminoácido, para proporcionar una cantidad apropiada de proteínas de fusión, además de los polipéptidos de unión solubles. El documento WO 03/029456 describe el uso de vectores de presentación eucariotas multi-cadena para la selección de fragmentos Fab de inmunoglobulina sobre la superficie de células de levadura.

Las proteínas de fusión del estado de la técnica implican en algunos casos secuencias conectoras para presentar polipéptidos de unión más grandes. Normalmente se emplean secuencias conectoras de hasta 24 aminoácidos para fines estándar de presentar dominios variables de un anticuerpo. Véase, por ejemplo, el vector de presentación pCOMB3x (Hybrid. Hybridomics. 2003 Apr;22(2):97-108. Development of functional human monoclonal single-chain variable fragment antibody against HIV-1 from human cervical B cells. Berry JD, Rutherford J, Silverman GJ, Kaul R, Elia M, Gobuty S, Fuller R, Plummer FA, Barbas CF.)

Breve descripción de la invención

La invención es la establecida en las reivindicaciones.

La invención proporciona una biblioteca que contiene al menos 10^2 clones independientes de dímeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3, siendo dichos dímeros capaces de unir a una diana y a un ligando de armazón seleccionado del grupo que consiste en CD64, CD16, CD32, receptores Fc, FcRn, albúmina sérica, Proteína A, Proteína G y Proteína L, en el que el ligando de armazón se une al esqueleto del cada dímero independientemente de la especificidad por diana del dímero, y en el que unir al ligando de armazón al esqueleto del dímero indica que el dímero se expresa y se dobla correctamente, y en el que cada dímero

comprende un sitio de unión a antígeno para dicha diana en una región de bucle estructural del dominio CH2 o el dominio CH3.

Se puede presentar un paquete genético en un sistema celular o movilizado, en el que el sistema movilizado se puede seleccionar entre virus, fagos, fagémidos, sistemas de presentación in vitro, sistemas de ARNm y sistemas de presentación ribosómica. Alternativamente, se puede seleccionar un sistema celular usando levadura, células de mamífero, células bacterianas, esporas bacterianas o células de insecto.

Los oligómeros pueden formarse por motivos de oligomerización asociados a la estructura de dichos agentes, tales como cremalleras de leucina, enlaces disulfuro, motivos electrostáticos o hidrófobos.

Según la invención, los oligómeros son dímeros que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3.

10 El método descritos en el presente documento puede aplicarse a oligómeros que son polipéptidos con un sitio de unión diana que se dirige hacia la superficie del paquete genético y está próximo a dicha superficie que son biológicos, tales como polipéptidos.

Alternativamente, se emplea el diseño apropiado de un polipéptido con un sitio de unión que está más próximo a la superficie del paquete genético que al entorno de alrededor del paquete genético. Esto puede ser ventajoso para un polipéptido de unión con un posible sitio de unión que está más próximo al extremo C que al extremo N del polipéptido, en particular cuando el sitio de unión se manipula en una posición de bucle del extremo C. Cuando el posible sitio de unión se manipula en una posición que es adyacente al sitio donde la partícula de paquete genético está unida, por ejemplo a una estructura superficial de una célula o un virus, es ventajoso elegir una construcción estable con accesibilidad definida del componente de unión de dicho agente de unión. Las posiciones del bucle C-terminal son, por ejemplo, menos accesibles que las posiciones del bucle N-terminal, cuando están fusionadas al extremo N-terminal de la proteína 3 de un fago filamentoso porque están expuestas y en proximidad estérica al paquete genético.

Según la descripción, sin embargo, se proporciona una estructura definida, tal como una proteína de fusión oligomérica o dimérica verdadera, para permitir la eficiente manipulación del posible sitio de unión en una posición de bucle del extremo N. Un ejemplo se refiere a polipéptidos con al menos dos sitios de unión diana, posiblemente diseñados en el agente de unión a diana monomérico u oligomérico. En algunos ejemplos, la interacción entre las estructuras monoméricas permite variaciones adicionales de estructuras y, por lo tanto, sitios de unión potenciales adicionales..

El anticuerpo modular puede ser un fragmento Fc que comprende un sitio de unión en una posición de bucle estructural.

30 En caso de que el paquete genético sea un bacteriófago filamentoso, la estructura de fusión preferida empleada con un bacteriófago implica al menos parte de una proteína de la superficie exterior, tal como p3, p6 o p8; sin embargo, también se pueden usar p9 o p10.

En caso de que el paquete genético sea levadura, se prefiere que el oligómero sea una proteína de fusión que comprende una de las proteínas de receptores de la superficie de células de levadura seleccionadas del grupo que consiste en alfa-aglutinina, a-aglutinina, Aga1p, Aga2p o FLO1.

35 El paquete genético apropiado se proporciona preferiblemente en una forma particular y que contiene un vector que codifica al menos una de dichas proteínas de fusión. Un ejemplo es un vector de casete, que contiene secuencias que codifican una o más de una proteína de fusión operativamente unida al paquete genético. Así, al menos dos de las proteínas de fusión químéricas están unidas en la superficie de la partícula de vector. El vector puede ser, por ejemplo, un fagémido.

40 También se describe un sistema de expresión para expresar oligómeros de dominios de anticuerpos modulares unidos en la superficie de un paquete genético en el que los oligómeros están codificadas por un único gen y la proteína de fusión se presenta con al menos dos copias sobre la superficie del paquete genético.

Usando el método y medios descritos en el presente documento es posible presentar oligómeros de anticuerpos modulares sin la necesidad de expresión controlada de una forma soluble de uno de los componentes de oligomerización. La técnica puede utilizarse para moléculas tales como fragmentos de anticuerpos, incluso aquellos que contienen más de dos dominios de inmunoglobulina, por ejemplo al menos cuatro dominios de inmunoglobulina. Así, pueden evitarse construcciones difíciles que implican codones de terminación, tales como codones de terminación ámbar. No habrá necesidad de conseguir una mezcla de proteínas de fusión y monómeros solubles para la presentación de dímero. Así, puede fácilmente emplearse una técnica preferida de gestión de mezclas de varios agentes de unión, mientras que se reduce el riesgo de correspondencia insuficiente de los monómeros. También es posible evitar las cepas supresoras como una célula huésped. Células huésped convencionales, con función no supresora, pueden servir de forma estándar para propagar las proteínas de fusión oligoméricas.

La fusión entre el componente de unión y la proteína de la superficie del paquete genético puede ser tal que no está presente en el codón de terminación condicional (es decir, ningún codón de terminación condicional ámbar, ocre, ópalo u otro similar) entremedias. En tal situación, tras la infección con un fago auxiliar, el compañero de unión está presente

sólo como una proteína de fusión y no en forma soluble. Con el fin de que el dímero (trímero o superior) se forme sobre la superficie del paquete genético, el conector que conecta el componente de unión con el paquete genético necesita ser de longitud suficiente y flexibilidad suficiente. Conectores que cumplen este requisito pueden seleccionarse usando el método descrito anteriormente.

- 5 Se puede utilizar un fago auxiliar que tenga propiedades específicas que favorezcan la presentación de más de una copia de la proteína de fusión en la superficie del paquete genético. Un ejemplo de un fago auxiliar de este tipo es el llamado hiperfago (Rondot S, Koch J, Breitling F, Dubel S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. Nat Biotechnol. 2001 Jan;19(1) :75-78), que a su vez carece de p3 y, por lo tanto, depende totalmente de la proteína de fusión p3 proporcionada por el fágemido para ser infeccioso. El uso de tales fagos auxiliares conduce preferiblemente a partículas de fagos que portan más de una copia de la proteína de fusión en su superficie y, por lo tanto, favorece la formación de dímeros de la proteína de unión en la superficie del paquete genético.

Cada uno de los monómeros de proteína de fusión pueden prepararse en el contexto de un oligómero, de manera que la porción de agentes de unión solubles sea inferior al 20%, más preferiblemente inferior al 10%, lo más preferiblemente inferior al 1%.

- 10 15 Puede prepararse preferiblemente un paquete genético que presenta al menos dos proteínas de fusión. En un ejemplo específico, cada monómero del oligómero está unido a la superficie externa del paquete genético. La divulgación también proporciona fagos bivalentes que presentan dos proteínas de fusión de oligómeros, cada uno de los cuales contiene un oligómero que se dimeriza tras la expresión.

- 20 25 Se proporciona una biblioteca según las reivindicaciones se puede proporcionar que puede comprender a modo de ejemplo al menos 10 paquetes genéticos de variante, en la que dichos paquetes genéticos de variante pueden mostrar heterómeros de dominios de anticuerpos modulares.

El sitio de unión a la diana y el sitio de unión al armazón pueden ser similares o idénticos. El ligando de armazón se selecciona del grupo que consiste en CD64, CD16, CD32, receptores Fc, FcRn, albúmina sérica, Proteína A, Proteína G y Proteína L.

- 25 30 La biblioteca también puede contener variantes del oligómero producidas según la invención que tienen diferencias en la secuencia de aminoácidos.

35 Esto puede proporcionarse modificando las secuencias de aminoácidos por al menos una inserción o sustitución para introducir al menos un aminoácido extraño, y por una delección. Pueden introducirse aminoácidos extraños por una técnica de aleatorización. Los aminoácidos extraños también pueden seleccionarse de un grupo de aminoácidos específico para obtener una biblioteca enriquecida con aminoácidos específicos en las posiciones aleatorizadas. Cuando el aminoácido extraño se selecciona de un grupo de aminoácidos específicos, tales como aminoácidos con polaridad específica, o hidrofobia, puede obtenerse una biblioteca enriquecida en el grupo de aminoácidos específico en las posiciones aleatorizadas según la invención. Tales bibliotecas también se llaman bibliotecas "centradas".

- 35 40 También se describe en el presente documento un método de selección de un conector para la unión de un polipéptido a la superficie externa de un paquete genético, que comprende

- a. proporcionar una biblioteca de paquetes genéticos que contiene varios conectores para conectar un primer polipéptido al paquete genético,
- b. determinar el miembro de la biblioteca que contiene un conector que no interfiere significativamente con la función de dicho primer polipéptido, y
- c. seleccionar dicho conector para conectar un segundo polipéptido a dicho paquete genético.

Así, pueden obtenerse conectores adecuados que van a usarse para proteínas de fusión del mismo tipo. Por el mismo tipo de proteínas de fusión se indica aquellas que conectan los mismos formatos de paquetes genéticos y agente de unión entre sí.

- 45 Un método tal puede usarse además para preparar bibliotecas enriquecidas que contienen un grupo preseleccionado de variantes de conector que cumplen al menos un criterio de selección, tal como flexibilidad y accesibilidad estérica del sitio de unión al componente de unión. Esto puede determinarse midiendo las propiedades de unión de un agente de unión muy conocido en presencia de varias secuencias conectoras. La biblioteca enriquecida puede así seleccionarse adicionalmente para otro criterio, tal como resistencia a proteasas, que es, por ejemplo, importante para la estabilidad en un medio que contiene proteasas bacterianas.

- 50 55 La secuencia conectora específica seleccionada puede entonces usarse para preparar bibliotecas de proteínas de fusión del mismo formato, sin embargo, con variantes de los agentes de unión, permitiendo así la identificación, selección y preparación de aquellos agentes con las mejores propiedades de unión en sistemas de prueba predeterminados.

Un conector tal puede tener al menos 20 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 25 restos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 30 restos de aminoácidos, hasta 50 restos de aminoácidos. Especialmente, cuando

participan aminoácidos tales como Gly, Ser o Ala, que son responsables de la flexibilidad de un conector, un conector tal se usa ventajosamente para la presentación de un posible sitio de unión, que está próximo a la superficie del paquete genético y cuyo posible sitio de unión puede no ser capaz de unirse a su componente por motivos estéricos.

5 El conector entre la proteína que va a presentarse y la proteína de anclaje del paquete genético (en caso de fago filamento, por ejemplo, p3, p8, pX, pIX, pVII) es especialmente importante si el posible sitio de unión de la molécula presentada esté en proximidad espacial de la partícula de fago. En bibliotecas de anticuerpos que utilizan dominios variables y sitios de unión al antígeno formados por bucles de CDR y presentación de los miembros de biblioteca como fusión del extremo amino con p3, el posible sitio de unión al antígeno se dirige lejos de la partícula de fago. Por tanto, la estructura de conector entre miembros de biblioteca y la proteína de la cubierta de fago no es importante. El 10 manipular los bucles inferiores de los dominios de inmunoglobulina y realizar presentación en fagos puede, sin embargo, ser un proceso ineficiente y disminuir los rendimientos de clones de unión al antígeno o incluso descartarlos. Variar el conector entre una proteína miembro de biblioteca y su componente de fusión sobre la superficie puede resolver o puede al menos reducir este problema.

15 Con el fin de seleccionar secuencias conectoras óptimas (en términos de longitud y flexibilidad, además de estabilidad), puede prepararse una biblioteca de conectores en la que la proteína de anclaje en la superficie del paquete replicable genético está fusionada con una proteína de unión conocida que es, por motivos estéricos, notoriamente difícil de seleccionar.

20 Métodos de selección de la biblioteca de conectores para conectores óptimos dependen de la aplicación, pero básicamente deben ser para seleccionar todas las propiedades que se desea que tengan en una cierta metodología. El enriquecimiento contra un antígeno que es difícil de seleccionar puede dar secuencias conectoras que permiten a los miembros de biblioteca un buen acceso al antígeno. La incubación en soluciones de proteasa o bajo otras condiciones rigurosas o pase frecuente a través de células huésped bajo condiciones proteolíticas (por ejemplo, cultivos microbianos antiguos) puede ser una selección apropiada para conectores de presentación estables.

25 Puede producirse una biblioteca de conectores por cualquier tecnología de bibliotecas muy conocida. Longitudes de secuencia conectora sintética pueden variar entre 10-500 aminoácidos. Alternativamente, el conector puede ser proteínas completas conocidas por ser de naturaleza flexible.

También se describe en el presente documento un método de producción de un oligómero de dominios de anticuerpos modulares que se unen a una diana que comprende las etapas de:

- proporcionar una biblioteca de oligómeros de dominios de anticuerpos modulares producidos como se describe,
- 30 - poner en contacto dicha biblioteca con dicha diana en presencia de un ligando de armazón,
- seleccionar un miembro de biblioteca que se une a dicha diana en presencia de un ligando de armazón, y
- fabricar una preparación del oligómero funcional como se explica en la reivindicación 1.

35 El ligando de armazón puede seleccionarse del grupo que consiste en una molécula efectora, FcRn, albúmina de suero, proteína A, proteína G, proteína L o una diana de CDR. Como un ejemplo, la molécula efectora puede seleccionarse del grupo que consiste en CD64, CD16, CD32, receptores de Fc.

Los oligómeros pueden ser dímeros seleccionados del grupo de VH/VL, CH1/CL, CH2/CH2, CH3/CH3, Fc y Fab, o cadenas individuales del mismo.

40 El método puede proporcionar una biblioteca que contiene al menos 10^2 clones independientes que expresan oligómeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares o variantes de los mismos. El miembro de biblioteca puede entonces seleccionarse según la afinidad de unión solicitada, preferiblemente tiene una diana afinidad de unión de $K_d < 10^{-8}$ M. Un conjunto de clones independientes preseleccionados, que se madura, por ejemplo, por afinidad, conjunto que puede comprender preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos 10000, incluso más de 100000 clones independientes. Aquellas bibliotecas, que contienen los conjuntos preseleccionados, son fuentes preferidas para seleccionar los 45 anticuerpos modulares de alta afinidad según la invención.

Preferiblemente, la biblioteca es una biblioteca de levadura y la célula huésped de levadura presenta en la superficie de la célula los oligómeros con la actividad biológica. La célula huésped de levadura está seleccionada preferiblemente de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*. Lo más preferido, la célula huésped es *Saccharomyces cerevisiae*.

50 La diana puede ser un receptor de la clase erbB. En este caso, mediante el método descrito se puede obtener una inmunoglobulina que se une a un receptor de la clase erbB.

La invención además proporciona una biblioteca de alta calidad que contiene al menos 10^6 clones independientes de dímeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3, como se establece en la reivindicación 10. La diana puede ser un ligando que se une a una molécula parental sujetada a

variación de aminoácido. La molécula parental puede ser un Fc funcional o un Fab funcional, o parte del mismo.

Las moléculas parentales pueden variarse por mutagénesis aleatoria o específica de sitio.

La biblioteca puede contener dímeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares que están uniéndose a una diana y a un ligando de armazón, y al menos el 20%, preferiblemente al menos el 30%, más preferido al menos el 40% de los dímeros funcionales están uniéndose a CD64. Esto es particularmente preferido con un anticuerpo modular que contiene dominios CH2, tales como un armazón de Fc.

Alternativamente, la biblioteca puede contener dímeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares que están uniéndose a una diana y a un ligando de armazón, y al menos el 20%, preferiblemente al menos el 30%, más preferido al menos el 40% de los dímeros funcionales están uniéndose a proteína A. Esto es particularmente preferido con un anticuerpo modular que contiene dominios CH2 y CH3, tales como un armazón de Fc.

Figuras:

Figura 1:

Presentación esquemática de las PCR usadas para la producción de los fragmentos usados para el ensamblaje de la biblioteca Fcab01. Los cebadores de PCR se indican por flechas con su orientación 5'-3' respectiva, y las líneas verticales indican las posiciones aproximadas de los sitios de restricción introducidos que se usaron para el ensamblaje del gen mutado. Los sitios de restricción están contenidos en los cebadores para ligaciones de los fragmentos de PCR.

Figura 2:

Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria de un dominio CH3 (numeración de IMGT). El esquema de aleatorización se proporciona para las bibliotecas Fcab01 a Fcab06.

Posiciones aleatorizadas en el bucle AB y EF están marcadas con un círculo. X representan los 20 aminoácidos (codificados por NNB), z solo para Ala, Asp, Ser, Tyr (codificado por KMT; biblioteca centrada).

Descripción detallada de la invención

Los oligómeros de los dominios de anticuerpos modulares descritos en el presente documento serán útiles como moléculas independientes, además de proteínas de fusión o derivados, lo más normalmente fusionados antes o después de la modificación de tal forma que sean parte de estructuras más grandes, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas, o partes de las mismas. Las inmunoglobulinas o proteínas de fusión descritas en el presente documento también comprenden fragmentos Fc, fragmentos Fab, fragmentos Fv, anticuerpos de dominio único, en particular fragmentos Fv de dominio único, scFv bi- o multiespecífico, diacuerpos, unicuerpos, multicuerpos, multivalente o multímeros de dominios de inmunoglobulina y otros. Será posible usar las proteínas manipuladas para producir moléculas que son monoespecíficas, biespecíficas, triespecíficas, y pueden incluso llevar más especificidades. Es posible controlar y preseleccionar la valencia de unión al mismo tiempo según los requisitos de uso planeado de tales moléculas.

Términos específicos como se usan en toda la memoria descriptiva tienen el siguiente significado.

El término "inmunoglobulina" se define como polipéptidos o proteínas que puede presentar propiedades de unión mono- o bi- o multi-específicas, o mono-, bi- o multivalentes, preferiblemente al menos dos, más preferido al menos los tres sitios de unión específica para epítopos de, por ejemplo, antígenos, moléculas efectoras o proteínas tanto de origen patógeno como de estructura humana, como auto-antígenos que incluyen proteínas asociadas a célula o del suero. El término inmunoglobulina también incluye fragmentos funcionales de un anticuerpo, tales como Fc, Fab, scFv, dímeros monocatenarios de dominios CH1/CL, Fv, dímeros como VH/VL, CH1/CL, CH2/CH2, CH3/CH3, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas, como cadenas individuales de pares de dominios de inmunoglobulina. La definición incluye además dominios de las cadenas pesadas y ligeras de la región variable (tales como dAb, Fd, V1, Vk, Vh, VHH) y la región constante o dominios individuales de un anticuerpo intacto tal como CH1, CH2, CH3, CH4, Cl y Ck, además de mini-dominios que consisten en al menos dos hebras beta de un dominio de inmunoglobulina conectado por un bucle estructural.

"Anticuerpos modulares" se definen como moléculas de unión al antígeno, como anticuerpos humanos, compuestos de al menos un módulo de polipéptido o dominio de proteína, preferiblemente en la forma natural. El término "anticuerpos modulares" incluye moléculas de unión al antígeno que son tanto inmunoglobulinas, proteínas similares a inmunoglobulinas, como otras proteínas que presentan formatos modulares y propiedades de unión al antígeno similares a inmunoglobulinas o anticuerpos, que pueden usarse como armazones de unión al antígeno, preferiblemente basados en proteínas humanas.

El término "molécula similar a inmunoglobulina" se refiere a cualquier proteína de unión al antígeno, en particular a una proteína humana, que tiene una estructura de dominio que puede estar construida de una forma modular. Las moléculas similares a inmunoglobulina incluyen receptores de linfocitos T (TCR), fibronectina, transferrina, CTLA-4, receptores de antígeno monocatenario, por ejemplo aquellos relacionados con receptores de linfocitos T y anticuerpos,

miméticos de anticuerpos, adnectinas, anticalinas, filómeros, proteínas de repetición tales como repeticiones de anquirina, avímeros, VersabodiesTM, moléculas basadas en toxina de escorpión, y otros armazones de proteína no de anticuerpo con propiedades de unión al antígeno.

5 Las proteínas de repetición de anquirina (AR), repetición de armadillo (ARM), repetición rica en leucina (LRR) y repetición de tetratricopeptido (TPR) son los miembros más importantes de la clase de proteínas de proteínas de repetición. Las proteínas de repetición están compuestas de unidades estructurales homólogas (repeticiones) que se apilan para formar dominios alargados. La interacción de unión está normalmente mediada por varias repeticiones adyacentes, que conducen a grandes superficies de interacción diana.

10 Los abímeros contienen dominios A como cuerdas de múltiples dominios en varios receptores de la superficie celular. Los dominios de esta familia se unen naturalmente a 100 dianas conocidas diferentes, que incluyen moléculas pequeñas, proteínas y virus. El análisis de truncación ha mostrado que una diana normalmente se pone en contacto por múltiples dominios A uniéndose cada dominio independientemente a un epítopo único. La avidez generada combinando múltiples dominios de unión es un enfoque poderoso para aumentar la afinidad y especificidad, que estos receptores han explotado durante la evolución.

15 Las anticalinas son proteínas humanas manipuladas derivadas del armazón de lipocalina con propiedades de unión definidas típicas para anticuerpos humanizados. Las lipocalinas comprenden 160-180 aminoácidos y forman proteínas cónicas de barril beta con un bolsillo de unión a ligando rodeado por cuatro bucles. Los compuestos hidrófobos pequeños son los ligandos naturales de las lipocalinas, y podrían aislarse diferentes variantes de lipocalina con nuevas especificidades de compuesto (también llamadas 'anticalinas') después de aleatorizar restos en este bolsillo de unión.

20 Los receptores de antígeno de una sola cadena o de un solo dominio contienen un único dominio variable y son el 20% más pequeños que los anticuerpos de un solo dominio de camélido.

Los filómeros son péptidos derivados de fragmentos de proteínas naturales biodiversas.

25 Se entiende que el término "anticuerpo modular", "inmunoglobulina", "proteínas similares a inmunoglobulina" incluyen un derivado de los mismos también. Un derivado es cualquier combinación de uno o más anticuerpos y o una proteína de fusión en la que cualquier dominio o minidominio del anticuerpo modular puede fusionarse en cualquier posición de una o varias de otras proteínas (tales como otras anticuerpos modulares, inmunoglobulinas, ligandos, proteínas de armazón, enzimas, toxinas y similares). Un derivado de la anticuerpo modular también puede obtenerse por asociación o unión a otras sustancias por diversas técnicas químicas tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática, enlace disulfuro, etc. Las otras sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, hidratos 30 de carbono, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas, o cualquier combinación de las mismas (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también comprendería un anticuerpo con la misma secuencia de aminoácidos, pero hecha completamente o parcialmente de aminoácidos no naturales o químicamente modificados.

35 Un "bucle estructural" o "bucle no de CDR" debe entenderse del siguiente modo: anticuerpos modulares, inmunoglobulinas o sustancias similares a inmunoglobulina están hechos de dominios con un llamado pliegue de inmunoglobulina. En esencia, hebras de hojas beta antiparalelas están conectadas por bucles para formar un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, algunos de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión a un antígeno por el sitio de unión natural de un anticuerpo. Estos bucles se llaman bucles de CDR. Los bucles de CDR están localizados dentro de la región de bucle de CDR, que en algunos casos también pueden incluir la región estructural variable (llamada "VFR") que es adyacente a los bucles de CDR. Se sabe que las VFR pueden contribuir al bolsillo de unión al antígeno de un anticuerpo, que generalmente se determina principalmente por los bucles de CDR. Así, aquellas VFR se consideran como parte de la región de bucle de CDR, y no se usarían apropiadamente para manipular nuevos sitios de unión al antígeno. Al contrario de aquellas VFR dentro de la región de bucle de CDR o localizadas próximas a los bucles de CDR, otras VFRs de dominios variables serían particularmente adecuadas. Aquellos son los bucles estructurales de las VFR localizadas opuestas a la región de bucle de CDR, o en lado del extremo C de un dominio de inmunoglobulina variable.

40 El término "antígeno" o "diana" debe en particular incluir todos los antígenos y moléculas diana capaces de ser reconocidos por un sitio de unión de un anticuerpo modular. Antígenos específicamente preferidos son aquellos antígenos o moléculas, que ya han demostrado ser o son capaces de ser inmunológica o terapéuticamente relevantes, especialmente aquellos para los que se ha probado una eficacia clínica.

45 50 El término "diana" o "antígeno", como se usa en el presente documento, debe comprender moléculas seleccionadas del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumor, auto-antígenos que incluyen receptores de la superficie celular, enzimas, receptores de Fc, FcRn, HSA, IgG, interleucinas o citocinas, proteínas del sistema del complemento, proteínas de transporte, moléculas de suero, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y antígenos virales, también moléculas responsables de la encefalitis espongiforme transmisible (TSE), tales como priones, infectivos o no, y marcadores o moléculas que se refieren a afecciones inflamatorias, tales como factores proinflamatorios, esclerosis múltiple o enfermedad de Alzheimer, o incluso haptenos.

55 El término "antígenos de superficie celular" debe incluir todos los antígenos capaces de ser reconocidos por una estructura de anticuerpo sobre la superficie de una célula, y fragmentos de tales moléculas. Antígenos de superficie

celular preferidos son aquellos antígenos, que ya han demostrado ser o que son capaces de ser inmunológica o terapéuticamente relevantes, especialmente aquellos para los que se ha probado una eficacia preclínica o clínica. Aquellas moléculas de la superficie celular que pueden mediar en la actividad de destrucción celular. Tras la unión de la inmunoglobulina a preferiblemente al menos dos de aquellas moléculas de la superficie celular, el sistema inmunitario proporciona citólisis o muerte celular, así puede proporcionarse un medio potente para atacar células humanas.

El antígeno es tanto reconocido como una molécula diana completa o como un fragmento de tal molécula, especialmente subestructuras de dianas, generalmente denominados epítopos.

Las subestructuras de antígenos se denominan generalmente "epítopos" (por ejemplo, epítopos de linfocitos B, epítopos de linfocitos T), en tanto que son inmunológicamente relevantes, es decir, también son reconocibles por anticuerpos naturales o monoclonales. El término "epítopo", como se usa en el presente documento debe significar una estructura molecular que puede constituir completamente un componente de unión específica o ser parte de un componente de unión específica a un sitio de unión de un anticuerpo modular o una inmunoglobulina. El término epítopo puede también referirse a haptenos. Químicamente, un epítopo puede tanto estar compuesto de un hidrato de carbono, un péptido, un ácido graso, una sustancia orgánica, bioquímica o inorgánica, como derivados de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Si un epitopo es un polipéptido, normalmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferiblemente 8 a 50 aminoácidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 10-20 aminoácidos en el péptido. No hay límite superior crítico a la longitud del péptido, que podría comprender casi la longitud completa de una secuencia de polipéptidos de una proteína. Los epítopos pueden ser tanto epítopos lineales como conformacionales. Un epítopo lineal comprende un único segmento de una secuencia primaria de una cadena de polipéptidos. Los epítopos lineales pueden estar contiguos o solaparse. Los epítopos conformacionales comprenden aminoácidos puestos juntos por plegamiento del polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no están necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal. Específicamente, los epítopos son al menos parte de moléculas diagnósticamente relevantes, es decir, la ausencia o presencia de un epítopo en una muestra está cualitativa o cuantitativamente relacionada con tanto una enfermedad como con el estado de salud de un paciente o con estado de proceso en la fabricación o con estado medioambiental o alimenticio. Los epítopos también pueden ser al menos parte de moléculas terapéuticamente relevantes, es decir, moléculas que pueden ser elegidas como diana por el dominio de unión específico que cambia el curso de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "se une específicamente a" o "unión específica" se refiere a una reacción de unión que es determinante del ligando de interés relacionado en una población heterogénea de moléculas. Así, bajo condiciones designadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo), el anticuerpo modular se une a su diana particular y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. La unión específica significa que la unión es selectiva en términos de identidad de la diana, afinidad de unión o avidez alta, media o baja, como se selecciona. La unión selectiva se logra normalmente si la constante de unión o dinámica de unión es al menos 10 veces diferente, preferiblemente la diferencia es al menos 100 veces, y más preferida al menos 1000 veces.

El término "sistema de expresión" se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de control en enlace operativo, de manera que huéspedes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Con el fin de efectuar la transformación, el sistema de expresión puede incluirse en un vector; sin embargo, el ADN relevante también puede integrarse en el cromosoma del huésped. Alternativamente, puede usarse un sistema de expresión para la transcripción/traducción *in vitro*. El sistema de expresión puede emplear una célula huésped que es tanto una célula huésped eucariota como procariota, tal como una célula huésped de mamífero o de levadura, además de una célula huésped bacteriana.

Un sistema de expresión para las proteínas de fusión es una célula huésped no supresora, que sería sensible a un codón de terminación, tal como un codón de terminación ámbar, y así detendría la traducción a partir de aquí. En ausencia de un codón de terminación tal, se usan preferiblemente tales células huésped no supresoras, preferiblemente *E. coli*. En presencia de un codón de terminación tal se usarían células huésped supresoras.

Toda la numeración de las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas es según el esquema de numeración de IMGT (IMGT, the international ImMunoGeneTics, Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212).

El término "agente de unión" o "ligando" se refiere a un miembro de un par de unión, en particular polipéptidos de unión que tienen el potencial de servir de dominio de unión para un componente de unión. Ejemplos de componentes de unión incluyen pares de agentes de unión con interacciones funcionales, tales como receptor que se une a ligandos, anticuerpo que se une a antígeno o receptores, un fármaco que se une a una diana, y enzima que se une a un sustrato

El término "proteína de fusión" o "proteína de fusión químérica" debe significar la molécula compuesta de un paquete genético, al menos parte de una estructura de superficie externa, tal como una proteína de la cubierta o parte de la misma, opcionalmente una secuencia conectora, y un agente de unión. La proteína de fusión está codificada por un vector con el gen del agente de unión e información para presentar una copia del agente de unión en la superficie del paquete genético.

El término "actividad citotóxica" debe significar la actividad en células efectoras que produce la activación de linfocitos

T citotóxicos o en células, que median en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP). Anticuerpos modulares destruyen así células diana recubiertas de anticuerpo, que opcionalmente se unen con sus receptores de Fc.

- 5 "Armazón" debe significar una región estructural temporal tanto natural como artificial usada para soportar la estructura molecular de un polipéptido en la construcción de variantes o un repertorio del polipéptido. Es normalmente un sistema modular de dominios de polipéptido que mantiene la estructura terciaria o la función de la molécula parental. Armazones a modo de ejemplo son anticuerpos modulares, que pueden ser mutagenizados para producir variantes dentro de dicho armazón, para obtener una biblioteca.
- 10 El término "ligando de armazón" debe significar un ligando que se une a un armazón o el esqueleto de anticuerpos modulares, determinando así la estructura molecular o función primaria y especificidad de dicho anticuerpo modular. En casos preferidos, el ligando de armazón es un ligando funcional, que media en una función biológica tras la unión, como un ligando efector. En una realización alternativa, el ligando de armazón es un ligando funcional, que es una diana específica unida por la región CDR, región de bucle no estructural, o región de bucle estructural. El mismo ligando de armazón puede unirse a muchas variantes de un anticuerpo modular independientemente de sus 15 especificidades por diana. En general, la presencia del sitio de unión a ligando de armazón indica que la variante se expresa y se pliega correctamente. Así, la unión del ligando de armazón a su sitio de unión proporciona un método de preselección de polipéptidos funcionales de un repertorio de polipéptidos. El diseño de variantes de anticuerpos modulares que mantienen la propiedad de unión a un ligando de armazón evita la preparación de variantes que son no funcionales, por ejemplo como resultado de la introducción de mutaciones, mutantes de plegamiento o mutantes 20 de expresión que serían o son incapaces de unirse a sustancialmente cualquier diana o ligando efector. Tales mutantes no funcionales se generan algunas veces por los procedimientos de aleatorización y variación normales empleados en la construcción de repertorios de polipéptidos. El proporcionar mutantes funcionales que se unen a un ligando de armazón permite al experto en la materia preparar una biblioteca de anticuerpos modulares que está enriquecida en miembros de biblioteca funcionales, bien plegados y altamente expresados.
- 25 El término "ligando efector" debe significar un ligando que media en funciones efectoras, como una molécula efectora. Ligandos efectores a modo de ejemplo son receptores de Fc o moléculas similares a receptores de Fc que interfieren con inmunoglobulinas. Un receptor de Fc es una proteína encontrada en la superficie de ciertas células - que incluyen linfocitos citolíticos espontáneos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos - que contribuyen a las funciones protectoras del sistema inmunitario. Su nombre se deriva de su especificidad de unión por una parte de un anticuerpo conocido 30 como la región Fc (fragmento cristalizable). Los receptores de Fc se unen a anticuerpos que están unidos a células infectadas o que invaden patógenos. Su actividad estimula células fagocíticas o citotóxicas para destruir microbios, o células infectadas por fagocitosis celular mediada por anticuerpo (ADCP) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Hay varios tipos diferentes de receptores de Fc, que se clasifican basándose en el tipo de anticuerpo que reconocen; aquellos que se unen a la clase más común de anticuerpo, IgG, se llaman receptores de Fc-gamma 35 (FcγR), aquellos que se unen a IgA se llaman receptores de Fc-alfa (FcαR) y aquellos que se unen a IgE se llaman receptores de Fc-épsilon (FcεR). Equivalente a un ligando efector y así incorporado en la definición está cualquier ligando sustituto que reconoce el mismo o sitio de unión similar dentro del anticuerpo modular, tal como la proteína A.
- 40 Todos los FcγR pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y son los receptores de Fc más importantes para inducir fagocitosis de microbios opsonizados (recubiertos). Esta familia incluye varios miembros que se diferencian en sus afinidades por anticuerpo debido a su diferente estructura molecular: FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32a), FcγRIIB (CD32b), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b). Por ejemplo, FcγRI se une a IgG más fuertemente que FcγRII y FcγRIII, y tiene una porción extracelular compuesta de tres dominios similares a inmunoglobulina (Ig), un dominio más que FcγRII y FcγRIII. Estas propiedades permiten la activación de FcγRI por una única molécula de IgG (o monómero), mientras que los dos últimos receptores de Fc deben unirse a múltiples moléculas de IgG dentro de un complejo inmunitario que va a activarse.
- 45 Otro FcR se expresa en múltiples tipos de células y es similar en estructura a la clase I del MHC. Este receptor también se une a IgG y participa en la preservación de este anticuerpo con el fin de aumentar su semivida biológica *in vivo*. Sin embargo, como este receptor de Fc también participa en transferir IgG de una madre tanto mediante la placenta a su feto como en la leche a su lactante, se llama el receptor neonatal de Fc (FcRn). Recientemente, este receptor participa en estar implicado en la homeostasis de niveles en suero de IgG.
- 50 La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) es un mecanismo de inmunidad celular por el cual una célula efectora del sistema inmunitario lisa activamente una célula diana que ha sido unida por anticuerpos específicos. Es uno de los mecanismos mediante los cuales los anticuerpos, como parte de la respuesta inmunitaria humorral, pueden actuar para limitar y contener la infección. La ADCC clásica está mediada por linfocitos citolíticos espontáneos (NK); monocitos y eosinófilos también pueden mediar en ADCC. Por ejemplo, los eosinófilos pueden destruir ciertos gusanos parásitos conocidos como helmintos mediante ADCC. La ADCC es parte de la respuesta inmunitaria adaptativa debido a su dependencia de una respuesta de anticuerpos previa.
- 55 El término "extraño" en el contexto de los aminoácidos debe significar los aminoácidos recientemente introducidos que existen de forma natural, pero extraños al sitio de modificación, o sustitutos de aminoácidos que existen de forma natural. "Extraño", con referencia a un sitio de unión al antígeno, significa que el sitio de unión al antígeno no se forma

naturalmente por la región de unión específica del agente, y un componente de unión extraño, pero no el componente de unión natural del agente, se une por el sitio de unión recientemente manipulado.

El término "región de unión variable", llamado algunas veces "región CDR" como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas con estructuras variables capaces de interacciones de unión con antígenos. Aquellas moléculas pueden usarse como tales o integrarse dentro de una proteína más grande, formando así una región específica de tal proteína con función de unión. Las estructuras variables pueden derivarse de repertorios naturales de proteínas de unión tales como inmunoglobulinas o filómeros o diversidad sintética, que incluyen proteínas de repetición, avímeros o anticalinas. Las estructuras variables pueden también producirse por técnicas de aleatorización, en particular aquellas descritas en el presente documento. Éstas incluyen regiones CDR mutagenizadas o no de CDR, regiones de bucle de dominio variable de inmunoglobulinas o dominios constantes.

Agentes de unión modificados con diferentes modificaciones en sitios específicos se denominan "variantes". Las variantes de un armazón se agrupan preferiblemente para formar bibliotecas de agentes de unión, que pueden usarse para seleccionar miembros de la biblioteca con funciones predeterminadas. Según esto, una región de bucle de un agente de unión que comprende posiciones dentro de uno o más bucles que contribuyen posiblemente a un sitio de unión se muta o modifica preferiblemente para producir bibliotecas, preferiblemente por métodos de mutagénesis aleatoria, semi-aleatoria o, en particular, por mutagénesis al azar dirigida a sitio, en particular para deletrear, intercambiar o introducir insertos aleatoriamente generados en bucles, preferiblemente en bucles estructurales. Alternativamente se prefiere el uso de enfoques combinatorios. Puede emplearse cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, entre ellos la mutagénesis en casete. Estos métodos pueden usarse para hacer modificaciones de aminoácidos en las posiciones deseadas de la inmunoglobulina. En algunos casos, las posiciones se eligen al azar, por ejemplo con tanto cualquiera de los posibles aminoácidos como una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar secuencias de bucle, o se hacen cambios de aminoácidos usando reglas simples. Por ejemplo, todos los residuos pueden mutarse preferiblemente a aminoácidos específicos, tales como alanina, denominado barrido de aminoácidos o de alanina. Tales métodos pueden acoplarse con enfoques de ingeniería más sofisticados que emplean métodos de selección para cribar niveles más altos de diversidad de secuencia.

El anticuerpo modular citotóxico con un peso molecular inferior a 60 kD o hasta 60 kD que tiene un pequeño en comparación con los anticuerpos de longitud completa. El tamaño preferido es hasta 55 kD. Los dominios individuales de anticuerpo modular normalmente tienen un tamaño molecular de 10-15 kD, así una molécula basada en 4 dominios de anticuerpos modulares tendría un tamaño molecular de 40-60 kD, dependiendo de la glucosilación o cualquier conjugación adicional de sustancias farmacológicamente activas, como toxinas o péptidos.

El formato preferido es un oligómero, compuesto de dominios de anticuerpos modulares, preferiblemente hasta 4 dominios, más preferido 3 dominios, e incluso más preferido constituido de 2 dominios. Se cree comúnmente que los formatos basados en la combinación de 5 dominios de anticuerpos modulares o más no ejercen las ventajas específicas de fragmentos de anticuerpos de tamaño pequeño, que son, por ejemplo, facilidad de expresión en diversos sistemas de expresión y penetración de tejido.

Es factible proporcionar un anticuerpo modular como anticuerpo de un solo dominio. Sin embargo, los dominios de anticuerpo tienden a dimerizar tras la expresión, bien como un homodímero, como un Fc, o bien como un heterodímero, como un Fab. Así, la estructura dimérica es considerada como una base para la molécula estable preferida. Los dímeros de dominios de inmunoglobulina incluyen un solo dominio, como VH/VL, CH1/CL (kappa o lambda), CH2/CH2 y CH3/CH3. También pueden proporcionarse dímeros u oligómeros de dominios de anticuerpos modulares como moléculas de una sola cadena o de dos cadenas, en particular aquellos que unen el extremo C de un dominio al extremo N de otro.

Los componentes de unión son agentes que se unen específicamente entre sí, normalmente mediante interacciones no covalentes. Ejemplos de componentes de unión incluyen pares de agentes de unión con interacciones funcionales, tales como receptor que se une a ligandos, anticuerpo que se une a antígeno, un fármaco que se une a una diana, y enzima que se une a un sustrato. Los componentes de unión han encontrado uso en muchas aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, analíticas e industriales. Los componentes de unión más importantes, también llamados pares de unión, son anticuerpos o inmunoglobulinas, fragmentos o derivados de los mismos. En la mayoría de los casos, se requiere la unión de tales agentes de unión para mediar en un efecto biológico o una función, una "interacción funcional".

Un agente de unión puede ser una inmunoglobulina de origen humano o murino, y puede emplearse para diversos fines, en particular en composiciones farmacéuticas. Por supuesto, la inmunoglobulina modificada también puede ser una inmunoglobulina humanizada o química.

El agente de unión que es una inmunoglobulina humana está seleccionado preferiblemente o se deriva del grupo que consiste en IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM. El agente de unión de inmunoglobulina murina está seleccionado preferiblemente o se deriva del grupo que consiste en IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3 e IgM.

Un agente de unión tal comprende preferiblemente una cadena pesada y/o ligera o una parte de la misma. Una

inmunoglobulina modificada puede comprender una cadena pesada y/o ligera, al menos un dominio variable y/o constante, o una parte del mismo que incluye un minidominio.

Un dominio constante es una unidad de pliegue de inmunoglobulina de la parte constante de una molécula de inmunoglobulina, también denominada un dominio de la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4, Ck, Cl).

5 Un dominio variable es una unidad de pliegue de inmunoglobulina de la parte variable de una inmunoglobulina, también denominado un dominio de la región variable (por ejemplo, Vh, Vk, Vl, Vd)

Un anticuerpo modular a modo de ejemplo consiste en un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, IgI-C, combinaciones, derivados o una parte de los mismos, que incluye un mini-dominio, con al menos una región de bucle, y se caracteriza por que dicha al menos una región de bucle comprende al menos 10 una modificación de aminoácidos que forma al menos una región de bucle modificada, en el que dicha al menos una región de bucle modificada se une específicamente a al menos una región de bucle modificada se une específicamente a al menos un epítopo de un antígeno.

Otro anticuerpo modular puede consistir en un dominio variable de una cadena pesada o ligera, combinaciones, derivados o una parte de los mismos, que incluye un minidominio, con al menos una región de bucle, y se caracteriza por que dicha al menos una región de bucle comprende al menos una modificación de aminoácidos que forma al menos 15 una región de bucle modificada, en el que dicha al menos una región de bucle modificada se une específicamente a al menos un epítopo de un antígeno.

El anticuerpo modular puede comprender uno o más dominios (por ejemplo al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, diez dominios). Si está presente más de un dominio en el anticuerpo modular, estos dominios pueden ser del mismo tipo o de tipos variables (por ejemplo, CH1-CH1-CH2, CH3-CH3, (CH2)₂-(CH3)₂, con o sin la región bisagra). Por supuesto, también el orden de los dominios individuales puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, CH1-CH3-CH2, 20 CH4-CH1-CH3-CH2).

En el presente documento se describen partes de anticuerpos, tales como IgG, IgA, IgM, IgD, IgE y similares. Los anticuerpos modulares también pueden ser un fragmento funcional de anticuerpo tal como Fab, Fab₂, scFv, Fv, Fc, Fcab™, un Fc de unión al antígeno, o partes de los mismos, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas 25 tales como minicuerpos, dominios de las cadenas pesadas y ligeras de la región variable (tales como dAb, Fd (sitio de unión constituido de uno o más dominios individuales), VL, que incluye Vlambda (Vl) y Vkappa (Vk), VH, VHH) además de mini-dominios que consisten en dos hebras beta de un dominio de inmunoglobulina conectado por al menos dos bucles estructurales, como dominios aislados o en el contexto de moléculas naturalmente asociadas.

En el presente documento se describe el fragmento Fc de una molécula de anticuerpo, bien como fragmento Fc de 30 unión al antígeno (Fcab™) mediante modificaciones de la secuencia de aminoácidos o como conjugados o fusiones con receptores, péptidos u otros módulos de unión al antígeno, tales como scFv.

Los anticuerpos modulares pueden usarse como polipéptidos aislados o como moléculas de combinación, por ejemplo mediante técnicas de recombinación, fusión o conjugación, con otros péptidos o polipéptidos. Los péptidos son preferiblemente homólogos a secuencias de dominio de inmunoglobulina, y tienen preferiblemente al menos 35 5 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 10 o incluso al menos 50 o 100 aminoácidos de longitud, y constituyen al menos parcialmente la región de bucle del dominio de inmunoglobulina. Las características de unión preferidas se refieren a unión, afinidad y avidez de epítopo predefinida.

El anticuerpo modular se combina posiblemente adicionalmente con uno o más anticuerpos modulares modificados o 40 con anticuerpos modulares no modificados, o partes de los mismos, para obtener un anticuerpo modular de combinación. Las combinaciones se obtienen preferiblemente por técnicas de recombinación, pero también uniendo mediante adsorción, interacciones electrostáticas o similares, o incluso mediante conjugación o unión química con o sin un conector. La secuencia conectora preferida es tanto una secuencia conectora natural como una secuencia artificial funcionalmente adecuada.

En general, el anticuerpo modular puede usarse como elemento estructural para combinar molecularmente otros 45 anticuerpos modulares o sustancias o moléculas biológicamente activas. Se prefiere combinar molecularmente al menos un anticuerpo que se une al componente específico mediante las secuencias variables o no variables, como bucles estructurales, con al menos otra molécula de unión que puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, un receptor soluble, un ligando u otro dominio de anticuerpo, o un resto de unión del mismo. Otras combinaciones se refieren a moléculas proteináceas, ácidos nucleicos, lípidos, moléculas orgánicas e hidratos de carbono.

50 Las moléculas manipuladas descritas en el presente documento serán útiles como proteínas independientes, además de proteínas de fusión o derivados, lo más normalmente fusionados de tal forma que sean parte de estructuras de anticuerpo más grandes o moléculas de anticuerpo completas, o partes o fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc, fragmentos Fv y otros. Será posible usar las proteínas manipuladas para producir moléculas que son monoespecíficas, biespecíficas, triespecíficas, y pueden incluso llevar más especificidades al mismo tiempo, y será posible al mismo tiempo controlar y preseleccionar la valencia de unión al mismo tiempo según los requisitos de uso planeados de tales moléculas.

El anticuerpo modular ejerce opcionalmente una o más regiones de unión a antígenos, que incluyen el sitio de unión que se une específicamente a la superficie celular diana y los sitios de unión que median en la función efectora. Sitios de unión al antígeno a uno o más antígenos pueden presentarse por la región de CDR o cualquier otra estructura de unión de receptor natural, o introducirse en una región de bucle estructural de un dominio de anticuerpo, tanto de una estructura de dominio variable como constante. Los antígenos, como se usan para probar las propiedades de unión de los sitios de unión, pueden ser moléculas que existen de forma natural o moléculas químicamente sintetizadas o moléculas recombinantes, tanto en disolución como en suspensión, por ejemplo localizadas sobre o en partículas tales como fases sólidas, sobre o en células o sobre superficies virales. Se prefiere que la unión de una inmunoglobulina a un antígeno se determine cuando el antígeno está todavía adherido o unido a moléculas y estructuras en el contexto natural. Así es posible identificar y obtener aquellas inmunoglobulinas modificadas que son las mejor adecuadas con el fin de uso de diagnóstico o terapéutico.

El anticuerpo modular o dominios de inmunoglobulina pueden modificarse (como se usa en el presente documento, los términos inmunoglobulina y anticuerpo son intercambiables), modificaciones que se efectúan preferiblemente en dominios de inmunoglobulina o partes de la misma que contienen un bucle, tanto un bucle de CDR como un bucle no de CDR, bucles estructurales que son los sitios preferidos de modificaciones o mutagénesis. En algunos casos es preferible usar un bucle estructural modificado definido o una región de bucle estructural, o partes de la misma, como moléculas aisladas para fines de unión o de combinación.

Es particularmente preferido que el anticuerpo modular una a dicha superficie celular diana mediante al menos parte de un bucle estructural y/o bucle de CDR.

20 El anticuerpo modular se puede unir a dicho ligando efector, o un ligando sustituto para un ligando efecto tal, como proteína A, mediante al menos parte de un bucle estructural y/o bucle de CDR, mediando así en la función efectora.

En una realización preferida, el agente de unión se une con su estructura de unión nativa o estructura modificada o sitio de unión recién formado, específicamente a al menos dos de tales epítopos que son idénticos o se diferencian entre sí, tanto del mismo antígeno como de antígenos diferentes.

25 En una estructura de dominio preferida de un agente de unión se prefiere modificar al menos una región de bucle produciendo una sustitución, delección y/o inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, preferiblemente una mutación puntual, o incluso el intercambio de bucles enteros, más preferido el cambio de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, hasta 30 aminoácidos. Así, la secuencia modificada comprende aminoácidos no incluidos en las regiones conservadas de los bucles, siendo los aminoácidos recién introducidos que existen de forma natural, pero extraños al sitio de modificación, o sustitutos de aminoácidos que existen de forma natural.

30 Sin embargo, el máximo número de aminoácidos insertado en una región de bucle de un agente de unión puede preferiblemente no superar el número de 30, preferiblemente 25, más preferiblemente 20 aminoácidos como máximo. La sustitución y la inserción de los aminoácidos se produce preferiblemente aleatoriamente o semi-aleatoriamente usando todos los posibles aminoácidos o una selección de aminoácidos preferidos para fines de aleatorización, por métodos conocidos en la técnica y como se divultan en la presente solicitud de patente.

35 El sitio de modificación puede estar en un único bucle específico o una región de bucle, en particular un bucle estructural o una región de bucle estructural. Una región de bucle normalmente está compuesta por al menos uno, preferiblemente al menos dos, preferiblemente al menos 3 o al menos 4 bucles que están en la punta o en la parte inferior de un dominio, en proximidad o adyacentes entre sí, y que pueden contribuir a la unión de un antígeno mediante la formación de un sitio de unión al antígeno o bolsillo de unión al antígeno. Se prefiere que el uno o más sitios de modificación estén localizados dentro del área de 10 aminoácidos, más preferiblemente dentro de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta 100 aminoácidos, en particular dentro de una región estructural para formar una superficie o bolsillo donde el antígeno puede acceder estéricamente a las regiones de bucle.

40 A este respecto, las modificaciones preferidas se manipulan en las regiones de bucle de CH1, CH2, CH3 y CH4, en particular en el intervalo de aminoácidos 7 a 21, aminoácidos 25 a 39, aminoácidos 41 a 81, aminoácidos 83 a 85, aminoácidos 89 a 103 y aminoácidos 106 a 117.

45 Una modificación de la región de bucle estructural que comprende los aminoácidos 92 a 98 puede combinarse con una modificación en la región de bucle estructural que comprende los aminoácidos 8 a 20.

50 Las regiones de aminoácidos anteriormente identificadas de las inmunoglobulinas respectivas comprenden regiones de bucle que van a modificarse. Preferiblemente, una modificación en la región de bucle estructural que comprende los aminoácidos 92 a 98 se combina con una modificación en uno o más de los otros bucles estructurales.

Una modificación en la región de bucle estructural que comprende los aminoácidos 92 a 98 puede combinarse con una modificación en la región de bucle estructural que comprende los aminoácidos 41 a 45,2.

55 Cada uno de los bucles estructurales que comprende los aminoácidos 92 a 98, aminoácidos 41 a 45,2 y aminoácidos 8 a 20 puede contener al menos una modificación de aminoácidos.

Cada uno de los bucles estructurales que comprende los aminoácidos 92 a 98, aminoácidos 41 a 45,2 y aminoácidos 8 a 20 puede contener al menos una modificación de aminoácidos.

Pueden modificarse los restos de aminoácidos en el área de posiciones 15 a 17, 29 a 34, 41 a 45,2, 84 a 85, 92 a 100 y/o 108 a 115 de CH3.

5 Las modificaciones de Igk-C y Igl-C de origen humano pueden manipularse en las regiones de bucle en el área de aminoácidos 8 a 20, aminoácidos 26 a 36, aminoácidos 41 a 82, aminoácidos 83 a 88, aminoácidos 92 a 100, aminoácidos 107 a 124 y aminoácidos 123 a 126.

Las modificaciones de las regiones de bucle de Igk-C y Igl-C de origen murino pueden manipularse en sitios en el área de aminoácidos 8 a 20, aminoácidos 26 a 36, aminoácidos 43 a 79, aminoácidos 83 a 85, aminoácidos 90 a 101, aminoácidos 108 a 116 y aminoácidos 122 a 126.

10 Una inmunoglobulina usada como terapéutico descrita en el presente documento puede consistir en un dominio variable de una cadena pesada o ligera, o una parte del mismo, que incluye un minidominio, con al menos una región de bucle, preferiblemente una región de bucle estructural, y se caracteriza por que dicha al menos una región de bucle comprende al menos una modificación de aminoácidos que forma al menos una región de bucle modificada, en la que dicha al menos una región de bucle modificada forma un sitio de unión relevante como se ha descrito anteriormente.

15 Una inmunoglobulina puede contener una modificación dentro del dominio variable, que está seleccionado del grupo de VH, Vkappa, Vlambda, VHH y combinaciones de los mismos. Más específicamente, comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 7 a 22, aminoácidos 39 a 55, aminoácidos 66 a 79, aminoácidos 77 a 89 o aminoácidos 89 a 104, donde la numeración de la posición de aminoácido de los dominios es la de IMGT.

20 La inmunoglobulina puede caracterizarse por que las regiones de bucle de VH o Vkappa o Vlambda de origen humano comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 7 a 22, aminoácidos 43 a 51, aminoácidos 67 a 77, aminoácidos 77 a 88, y aminoácidos 89 a 104, lo más preferiblemente posiciones de aminoácidos 12 a 17, posiciones de aminoácidos 45 a 50, posiciones de aminoácidos 68 a 77, aminoácidos 79 a 88, y posiciones de aminoácidos 92 a 99, donde la numeración de la posición de aminoácido de los dominios es la de IMGT.

25 Las regiones de bucle estructural del dominio variable de la inmunoglobulina de origen humano, como posibles seleccionadas para fines de modificación, pueden localizarse en el área de aminoácidos 8 a 20, aminoácidos 44 a 50, aminoácidos 67 a 76, aminoácidos 78 a 87 y aminoácidos 89 a 101.

30 Las regiones de bucle estructural del dominio variable de la inmunoglobulina de origen murino seleccionadas para fines de modificación pueden localizarse en el área de aminoácidos 6 a 20, aminoácidos 43 a 52, aminoácidos 67 a 79, aminoácidos 79 a 87 y aminoácidos 91 a 100.

35 La inmunoglobulina puede ser de origen de camélido. Los anticuerpos de camello comprenden solo una cadena pesada y tienen la misma afinidad por antígeno que los anticuerpos normales que consisten en cadenas ligeras y pesadas. Por consiguiente, los anticuerpos de camello son mucho más pequeños que, por ejemplo, los anticuerpos humanos, que les permite penetrar en tejidos densos para llegar al antígeno, donde no pueden proteínas más grandes. Además, la simplicidad comparativa, alta afinidad y especificidad y la posibilidad de llegar a e interaccionar con sitios activos, los anticuerpos de cadena pesada de camello presentan ventajas con respecto a anticuerpos comunes en el diseño, producción y aplicación de compuestos clínicamente valiosos.

40 Las regiones de bucle estructural de un anticuerpo modular o una inmunoglobulina de origen de camélido pueden modificarse, por ejemplo dentro de un VHH, en la región de aminoácidos 7 a 19, aminoácidos 43 a 55, aminoácidos 68 a 76, aminoácidos 80 a 87 y aminoácidos 91 a 101.

45 Un método de producción de un anticuerpo modular como se divulga en el presente documento puede referirse a manipular un anticuerpo modular que se une específicamente a al menos un primer epítopo y que comprende modificaciones en cada una de al menos dos regiones de bucle estructural, y determinar la unión específica de dichas al menos dos regiones de bucle a al menos un segundo epítopo, en el que la región de bucle estructural no modificada (región no de CDR) no se une específicamente a dicho al menos un segundo epítopo. Así, un anticuerpo o estructura de unión al antígeno específica para un primer antígeno puede mejorarse añadiendo otra valencia o especificidad contra un segundo antígeno, especificidad que puede ser idéntica, tanto que se dirige a diferentes epítopos como al mismo epítopo, para aumentar la valencia o para obtener moléculas bi-, oligo- o multi-específicas.

50 Por otra parte se prefiere hacer uso de aquellos anticuerpos modulares que contienen estructuras nativas que interaccionan con moléculas efectoras o células inmunitarias. Aquellas estructuras nativas tanto permanecen invariables como se modulan para una elevada función efectora. Se describe que sitios de unión para, por ejemplo, receptores de Fc se localizan en una región de dominio CH2 y/o CH3, y pueden ser mutagenizados por técnicas muy conocidas.

55 La ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, es la destrucción de células diana recubiertas por anticuerpo por células con receptores de Fc que reconocen la región constante del anticuerpo unido. La mayoría de la ADCC está mediada por células NK que tienen el receptor de Fc FcgammaRIII o CD16 sobre su superficie. Ensayos

típicos emplean células diana, como células Ramos, incubadas con anticuerpo diluido en serie antes de la adición de células efectoras recién aisladas. El ensayo de ADCC se incuba entonces adicionalmente durante varias horas y se detecta el % de citotoxicidad. Normalmente, la relación diana:efector es aproximadamente 1:16, pero puede ser 1:1 hasta 1 : 50. La citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) es un mecanismo de destrucción de células en el que el anticuerpo unido a la superficie de célula diana fija el complemento, que produce el ensamblaje del complejo de ataque de la membrana que perfora orificios en la membrana de la célula diana produciendo la posterior lisis celular. El ensayo de CDC comúnmente usado sigue el mismo procedimiento que para la determinación de ADCC, sin embargo, con complemento que contiene suero en lugar de células efectoras.

La actividad citotóxica como se ha determinado por cualquier ensayo de ADCC y CDC demuestra para un anticuerpo modular si hay un aumento significativo en el porcentaje de citólisis en comparación con un control. El aumento de porcentaje absoluto preferiblemente es superior al 5%, más preferiblemente superior al 10%, incluso más preferido superior al 20%.

La fagocitosis celular dependiente de anticuerpo, ADCP, algunas veces llamada ADPC, se investiga normalmente junto con la citólisis de células humanas cultivadas. La fagocitosis por fagocitos, normalmente monocitos humanos o macrófagos derivados de monocitos, como mediada por un anticuerpo puede determinarse del siguiente modo. Pueden cultivarse monocitos purificados con citocinas para potenciar la expresión de Fc γ R o para inducir la diferenciación en macrófagos. Entonces se realizan ensayos de ADCP y ADCC con células diana. La fagocitosis se determina como el porcentaje de células positivas medidas por citometría de flujo. La actividad de ADCP positivas se demuestra con una captación significativa del complejo anticuerpo-antígeno por los fagocitos. El porcentaje absoluto preferiblemente es superior al 5%, más preferiblemente superior al 10%, incluso más preferido superior al 20%.

En un ensayo de típico, las CMSp o monocitos o macrófagos derivados de monocitos se resuspenden en medio RF2 (RPMI 1640 complementado con 2% de FCS) en placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^5 células viables en 100 ml/pocillo. Células diana apropiadas, que expresan el antígeno diana, por ejemplo antígeno Her2/neu y células SKBR3, se tiñen con colorante de fluorescencia verde de PKH2. Posteriormente se añaden 1×10^4 células diana marcadas con PKH2 y un anticuerpo específico de Her 2 (IgG1) (o anticuerpo modular) o control de isotipo IgG1 de ratón (o control de anticuerpo modular) al pocillo de CMSp a diferentes concentraciones (por ejemplo 1-100 µg/ml) y se incuban en un volumen final de 200 ml a 37 °C durante 24 h. Tras la incubación, las CMSp o monocitos o macrófagos derivados de monocitos y células diana se recogen con EDTA-PBS y se transfieren a placas de fondo en V de 96 pocillos. Las placas se centrifugan y el sobrenadante se aspira. Las células se contratiñen con una mezcla de 100 ml de anti-CD11b conjugado con RPE, anti-CD14 e IgG humana, se mezclan e incuban durante 60 min sobre hielo. Las células se lavan y se fijan con 2% de formaldehído-PBS. Se realiza análisis de citometría de flujo de dos colores con, por ejemplo, un FACS Calibur bajo regulación óptima. Se detectan las células diana marcadas con PKH2 (verde) en el canal FL-1 (longitud de onda de emisión, 530 nm) y se detectan CMSp marcadas con RPE o monocitos o macrófagos derivados de monocitos (rojo) en el canal FL-2 (longitud de onda de emisión, 575 nm). Las células diana residuales se definen como células que son PKH2 $^+$ /RPE $^-$. Se considera que las células doblemente marcadas (PKH2 $^+$ /RPE $^-$) representan la fagocitosis de dianas por CMSp o monocitos o macrófagos derivados de monocitos. La fagocitosis de células diana se calcula con la siguiente ecuación: porcentaje de fagocitosis = 100 x [(porcentaje de positivos dobles)/(porcentaje de positivos dobles + porcentaje de dianas residuales)]. Todas las pruebas se realizan normalmente por duplicado o triplicado y los resultados se expresan como media 6 DE.

La función efectora del anticuerpo modular normalmente se diferencia de cualquier actividad citotóxica sintética, por ejemplo mediante una toxina que puede conjugarse con una estructura de inmunoglobulina. Las toxinas normalmente no activan moléculas efectoras y el mecanismo de defensa biológica. Así, la actividad citotóxica preferida de los anticuerpos modulares es una actividad citotóxica biológica, que normalmente es inmunoestimulante, que conduce a citólisis eficaz.

El anticuerpo modular puede unirse específicamente a cualquier tipo de moléculas de unión o estructuras, en particular a antígenos, moléculas proteináceas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glicanos, hidratos de carbono, lípidos, moléculas orgánicas, en particular moléculas orgánicas pequeñas, moléculas inorgánicas, o combinaciones o fusiones de los mismos, que incluyen PEG, prófármacos o fármacos. El anticuerpo modular puede comprender al menos dos bucles o regiones de bucle por lo que cada uno de los bucles o regiones de bucle puede unirse específicamente a diferentes moléculas o epítopos.

Preferiblemente, el antígeno diana está seleccionado de antígenos de superficie celular, que incluyen receptores, en particular del grupo que consiste en tirosina cinasas de receptor de erbB (tales como EGFR, HER2, HER3 y HER4, en particular aquellos epítopos de los dominios extracelulares de tales receptores, por ejemplo el epítopo 4D5), moléculas de la superfamilia de receptores de TNF, tales como el receptor de Apo-1, TNFR1, TNFR2, receptor de factor de crecimiento nervioso NGFR, CD40, moléculas T de la superficie celular, receptores de linfocitos T, antígeno de linfocitos T OX40, receptor de TAC1, BCMA, Apo-3, DR4, DR5, DR6, receptores de señal, tales como DcR1, DcR2, CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, pero no se limitan a estas moléculas, antígenos de superficie de linfocitos B, tales como CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, antígenos o marcadores de tumores sólidos o células cancerosas hematológicas, células de linfoma o leucemia, otros glóbulos sanguíneos que incluyen plaquetas de la sangre, pero no se limitan a estas moléculas.

Según otra realización preferida, el antígeno diana está seleccionado de aquellos antígenos presentados por células, como células epiteliales, células de tumores sólidos, células infectadas, glóbulos sanguíneos, células presentadoras de antígenos y células mononucleares. Aquellos antígenos diana expresados o expresados en exceso por células son preferiblemente elegidos como diana, que están seleccionados del grupo que consiste en antígenos asociados a tumor, en particular EpcAM, glucoproteína-72 asociada a tumor (TAG-72), antígeno CA 125 asociado a tumor, antígeno prostático específico de membrana (PSMA), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), antígeno asociado a tumor que expresa el hidrato de carbono relacionado con Lewis Y, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18 y antígeno asociado a tumor de citoqueratina, antígenos bacterianos, antígenos virales, alérgenos, moléculas relacionadas con la alergia IgE, cKIT y Fc-épsilon-receptor I, IRp60, receptor de IL-5, CCR3, receptor de glóbulos rojos (CR1), albúmina de suero humano, albúmina de suero de ratón, albúmina de suero de rata, receptores de Fc, como receptor de Fc-gamma neonatal FcRn, receptores de Fc-gamma RI, Fc-gamma-RII, Fc-gamma RIII, receptores de Fc-alfa, receptores de Fc-épsilon, fluoresceína, lisozima, receptor 9 similar a toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD64, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, LIF, OSM, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma; TNF-alfa, TNFbeta2, TNFalfa, TNFalfabeta, TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, receptor-1 de TRAIL, receptor de adenosina A1, receptor beta de linfotoxina, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta1, integrina beta2, integrina alfa4/beta7, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa5, integrina alfa6, integrina alfav, integrina alfaVbeta3, FGFR-3, factor de crecimiento de queratinocitos, GM-CSF, M-CSF, RANKL, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de linfocitos T, B7-1, B7-2, VNR integrina, TGFbeta1, TGFbeta2, eotaxina 1, BlyS (estimulador de linfocitos B), complementoC5, IgE, IgA, IgD, IgM, IgG, factor VII, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB4), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptor de endotelina, VLA-4, hidratos de carbono tales como antígenos de grupo sanguíneo e hidratos de carbono relacionados, glucosilación de galili, gastrina, receptores de gastrina, hidratos de carbono asociados a tumor, hapteno NP-cap o NIP-cap, receptor alfa/beta de linfocitos T, E-selectina, P-glucoproteína, MRP3, MRP5, glutatión-S-transferasa pi (proteínas de multi-resistencia a fármaco), proteína de la membrana de gránulos alfa (GMP) 140, digoxina, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y fosfatasa alcalina similar a PLAP testicular, receptor de transferrina, heparanasa I, miosina cardíaca humana, glucoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glucoproteína de la cubierta gH del citomegalovirus humano (HCMV), gp120 del VIH, HCMV, virus respiratorio sincitial RSV F, RSVF Fgp, VNR integrina, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, bucle V3 de gp120 de IIIB de VIH, Fgp del virus respiratorio sincitial (VRS), glucoproteína gD del virus del herpes simple (VHS), glucoproteína gB de VHS, glucoproteína de la cubierta gB de HCMV, toxina *Clostridium perfringens* y fragmentos de los mismos.

Anticuerpos modulares se pueden unir a dicho antígeno diana con una alta afinidad, en particular con una constante de asociación alta y/o de disociación baja, o una alta avidez de unión. Normalmente, un ligante se considera un ligante de alta afinidad con una Kd de $<10^{-9}$ M. También pueden proporcionarse ligantes de afinidad media con una Kd inferior a 10^{-6} hasta 10^{-9} por ejemplo, conjuntamente con un proceso de maduración por afinidad.

La maduración por afinidad es el proceso por el que se producen anticuerpos con elevada afinidad por antígeno. Con cambios estructurales de un anticuerpo, que incluyen mutagénesis de aminoácidos o como consecuencia de mutación somática en segmentos del gen de inmunoglobulina, se producen variantes de un sitio de unión a un antígeno y se seleccionan para mayores afinidades. Los anticuerpos modulares madurados por afinidad pueden presentar una afinidad varias veces en logaritmo mayor que un anticuerpo parental. Los anticuerpos parentales individuales pueden someterse a maduración por afinidad. Alternativamente, los conjuntos de anticuerpos modulares con afinidad de unión similar al antígeno diana pueden considerarse estructuras parentales que se varían para obtener anticuerpos individuales madurados por afinidad o conjuntos madurados por afinidad de tales anticuerpos.

La variante madurada por afinidad de un anticuerpo modular puede presentar al menos un aumento de 10 veces en la afinidad de unión, preferiblemente al menos un aumento de 100 veces. La maduración por afinidad puede emplearse en el transcurso de campañas de selección empleando bibliotecas respectivas de moléculas parentales, tanto con anticuerpos modulares que tienen afinidad de unión media para obtener un anticuerpo modular que tiene la propiedad de unión a diana específica de una Kd $<10^{-8}$ M y/o una potencia de Cl₅₀ $<10^{-8}$ M. Alternativamente, la potencia o afinidad de unión puede elevarse incluso más por maduración por afinidad del anticuerpo modular según la invención para obtener los altos valores correspondientes a una Kd o Cl₅₀ inferior a 10^{-9} M, preferiblemente inferior a 10^{-10} M o incluso inferior a 10^{-11} M, lo más preferido en el intervalo picomolar.

La Cl₅₀, también llamada la concentración de saturación al 50%, es una medida de la potencia de unión de un anticuerpo modular. Es la concentración molar de un ligante, que produce el 50% de la máxima unión posible en equilibrio o bajo saturación. La potencia de un antagonista se define normalmente por su valor de Cl₅₀. Esto puede calcularse para un antagonista dado determinando la concentración de antagonista necesaria para provocar la mitad de saturación de la máxima unión de un agonista. Elucidar un valor de Cl₅₀ es útil para comparar la potencia de anticuerpos o variantes de anticuerpo con eficacias similares; sin embargo, las curvas de dosis-respuesta producidas por ambos antagonistas de fármaco deben ser similares. Cuanto más baja sea Cl₅₀, mayor será la potencia del antagonista, y menor la concentración de fármaco que se requiere para inhibir la máxima respuesta biológica, como función efectora o actividad citotóxica. Concentraciones más bajas de fármacos también pueden asociarse a menos efectos secundarios.

Normalmente, la afinidad de un anticuerpo se correlaciona bien con la Cl_{50} . La afinidad de un antagonista por su sitio de unión (K_i) se entiende como su capacidad para unirse a un receptor, que determina la duración de la unión y la actividad agonista respectiva. Medidas para aumentar la afinidad por maduración por afinidad normalmente también aumentan la potencia de unión, produciendo la reducción respectiva de valores de Cl_{50} en el mismo intervalo de los valores de K_d .

5 Los valores de Cl_{50} y K_d pueden determinarse usando los ensayos de unión de saturación muy conocidos en la técnica.

El anticuerpo modular puede conjugarse con una marca o molécula indicadora, seleccionada del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcas enzimáticas, marcas radiactivas, marcas coloreadas, marcas fluorescentes, marcas cromogénicas, marcas luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos. Las inmunoglobulinas modificadas conjugadas con marcas o moléculas indicadoras pueden usarse, por ejemplo, en sistemas de ensayo o métodos de diagnóstico.

10 El anticuerpo modular puede conjugarse con otras moléculas que permiten la simple detección de dicho conjugado en, por ejemplo, ensayos de unión (por ejemplo, ELISA) y estudios de unión.

15 Pueden cribarse variantes de anticuerpo usando uno o más ensayos basados en células o *in vivo*. Para tales ensayos, normalmente se añaden inmunoglobulinas modificadas purificadas o no purificadas exógenamente de forma que las células se expongan a inmunoglobulinas individuales o conjuntos de inmunoglobulinas que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos se basan normalmente, pero no siempre, en la función de la inmunoglobulina; es decir, la capacidad del anticuerpo para unirse a su diana y mediar en algún evento bioquímico, por ejemplo función efectora, inhibición de la unión ligando/receptor, apoptosis, y similares. Tales ensayos frecuentemente implican monitorizar la 20 respuesta de células al anticuerpo, por ejemplo supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular, o activación transcripcional tal como expresión celular de un gen natural o gen indicador. Por ejemplo, tales ensayos pueden medir la capacidad de variantes de anticuerpo para provocar ADCC, ADCP, o CDC. Para algunos ensayos puede necesitarse añadir células o componentes adicionales, que es además de las células diana, por ejemplo, complemento de suero, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (CMSP), células NK, macrófagos, y similares. Tales células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferiblemente seres 25 humanos, ratones, rata, conejo y mono. Los anticuerpos modulares puede producir la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar en el ataque sobre células diana por células inmunitarias que han sido añadidas al ensayo. Métodos de monitorización de la muerte celular o viabilidad se conocen en la técnica, e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de 30 tinción de caspasa pueden permitir medir la apoptosis, y la captación o liberación de sustratos radiactivos o colorantes fluorescentes tales como azul de alamar pueden permitir monitorizar el crecimiento celular o la activación.

35 Puede usarse el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIART (Perkin Elmer, MA). Alternativamente, pueden monitorizarse células diana muertas o dañadas midiendo la liberación de uno o más componentes intracelulares naturales, por ejemplo lactato deshidrogenasa.

40 35 La activación transcripcional puede también servir de método para ensayar la función en ensayos basados en célula. En este caso, la respuesta puede monitorizarse ensayando genes o inmunoglobulinas naturales que pueden regularse por incremento, por ejemplo puede medirse la liberación de ciertas interleucinas, o alternativamente la lectura puede ser mediante una construcción indicadora. Los ensayos basados en célula pueden también implicar la medida de cambios morfológicos de células como una respuesta a la presencia de anticuerpos modulares. Tipos de células para tales ensayos pueden ser procariotas o eucariotas, y puede emplearse varias líneas celulares que se conocen en la técnica. Alternativamente, se realizan cribados basados en células usando células que han sido transformadas o 45 transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Es decir, no se añaden exógenamente variantes de anticuerpo a las células. Por ejemplo, el cribado basado en células puede utilizar presentación de la superficie celular. Puede emplearse un componente de fusión que permite la presentación de inmunoglobulinas modificadas sobre la superficie de células (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399).

50 La inmunogenicidad de los anticuerpos modulares puede determinarse experimentalmente usando uno o más ensayos basados en células. Puede usarse activación *ex vivo* de ensayos de linfocitos T para cuantificar experimentalmente la inmunogenicidad. En este método, se exponen una o más veces células presentadoras de抗igenos y linfocitos T intactos de donantes correspondientes a un péptido o anticuerpo completo de interés. Entonces, la activación de linfocitos T puede detectarse usando varios métodos, por ejemplo monitorizando la producción de citocinas o midiendo la captación de timidina tritiada.

La producción de interferón gamma puede monitorizarse usando ensayos Elispot.

55 Las propiedades biológicas del anticuerpo modular pueden caracterizarse *ex vivo* en experimentos de células, tejidos, y de organismo completo. Como se conoce en la técnica, los fármacos se prueban frecuentemente *in vivo* en animales, que incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, con el fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir una farmacocinética de fármaco, farmacodinámica, toxicidad, y otras propiedades. Los animales pueden denominarse modelos de enfermedad. Los terapéuticos se prueban frecuentemente en ratones, que incluyen, pero no se limitan a, ratones sin

pelo, ratones SCID, ratones de xenoinjerto y ratones transgénicos (incluyendo con genes activados e inactivados). Tal experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo que va a usarse como terapéutico con la apropiada semivida, función efectora, actividad apoptótica, actividad citotóxica o citolítica. Cualquier organismo, preferiblemente mamíferos, puede usarse para la prueba. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, primates, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y así pueden usarse para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética, farmacodinámica, semivida, u otra propiedad del anticuerpo modular según la invención. La pruebas de las sustancias en seres humanos son por último lugar requeridas para la autorización como fármacos, y así por supuesto se contemplan estos experimentos. Así, los anticuerpos modulares descritos en el presente documento pueden probarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética, y/u otras propiedades clínicas. Especialmente aquellos anticuerpos modulares que se unen a una única célula o un complejo celular mediante al menos dos motivos de unión, preferiblemente unión de al menos células diana de reticulación de tres estructuras, se considerarían eficaces en actividad efectora o actividad preapoptótica o apoptótica tras el direccionamiento de célula y reticulación. La unión multivalente proporciona una asociación relativamente grande de componentes de unión, también llamada reticulación, que es un requisito previo para la apoptosis y muerte celular.

El anticuerpo modular descrito en el presente documento puede encontrar uso en una amplia gama de productos de anticuerpo. El anticuerpo modular puede usarse para terapia o profilaxis, por ejemplo como inmunoterapia activa o pasiva, para uso preparativo, industrial o analítico, como un diagnóstico, un compuesto industrial o un reactivo de investigación, preferiblemente un terapéutico. El anticuerpo modular puede encontrar uso en una composición de anticuerpo que es monoclonal o policlonal. Los anticuerpos modulares pueden usarse para capturar o destruir células diana que llevan el antígeno diana, por ejemplo células cancerosas. Los anticuerpos modulares pueden usarse para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo antagonizando una citocina o receptor de citocina.

Los anticuerpos modulares puede usarse para bloquear, antagonizar o agonizar factores de crecimiento o receptores de factor de crecimiento y así mediar en la destrucción de las células diana que llevan o necesitan el antígeno diana.

25 Los anticuerpos modulares pueden usarse para bloquear, antagonizar o agonizar enzimas y sustratos de enzima.

Un anticuerpo modular descrito en el presente documento puede administrarse a un paciente para tratar un trastorno específico. Un "paciente" incluye tanto seres humanos como otros animales, preferiblemente mamíferos, y lo más preferiblemente seres humanos. Por "trastorno específico" en el presente documento se indica un trastorno que puede mejorar por la administración de una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada descrita en el presente documento.

En un ejemplo, un anticuerpo modular puede ser el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Alternativamente, el anticuerpo modular puede administrarse en combinación con uno o varios de otros agentes terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de cinasas, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, u otros agentes terapéuticos. El anticuerpo modular puede administrarse concomitantemente con una o varias de otras pautas terapéuticas. Por ejemplo, un anticuerpo modular puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, radioterapia, o tanto quimioterapia como radioterapia. En una realización, el anticuerpo modular puede administrarse conjuntamente con uno o más anticuerpos, que pueden o pueden no comprender un anticuerpo modular como se divulga en el presente documento. Según otro ejemplo, se emplea el anticuerpo modular y una o varias de otras terapias contra el cáncer para tratar células cancerosas *ex vivo*. Se contempla que tal tratamiento *ex vivo* puede ser útil en trasplante de médula ósea y particularmente trasplante autólogo de médula ósea. Por supuesto, se contempla que los anticuerpos pueden emplearse en combinación con todavía otras técnicas terapéuticas tales como cirugía.

Otros varios agentes terapéuticos pueden encontrar uso para administración con el anticuerpo modular. En un ejemplo, el anticuerpo modular puede administrarse con un agente antiangiogénico, que es un compuesto que bloquea, o interfiere a cierto grado, con el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, molécula de fusión de Fc, o citocina, que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en promover la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido en el presente documento es un anticuerpo que se une a factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En un ejemplo alternativo, el anticuerpo modular puede administrarse con un agente terapéutico que induce o potencia la respuesta inmunitaria adaptativa, por ejemplo un anticuerpo que se dirige a CTLA-4. La inmunoglobulina modificada puede administrarse con un inhibidor de tirosina cinasas, que es una molécula que inhibe de algún modo la actividad de tirosina cinasa de una tirosina cinasa. En un ejemplo alternativo, el anticuerpo modular se administrar con una citocina. Por "citocina", como se usa en el presente documento, se indica un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares que incluyen quimiocinas.

55 Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan anticuerpos modulares y uno o más agentes terapéuticamente activos. Se preparan formulaciones estables de los anticuerpos modulares divulgados en el presente documento para almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril u otros métodos. El

anticuerpo modular y otros agentes terapéuticamente activos divulgados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas, y/o atraparse en microcápsulas.

- La administración de la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo modular divulgado en el presente documento , preferiblemente en forma de una soluciones acuosa estéril, puede hacerse en varias formas, que incluyen, pero no se limitan a, por vía oral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intranasal, por vía intraóptica, por vía transdérmica, mucosa, por vía tópica (por ejemplo, geles, bálsamos, lociones, cremas, etc.), por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intrapulmonar (por ejemplo, tecnología inhalable AERx™ comercialmente disponible de Aradigm, o sistema de administración pulmonar Inhance™ comercialmente disponible de Inhale Therapeutics), por vía vaginal, por vía parenteral, por vía rectal o por vía intraocular.
- También se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico aleatoriamente modificada que codifica una inmunoglobulina, dominio de inmunoglobulina o una parte de la misma que comprende al menos una unidad de repetición de nucleótido dentro de una región codificante de bucle estructural que tiene la secuencia 5'-NNN-3', 5'-NNN-3', 5'- NNB-3' o 5'- NNK-3'. En algunos ejemplos, el ácido nucleico modificado comprende codones de nucleótido seleccionados del grupo de TMT, WMT, BMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC, NNK, NNN, NNS o cualquier combinación de los mismos (la codificación es según IUPAC).
- La modificación de la molécula de ácido nucleico puede realizarse introduciendo oligonucleótidos sintéticos en un segmento de ácido nucleico más grande o por síntesis *de novo* de una molécula de ácido nucleico completa. La síntesis de ácido nucleico puede realizarse con elementos estructurales de tri-nucleótido que reducirían el número de combinaciones de secuencia antisentido si un subconjunto de aminoácidos va a codificarse (por ejemplo, Yanez et al. Nucleic Acids Res. (2004) 32:e158; Virnekas et al. Nucleic Acids Res. (1994) 22:5600-5607).
- La molécula de ácido nucleico aleatoriamente modificada puede comprender las unidades de repetición anteriormente identificadas, que codifican todos los aminoácidos que existen de forma natural conocidos o un subconjunto de los mismos. Aquellas bibliotecas que contienen secuencias modificadas en las que un subconjunto de aminoácidos específico se usa para los fines de modificación se llaman bibliotecas "centradas". Los miembros de tales bibliotecas tienen una elevada probabilidad de un aminoácido de un subconjunto tal en la posición modificada, que es al menos dos veces superior a la usual, preferiblemente al menos 3 veces o incluso al menos 4 veces más alta. Tales bibliotecas también tienen un número limitado o más bajo de miembros de biblioteca, de manera que el número de miembros de biblioteca real alcanza al número de miembros de biblioteca teóricos. En algunos casos, el número de miembros de biblioteca de una biblioteca centrada no es inferior a 10^3 veces el número teórico, preferiblemente no inferior a 10^2 veces, lo más preferiblemente no inferior a 10 veces.
- Normalmente, las bibliotecas, comprenden al menos 10 proteínas de fusión o posibles agentes de unión o variantes de proteínas de armazón, preferiblemente al menos 100, más preferido al menos 1000, más preferido al menos 10^4 , más preferido al menos 10^5 , más preferido al menos 10^6 , más preferido al menos 10^7 , más preferido al menos 10^8 , más preferido al menos 10^9 , más preferido al menos 10^{10} , más preferido al menos 10^{11} , hasta 10^{12} , en casos de métodos de presentación *in vitro*, tales como presentación ribosómica, incluso son factibles números más altos.
- Las bibliotecas según la invención se establecen como en las reivindicaciones. Están disponibles diversas alternativas para la fabricación del gen que codifica la biblioteca aleatorizada. Es posible producir el ADN por un enfoque completamente sintético, en el que la secuencia se divide en fragmentos que se solapan que son posteriormente preparados como oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos se mezclan juntos, y se hibridan entre sí calentando primero a aprox. 100 °C y luego enfriando lentamente a temperatura ambiente. Después de esta etapa de hibridación, el gen sintéticamente ensamblado puede tanto clonarse directamente, como puede amplificarse por PCR antes de la clonación.
- Alternativamente, pueden emplearse otros métodos para mutagénesis dirigida al sitio para la generación de la inserción de biblioteca, tal como el método de Kunkel (Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci USA. 1985 Jan;82(2):488-92) o el método de DpnI (Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. Gene. 1994 Dec 30;151(1-2):119-23.).
- Para diversos fines, puede ser ventajoso introducir mutaciones silenciosas en la secuencia que codifica la inserción de biblioteca. Por ejemplo, pueden introducirse sitios de restricción que facilitan la clonación o el intercambio modular de partes de la secuencia. Otro ejemplo para la introducción de mutaciones silenciosas es la capacidad de "marcar" bibliotecas, que significa darles un codón específico en una posición seleccionada, que les permite (o clones seleccionados derivados de ellas), por ejemplo, ser reconocidos durante etapas posteriores, en las que, por ejemplo, diferentes bibliotecas con diferentes características pueden mezclarse juntas y usarse como una mezcla en el procedimiento de selección o de inmunopurificación.
- En el presente documento se describe un método de producción de un oligómero de dominios de anticuerpos modulares que se unen a una diana que comprende las etapas de: proporcionar una biblioteca de oligómeros de dominios de anticuerpos modulares producidos según un método como se describe, poner en contacto dicha biblioteca con dicha diana en presencia de un ligando de armazón, seleccionar un miembro de biblioteca que se une a dicha

diana en presencia de un ligando de armazón, y fabricar una preparación del oligómero funcional.

El ligando de armazón puede seleccionarse del grupo que consiste en un molécula efectora, FcRn, proteína A y diana de CDR. Como un ejemplo, la molécula efectora puede seleccionarse del grupo que consiste en CD64, CD32, CD16, receptores de Fc.

- 5 Los oligómeros pueden ser dímeros seleccionados del grupo de VH/VL, CH1/CL, CH2/CH2, CH3/CH3, Fc and Fab,, o cadenas individuales de los mismos.

El método que puede proporcionar una biblioteca que contiene al menos 10² clones independientes que expresan oligómeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares o variantes de los mismos.

- 10 Las bibliotecas según la invención comprenden al menos 10² miembros de biblioteca, preferiblemente al menos 10³, más preferido al menos 10⁴, más preferido al menos 10⁵, más preferido al menos 10⁶ miembros de biblioteca, más preferido al menos 10⁷, más preferido al menos 10⁸, más preferido al menos 10⁹, más preferido al menos 10¹⁰, más preferido al menos 10¹¹, hasta 10¹² miembros de una biblioteca, preferiblemente derivados de una molécula parental, que es un anticuerpo modular funcional como un armazón que contiene al menos una función específica o resto de unión, y derivados de los mismos, para manipular un nuevo sitio de unión aparte de la región de unión funcional original de dicho resto parental.

- 15 Normalmente, las bibliotecas contienen variantes del anticuerpo modular, resultantes de técnicas de mutagénesis o de aleatorización. Estas variantes incluyen anticuerpos inactivos o no funcionales. Así, se prefiere que cualquiera de tales bibliotecas se crie con el ensayo apropiado para determinar el efecto funcional. Las bibliotecas pueden comprender al menos 10² variantes de tales anticuerpos modulares, más preferido al menos 10³, más preferido al menos 10⁴, más preferido al menos 10⁵, más preferido al menos 10⁶, más preferido al menos 10⁷, más preferido al menos 10⁸, más preferido al menos 10⁹, más preferido al menos 10¹⁰, más preferido al menos 10¹¹, hasta 10¹² variantes o más para proporcionar un repertorio de anticuerpos altamente diverso para seleccionar los mejores ligantes adecuados. Puede generarse cualquiera de tales bibliotecas sintéticas usando métodos de mutagénesis como se divultan en el presente documento.

- 20 25 Preferiblemente, la biblioteca es una biblioteca de levadura y la célula huésped de levadura presenta en la superficie de la célula los oligómeros, o monómeros que forman oligómeros, con la actividad biológica. La célula huésped de levadura está seleccionada preferiblemente de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*. Lo más preferidos, la célula huésped es *Pichia* o *Saccharomyces cerevisiae*.

- 30 35 La invención proporciona una biblioteca de alta calidad que contiene al menos 10² clones independientes de dímeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares como se establecen en las reivindicaciones que son capaces de unirse a una diana y a un ligando de armazón. La diana puede ser un ligando que se une a una molécula parental sometida a variación de aminoácido. La molécula parental puede ser un oligómero funcional, en particular un Fc funcional, o parte de los mismos.

- 40 45 Como es muy conocido en la técnica, hay varias tecnologías de presentación y selección que pueden usarse para la identificación y el aislamiento de proteínas con ciertas características y afinidades de unión, que incluyen, por ejemplo, tecnologías de presentación tales como sistemas celulares y no celulares, en particular presentación movilizada. Entre los sistemas celulares pueden usarse presentación en fagos, presentación en virus, presentación en levadura u otra célula eucariota, tal como presentación en mamífero o célula de insecto. Los sistemas movilizados se refieren a sistemas de presentación en la forma soluble, tales como sistemas de presentación *in vitro*, entre ellos presentación en ribosoma, presentación en ARNm o presentación en ácido nucleico.

- 50 Los métodos de producción y cribado de variantes de anticuerpo son muy conocidos en la técnica. Métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación y cribado de anticuerpos se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76.

- Una biblioteca según la invención puede diseñarse como una biblioteca dedicada que contiene al menos el 50% de formatos específicos, preferiblemente al menos el 60%, más preferido al menos el 70%, más preferido al menos el 80%, más preferido al menos el 90%, o aquellos que principalmente consisten en formatos de anticuerpo específico. Una biblioteca preferida tal contiene principalmente el mismo tipo de miembros de biblioteca que tienen características estructurales similares. Se prefieren formatos de anticuerpo específico, de forma que sea la biblioteca preferida según la invención.

- Otro aspecto importante de la invención es que cada posible dominio de unión sigue estando físicamente asociado al ADN particular o molécula de ARN que lo codifica, y además, las proteínas de fusión se oligomerizan en la superficie de un paquete genético para presentar el polipéptido de unión en la estructura oligomérica nativa y funcional. Una vez se identifican dominios de unión satisfactorios, puede obtenerse fácilmente el gen para la expresión, recombinación o fines de manipulación adicionales. La forma que esta asociación toma es un "paquete genético replicable", tal como un virus, célula o espora que se replica y expresa el gen que codifica el dominio de unión, y transporta el dominio de

unión a su superficie externa. Otra forma es un paquete genético replicable in vitro, como los ribosomas, que unen el ARN codificante con la proteína traducida. En la presentación de ribosomas, el material genético se replica mediante amplificación enzimática con polimerasas.

5 Aquellas células o virus o ácido nucleico que llevan los agentes de unión que reconocen la molécula diana se aislan y, si fuera necesario, se amplifican. El paquete genético es preferiblemente el fago M13, y la proteína incluye la señal de transporte de la superficie exterior de la proteína del gen III M13.

Preferiblemente, en el método de la presente divulgación, el vector o plásmido del paquete genético está bajo una estrecho control del elemento regulador de la transcripción, y las condiciones de cultivo se ajustan de manera que la cantidad o número de vector o partículas de fagémido que presentan menos de dos copias de la proteína de fusión sobre 10 la superficie de la partícula sea inferior a aproximadamente el 20%. Más preferiblemente, la cantidad de vector o partículas de fagémido que presentan menos de dos copias de la proteína de fusión es inferior al 10% de la cantidad de partículas que presentan una o más copias de la proteína de fusión. Lo más preferiblemente, la cantidad es inferior al 1%.

15 El vector de expresión preferiblemente puede ser capaz de expresar un polipéptido de unión, y puede producirse del siguiente modo: Primero, se sintetiza una biblioteca de genes de polipéptidos de unión introduciendo una pluralidad de polinucleótidos que codifican diferentes secuencias de unión. La pluralidad de polinucleótidos puede sintetizarse en una cantidad apropiada para unirse en combinación operable en un vector que puede propagarse para expresar una proteína de fusión de dicho polipéptido de unión. Alternativamente, la pluralidad de polinucleótidos también puede amplificarse por reacción en cadena de la polimerasa para obtener suficiente material para la expresión. Sin embargo, esto solo sería ventajoso si el polipéptido de unión se codificara por un gran secuencia de polinucleótidos, por ejemplo 20 más larga de 200 pares de bases o algunas veces más larga de 300 pares de bases. Así, se forma preferiblemente una biblioteca sintética diversa, lista para seleccionar a partir de dicha biblioteca diversa al menos un vector de expresión capaz de producir polipéptidos de unión que tienen la función preseleccionada deseada y la propiedad de unión, tal como especificidad.

25 La anterior descripción se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Tales ejemplos son, sin embargo, simplemente representativos de métodos de puesta en práctica de una o más realizaciones de la presente invención y no deben leerse como limitantes del alcance de invención, que es como se explica en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de la biblioteca Fcab no centrada (Fcab01) y presentación en superficie de fago

30 Se usó la estructura cristalina de un fragmento Fc de IgG1, que está publicada en la base de datos Brookhaven como la entrada 1OQO.pdb, para ayudar en el diseño de la biblioteca Fcab.

La secuencia que se usó como base para la construcción de la biblioteca Fcab se da en SEQ ID No. 1. En esta secuencia, el primer aminoácido se corresponde con Glu 216 de IgG1 humana (numeración de EU; según la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHCallgenes.html>; búsqueda 25-06-2007), es el primer resto de la región bisagra de IgG1 humana, que se da como: (E)PKSCDKTHTCPPCP) de la región bisagra de la cadena constante pesada de IgG1 humana). El segundo-último resto de SEQ ID No. 1 se corresponde con Gly 446 de IgG1 humana (numeración de EU; IMGT: número de resto 129 del dominio CH3 de IgG1 humana).

40 Después del análisis detallado de la estructura de 1oqo.pdb e inspección por visual de los restos que forman los bucles que conectan las hebras beta, se decidió aleatorizar los restos 144, 145 y 146, que son parte del bucle que conecta la hebra beta A-B, además de 198,199, 200, 203 y 204, que son parte del bucle que conecta la hebra beta E-F de SEQ ID No. 1. Además de los restos mutados, se insertaron 5 restos en el número de resto 198 de SEQ ID No. 1. En SEQ ID No. 2, se da la secuencia de la inserción de biblioteca de la biblioteca Fcab01, en la que todas las posiciones de restos aleatorizados, además de los 5 restos insertados, se designan con la letra X.

45 El gen manipulado se produjo por una serie de reacciones de PCR usando cebadores degenerados, seguido de ligación de los productos de PCR resultantes. Para facilitar la ligación, algunos de los codones de la secuencia de nucleótidos que codifican SEQ ID No. 1 se modificaron para producir sitios de restricción sin cambiar las secuencias de aminoácidos (mutaciones silenciosas). Para inserción en el vector de clonación pHEN1 (Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11;19(15):4133-7. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G.) en marco con la señal de secreción pelB, se usó el sitio de restricción Ncol próximo al extremo 3' de la señal de secreción pelB. Para los restos aleatorizados, se eligió el codón NNS (código de IUPAC, donde S significa los nucleótidos C y G) que codifica los 20 aminoácidos que existen de forma natural, pero evita 2 de los 3 codones de terminación. También pueden usarse otros codones tales como, por ejemplo, NNB (significando B los nucleótidos T, C y G). La secuencia manipulada se da como una secuencia de nucleótidos en SEQ ID No. 3. Esta secuencia también incluye los sitios de restricción usados para clonar en el vector de presentación de fagémido pHEN1, concretamente un sitio Ncol en el extremo 5' y un sitio NotI en el extremo 3'.

Las secuencias de los cebadores de PCR usadas para el ensamblaje del dominio CH3 mutado se dan en SEQ ID No. 4 a SEQ ID No. 9.

SEQ ID No.4 (cebador de PCR EPKSNCO)

ccatggccgagccaaatcttgtgacaaaactc

5 SEQ ID No.5 (cebador de PCR CH3LSAC)

agtcgagctcgtaacggatggggcaggg

SEQ ID No.6 (cebador de PCR CH3CSAC)

gtacgagctnnnsnscaagtccgcgtacgcctgg

SEQ ID No.7 (cebador de PCR CH3CHIN)

10 tgccaagttgttagaggaagaaggagccg

SEQ ID No.8 (cebador de PCR CH3RHIN)

tgccaagttaccgtgnnsnsnsaggtnnsnnsggaacgtcttcatgctccg

SEQ ID No.9 (cebador de PCR CH3RNOT)

agtgcggccgcgttacccggagacaggagag

15 La Figura 1 muestra una presentación esquemática de los fragmentos de PCR generados para el ensamblaje del gen mutado, y los cebadores, por tanto, usados.

Se usó ADNc de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3D6 (Felgenhauer M, Kohl J, Rüker F. Nucleotide sequences of the cDNAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human mono-clonal antibody specific to HIV-1-gp41. Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25;18(16):4927) como molde para las reacciones de PCR. Los 3

20 productos de PCR se dirigieron con SacI y/o HindIII respectivamente y se ligaron juntos. El producto de ligación se

digirió adicionalmente con NcoI y NotI y se ligaron en el vector de fagémido de presentación de superficie pHEN1, que

había sido previamente digerido con NcoI y NotI. El producto de ligación se transformó entonces en *E. coli* por

electroporación. Se controlaron varios clones seleccionados por análisis de restricción y por secuenciación de ADN y

se encontró que contenían el inserto como se planeó, que incluye las secuencias aleatorizadas correctamente

25 insertadas. Para las siguientes etapas de preparación de fagos, se siguieron protocolos convencionales. Brevemente,

la mezcla de ligación se transformó en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, las partículas de

fago se rescataron de células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Entonces, las partículas de fago se

precipitaron del sobrenadante de cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disolvieron en agua y se usaron para la

selección por inmunopurificación o, alternativamente, se almacenaron a menos 80 °C.

30 Ejemplo 2: Construcción de la biblioteca Fcab centrada (Fcab02) y presentación en superficie de fago

Como se describe en el Ejemplo 1, se preparó una biblioteca Fcab en la que las posiciones de biblioteca aleatorizadas están completamente aleatorizadas, es decir, están codificadas por un codón tal como NNS, NNB, NNK, NNN, o se usan otros.

Por claridad, el significado de letras tales como N, B, S o K se define por el código de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC, que se da en la siguiente tabla:

Tabla 1. Código de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC

| Símbolo | Significado | Ácido nucleico |
|---------|-------------|----------------|
| A | A | Adenina |
| C | C | Citosina |
| G | G | Guanina |
| T | T | Timina |
| U | U | Uracilo |
| M | A o C | |
| R | A o G | |
| W | A o T | |

| | |
|---|---------------|
| S | C o G |
| Y | C o T |
| K | G o T |
| V | A o C o G |
| H | A o C o T |
| D | A o G o T |
| B | C o G o T |
| X | G o A o T o C |
| N | G o A o T o C |

Fuente: Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984.
A Cornish-Bowden, Nucleic Acids Res. 10 de mayo de 1985; 13(9): 3021-3030.

Estos codones dados anteriormente se diseñan de forma que los 20 aminoácidos estén codificados por ellos. Puede ser preferible elegir subconjuntos de los posibles aminoácidos. Ejemplos pueden encontrarse en la bibliografía (Fellouse FA, Li B, Compaan DM, Peden AA, Hymowitz SG, Sidhu SS. Molecular recognition by a binary code. *J Mol Biol.* 2005 May 20;348(5):1153-62. Epub 2005 Apr 1.; Fellouse FA, Wiesmann C, Sidhu SS. Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: a dominant role for tyrosine in antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Aug 24;101(34):12467-72. Epub 2004 Aug 11).

5 Pueden construirse bibliotecas centradas que, por ejemplo, solo permiten 4 tipos de aminoácidos diferentes, por ejemplo, empleando el codón KMT, que codifica los aminoácidos Ser, Tyr, Ala y Asp.

10 Una biblioteca Fcab centrada, designada Fcab02, ha sido construida de la misma forma que se describe en el Ejemplo 1, excepto que los codones de NNS se sustituyeron por codones de KMT.

Por tanto, la letra "X" en SEQ ID No. 2 significa ahora "S, Y, A y D" (Ser, Tyr, Ala y Asp) con el fin de describir la biblioteca Fcab02 centrada.

Ejemplo 3: Construcción de una biblioteca de presentación en superficie de fago con restos de aminoácidos adicionales entre la inserción de biblioteca (componente de unión) y p3

15 Con el fin de investigar la accesibilidad del posible sitio de unión de la proteína presentada, se realiza un ensayo de unión: Se hace reaccionar la suspensión de fagos con microplacas recubiertas con el mAb anti-myc 9E10 (o inmunotubos). Después de lavar, los fagos unidos se detectan con el conjugado anti-M13-enzima. Como control, se hace reaccionar con las placas fago auxiliar - que no presenta la fusión de proteína y la marca myc. Otros controles son reacción de fagos con placas no recubiertas y reacción de fagos con antisuero que reconoce el componente de fusión p3 de los fagos.

20 Idealmente, la reactividad anti-myc de fagos que presentan la proteína de fusión p3 debe dar lecturas de ELISA muy claras, mientras que las reacciones de fago auxiliar con mAb anti-myc no deben estar por encima del ruido de fondo (placas no recubiertas). La estructura de un dímero de CH3 presentado en la superficie de un fago M13 mediante unión a la proteína III como anclaje es tal que cada CH3 se ancla a la proteína III usando diversa longitud de conector y composiciones. Así, el dímero de CH3 se presenta preferiblemente por dos anclajes.

25 Optimización de conectores:

30 El conector entre la proteína que va a presentarse y la proteína de anclaje del paquete genético (en caso de fago filamento, por ejemplo p3, p8, pX, pIX, pVII) es especialmente importante si el posible sitio de unión de la molécula presentada está en la proximidad espacial de la partícula de fago. En bibliotecas de anticuerpos que utilizan dominios variables y sitios de unión al antígeno formados por bucles de CDR y presentación de los miembros de biblioteca como fusión del extremo amino con p3, el posible sitio de unión al antígeno se dirige lejos de la partícula de fago. Por tanto, la estructura de conector entre miembros de biblioteca y la proteína de la cubierta de fago es menos importante. El manipular los bucles inferiores de dominios de inmunoglobulina y realizar presentación en fagos pueden, sin embargo, ser un proceso ineficiente y disminuir los rendimientos de clones de unión al antígeno o incluso descartarlos. Variar el conector entre una proteína miembro de biblioteca y su componente de fusión sobre la superficie puede resolver o 35 puede al menos reducir este problema.

40 Con el fin de seleccionar secuencias conectoras óptimas (en términos de longitud y flexibilidad, además de estabilidad), puede prepararse una biblioteca de conectores en la que la proteína de anclaje en la superficie del paquete replicable genético está fusionada con una proteína de unión conocida que es, por motivos estéricos, notoriamente difícil de seleccionar.

Esta biblioteca de secuencias puede variar en longitud y contenido de aminoácidos.

Métodos de selección de la biblioteca de conectores para conectores óptimos dependen de la aplicación, pero básicamente deben ser para seleccionar todas las propiedades que se desea que tengan en una cierta metodología.

5 El enriquecimiento contra un antígeno que es difícil de seleccionar puede dar secuencias conectoras que permiten a los miembros de biblioteca un buen acceso al antígeno. La incubación en soluciones de proteasa o bajo otras condiciones rigurosas o pase frecuente a través de células huésped bajo condiciones proteolíticas (por ejemplo, cultivos microbianos antiguos) puede ser una selección apropiada para conectores de presentación estables.

Puede producirse una biblioteca de conectores por cualquier tecnología de bibliotecas muy conocida. Longitudes de secuencia conectora sintética pueden variar entre 10-500 aminoácidos. Alternativamente, el conector puede ser 10 proteínas completas conocidas por ser de naturaleza flexible.

Fcab01 para optimización de conector:

Como un ejemplo, puede usarse la biblioteca Fcab01 (como se describe en el Ejemplo 1). Originalmente, esta biblioteca se clona en el vector de presentación de fagómero pHEN1, usando sitios de restricción NcoI y NotI. Cuando 15 se clona de este modo, 18 restos de aminoácidos están entre el resto de aminoácido del extremo C de la inserción de biblioteca Fcab01 y el resto de aminoácido del extremo N del fago M13 p3. La secuencia de esta región de empalme se da en SEQ ID No. 10 SPGKAAEQKLISEEDLNGAATVES - y se explica del siguiente modo: los primeros 4 restos, SPGK, son los 4 restos del extremo C de la inserción de biblioteca Fcab01, seguido de la secuencia de aminoácidos AAA, que son los restos de aminoácidos codificados por el sitio de restricción NotI, seguido de la secuencia EQKLISEEDL, que es el epítopo de myc, seguido de NGAA, después de lo cual hay un codón de terminación ámbar, 20 que se traduce a glutamina (Q) en cepas supresoras ámbar de *E. coli* tales como TG1. Los 4 restos del extremo C de SEQ ID No. 10, TVES, son los 4 restos del extremo N del fago M13 p3 como están presentes en el vector pHEN1.

Con el fin de construir un fago que exprese una inserción de Fcab con una elevada distancia entre Fcab (el componente 25 de unión) y el cuerpo del fago (el paquete genético), se insertaron 5 restos adicionales en el extremo C de la inserción de Fcab FcabRGD4, directamente en la dirección 5' del sitio de clonación NotI, produciendo el clón FcabRGD4L. FcabRGD4 es un Fcab que tiene un motivo RGD de unión a integrina insertado en el bucle EF del dominio CH3 y que 30 se une a αvβ3-integrina en ELISA. Como una secuencia conectora de longitud aumentada, se usó la secuencia de aminoácidos EGGGS, que aparece 8 veces en la secuencia del fago M13 p3. La secuencia de aminoácidos resultante de FcabRGD4L, como se expresó después de la clonación en pHEN1, se da en SEQ ID No. 11. En SEQ ID No. 11, restos de aminoácidos 198-204 representan el motivo RGD, el resto de aminoácido 237 es el resto del extremo C de la inserción de Fcab, los restos 238-242 representan la secuencia conectora insertada (que es la diferencia con pHEN1 no modificado), que va seguido de la marca myc, codón de terminación ámbar y la secuencia de p3.

Para la clonación de la construcción, la secuencia de FcabRGD4 se amplificó a partir de pHENFcabRGD4 (SEQ ID No. 12) usando los cebadores de PCR EPKSNCO (SEQ ID No. 4) y CH3rlink actagcgccgcagagccaccacccctccttacccggagacaggag (SEQ ID No. 13) y se clonaron mediante sitios de restricción NcoI y NotI en el vector pHEN1. El vector resultante, pHENFcabRGD4L (SEQ ID. No. 14), tiene la secuencia conectora adicional en las posiciones de nucleótido 3057-3071.

Los dos vectores de fagómero, pHENFcabRGD4 y pHENFcabRGD4L, se transformaron en TG1 de *E. coli*. Posteriormente, se rescataron partículas de fago de células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Entonces, 40 las partículas de fago se precipitaron de sobrenadante de cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disolvieron en agua y se usaron para ELISA.

Se realizó ELISA de fago del siguiente modo:

Se hace reaccionar la suspensión de fagos con microplacas recubiertas con αvβ3-integrina (o inmunotubos). Después 45 de lavar, los fagos unidos se detectan con el conjugado anti-M13-enzima. Como controles, se hace reaccionar con las placas fago auxiliar - que no presenta la fusión de proteína y la marca myc, además de partículas de fago que llevan wtFcab sobre su superficie. Otros controles son reacción de fagos con placas no recubiertas y reacción de fagos con antisero que reconoce el componente de fusión Fcab de los fagos. Las partículas de fago con el conector de longitud aumentada resultante de pHENFcabRGD4L reaccionan más fácilmente con αvβ3-integrina que las partículas de fago con el conector original como estuvo contenido en pHENFcabRGD4, y por tanto dan una señal más fuerte en ELISA.

50 Pueden realizarse selecciones de fago en las que las partículas de fago con wtFcab se mezclan con pequeñas cantidades de partículas de fago que llevan tanto FcabRGD4 como FcabRGD4L. Después de varias rondas (normalmente 3-5) de inmunopurificación, se seleccionan preferencialmente fagos que presentan FcabRGD4L.

Ejemplo 4: Diseño de bibliotecas de Fcab

("Fcab" es una marca registrada de f-star Biotechnologische Forschungs- und Entwicklungsges.m.b.H.)

55 Diseño de bibliotecas de Fcab (ilustrado en la Figura 2): Se consideran posiciones de aminoácidos en bucles no de CDR de dominios constantes CH3 de anticuerpos para la aleatorización. Especialmente se consideran los bucles A-

B, C-D y E-F ya que están en el lado del dominio. Algunos de los criterios de diseño para la aleatorización en una cierta posición se describen en el presente documento.

Los aminoácidos frecuentemente implicados en las interacción antígeno-anticuerpo se describen en el presente documento para incluirse en una biblioteca centrada. Aquí, los aminoácidos Ala, Asp, Ser y Tyr se usan para diseñar la biblioteca centrada.

Se ha mostrado que bibliotecas con utilización de aminoácidos limitada son suficientes para generar ligantes contra prácticamente cualquier antígeno (Sidhu & Fellhouse, NATURE CHEMICAL BIOLOGY VOLUME 2 page 682ff; Koide et al PNAS, volumen 104 p6632-6637). La ventaja de tales bibliotecas limitadas (o centradas) es que pueden ser completamente cubiertas por las actuales tecnologías. Idealmente, la utilización de aminoácidos refleja una utilización de aminoácidos naturales de la unión del receptor de ligando. Sin embargo, se ha informado que incluso bibliotecas que solo utilizan 2 aminoácidos (tirosina y serina) dan buenos resultados de selección (en términos de frecuencia de ligantes contra diferentes ligantes y en términos de afinidad).

Flexibilidad del bucle:

Pueden requerirse ciertas estructuras de bucle por la proteína de armazón con el fin de mantener la estructura natural global. La aleatorización de muchas posiciones de aminoácidos en bucles e incluso el alargamiento de bucles puede facilitarse construyendo ciertas secuencias tanto en uno como en ambos lados de las posiciones aleatorizadas. Estas secuencias pueden ser secuencias flexibles con el fin de permitir compensar cualquier tensión con ciertas secuencias de biblioteca en una posición tal.

Tabla 2: Bibliotecas Fcab™ a modo de ejemplo, centradas y no centradas

| | N.º de posiciones aleatorizadas | Diversidad teórica al nivel de aminoácidos | Número de clones bacterianos independientes |
|--------|---------------------------------|--|---|
| Fcab01 | 13 | $8,2 \times 10^{16}$ | $0,6 \times 10^9$ |
| Fcab02 | 13, centradas | $6,7 \times 10^7$ | $0,6 \times 10^9$ |
| Fcab03 | 13 | $8,2 \times 10^{16}$ | $1,0 \times 10^9$ |
| Fcab04 | 13, centradas | $6,7 \times 10^7$ | $0,8 \times 10^9$ |
| Fcab05 | 15 | $1,3 \times 10^{18}$ | $0,8 \times 10^9$ |
| Fcab06 | 15, centradas | $1,3 \times 10^9$ | $1,0 \times 10^9$ |

La biblioteca Fcab01 se describe en los ejemplos anteriores. El espacio de secuencia de los diseños de biblioteca centrada Fcab02, Fcab04 y Fcab06 está cubierto por los tamaños de bibliotecas bacterianas reales de aproximadamente 10^{10} . A diferencia, las bibliotecas completamente aleatorizadas Fcab01, Fcab03 y Fcab05 están en realidad sumamente infrarrepresentadas.

25 Ejemplo 5: Clonación de bibliotecas de presentación en levadura por recombinación homóloga

Vector

Se usa pYD1 (Invitrogen) como vector básico. El vector se modifica del siguiente modo, con el fin de eliminar un sitio Xhol: se escinde pYD1 con Xhol, se trata con fragmento de Klenow de ADN polimerasa y se religa. La secuencia resultante se da en pYD1dX (SEQ ID No. 15).

30 pYD1dX contiene un sitio de restricción BamHI único en la posición 921/925 y un sitio de restricción NotI único en la posición 963/967. Se abre con estas dos enzimas de restricción.

Se hace una inserción que codifica CH1-bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana por PCR a partir de ADNc que codifica la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal IgG1 humana. En esta inserción, se introduce una mutación puntual usando procedimientos convencionales para mutar el resto de cisteína del extremo C del dominio CH1 a una serina.

35 La inserción se amplifica usando cebadores de PCR que se unieron a un sitio de restricción BamHI y NotI a ambos extremos respectivamente. Estos sitios de restricción se usan entonces para clonar la inserción en pYD1dX para dar el vector de presentación pYD1dXFc (SEQ Id No.16). El codón mutado en el extremo C del dominio CH1 (Cys a Ser) está en las posiciones 1233-1235 en la secuencia pYD1dXFc. El codón de terminación de la inserción está en la posición 1917/1919.

40 Este vector se usa como control positivo para la presentación de CH1-bisagra-CH2-CH3 humano sobre la superficie de levadura y como punto de partida para la construcción del vector pYD1CH12 (véase más adelante).

Clonación de bibliotecas

La clonación de bibliotecas en las que se introducen mutaciones en bucles estructurales de dominios CH3 se realiza en levadura por recombinación homóloga (reparación de huecos). Para este fin, se prepara un vector de receptor que carece del dominio CH3: pYD1dXFc se escinde con Xhol (posición 1603/1607) y NotI (posición 1921/1925), el fragmento grande se prepara por electroforesis preparativa en gel, se trata con fragmento de Klenow de ADN polimerasa y se re-liga. Este procedimiento reconstituye un sitio Xhol único (posición 1603/1607) y dio el vector pYD1CH12 (SEQ ID No. 17). pYD1CH12 se escinde posteriormente con Xhol y se usa como vector de receptor para la reparación de huecos en levadura.

Como fuente de inserción, se usan las bibliotecas de Fcab Fcab01 (SEQ ID No. 18), Fcab02 (SEQ ID No. 19), Fcab03 (SEQ ID No. 20), Fcab04 (SEQ ID No. 21), Fcab05 (SEQ ID No. 22) y Fcab06 (SEQ ID No. 23). Estas bibliotecas se preparan por síntesis de ADN estándar, y contienen restos aleatorizados, además de restos insertados en el bucle AB (entre los restos 359 y 361 (numeración de EU)), además de en el bucle EF (entre los restos 413 y 419 (numeración de EU)) del dominio CH3 de IgG1 humana. A partir de este ADN sintético, la inserción para la reparación de huecos en levadura se amplifica por PCR usando el par de cebadores de PCR gapch35 caacaaggccctgcgtccccat 5
cgagaagaccatccaaggccaaggccagcctcgagaaccacaggtgtacaccctgccc (SEQ ID No. 24) y gapfcs3 10
gagaccgaggagagggttaggataggctacct tcgaagggcccttagactcgatcgagcggccgctattaccggagacaggagagctc (SEQ 15
ID No. 25). Se mezclan 100 µg de vector pYD1CH12 escindido por Xhol y 100 µg de inserción y se transformaron en la cepa de *Saccharomyces EBY100* (Invitrogen) usando el procedimiento de acetato de litio según el siguiente protocolo, que se aumenta de escala un factor 100 para transformar la cantidad requerida de células y de ADN.
20 Brevemente, para una única transformación de 1 µg de ADN de vector y 1 µg de ADN de inserción, se inoculan 10 ml de YPD (2% de peptona, 2% de dextrosa (D-glucosa)) con una colonia de levadura y se agitan durante la noche a 30 °C. Se determina la DO600 del cultivo durante la noche y el cultivo se diluye a una DO600 de 0,4 en 50 ml de YPD y se cultiva durante 6 horas adicionales. Las células se sedimentan a 2500 rpm y se resuspenden en 40 ml de agua destilada. Las células se sedimentan otra vez a 2500 rpm y se resuspenden en LiAc 100 mM, seguido de incubación 25
a 30 °C durante 30 minutos. Se mezclan 1 µg de ADN de vector, 1 µg de inserción y 50 µl de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado (2 mg/ml) con 300 µl de la suspensión de levadura. Se añaden 700 µl de una soluciones de acetato de Li 200 mM y 40% de PEG-3350 y se mezclan con la suspensión de levadura/ADN, seguido de incubación a 30 °C durante 30 minutos. Se añaden 88 µl de DMSO, se mezclan y la mezcla se incuba a 42 °C durante 40 minutos, seguido de centrifugación en una microcentrifuga durante 10 segundos. Entonces se elimina el sobrenadante, el sedimento de células se resuspende en 1 ml de agua destilada. El sedimento se resuspende entonces en 50-100 µl de TE y se siembra en placas de dextrosa mínima que contienen leucina (10 g/l de base de nitrógeno de levadura, 20 g/l de dextrosa, 0,1 g/l de leucina, 15 g/l de agar). Despues de la incubación de las placas a 30 °C durante 2 a 4 días aparecieron colonias individuales que son posteriormente recogidas.
30

Cultivo – Inducción

35 Se inoculan las bibliotecas de levadura recogidas (bibliotecas yFcab) en 10 ml de medio SD-CAA (10 g/l de base de nitrógeno de levadura, 10 g/l de casaminoácidos y 20 g/l de dextrosa, 0,1 g/l de leucina, 9,67 g/l de NaH₂PO₄·2H₂O y 10,19 g/l de Na₂HPO₄·7H₂O) y se cultivaron en un agitador a 250 rpm a 28 °C durante 6-8 horas. Se determina la DO600 del cultivo, y el cultivo se diluye a una DO600 de 0,2, y se cultiva bajo las mismas condiciones hasta que se alcanza una DO600 de 1-2. Las células se recogen por centrifugación (3000 rpm/5 min/4 °C) y se resuspenden en medio de inducción SG/R-CAA (10 g/l de base de nitrógeno de levadura, 10 g/l de casaminoácidos y 20 g/l de galactosa, 10 g/l de rafinosa, 0,1 g/l de leucina, 9,67 g/l de NaH₂PO₄·2H₂O y 10,19 g/l de Na₂HPO₄·7H₂O). Los cultivos se inducen por incubación durante 2 días en un agitador a 250 rpm a 20 °C y posteriormente se analizan y clasifican.
40

Control de calidad de bibliotecas yFcab.

45 Se prueban las bibliotecas yFcab para su nivel de expresión y calidad de Fcab expresadas dos días después de la inducción con medio SD-CAA. El nivel de expresión se prueba usando un antisero anti-IgG-Fc humano polyclonal (Sigma). Para este fin, se diluyen 0,5x10⁶ células de biblioteca en 1 ml de tampón de tinción (SB), que comprende PBS con 2% de BSA. Las células se sedimentan y se tiñen con 100 µl de SB que contiene 1/2000 de antisero anti-IgG-Fc-PE humano diluido (Sigma) durante 30 min sobre hielo, se lavan dos veces con SB y posteriormente se analizan en FACS. En general, el 70%-80% de todas las células en cada biblioteca expresan Fcab sobre su superficie celular. Para probar el plegamiento correcto de Fcab, se realiza tinción con proteína A. Otra vez se diluyen 0,5x10⁶ células de biblioteca en 1 ml de tampón de tinción SB, las células se sedimentan y se tiñen con 100 µl de SB que contiene 1 µg/ml de Prot-A-FITC (Fluka) durante 30' sobre hielo, se lavan dos veces con SB y posteriormente se analizan en FACS. En general, las bibliotecas yFcab como se han descrito anteriormente muestran ≥ 40% de células positivas para Prot A. Con el fin de probar si las Fcabs se expresan como dímeros sobre la superficie de las células se realiza una tinción con CD64 humano. La afinidad de CD64 es demasiado baja para la eficiente unión monomérica, por tanto se usan complejos de CD64 con dímeros. Para este fin, se mezclan, por ejemplo, 1 µg de CD64 recombinante de R&D Systems (que contiene una marca de HIS) con 1 µg de anti-Penta HIS-Alexafluor 488 (de Qiagen) en 1 ml de SB (volumen total). Se prueban las bibliotecas yFcab para la unión a CD64 incubando las 5x10⁵ células con 100 µl de la mezcla de complejo durante 30 minutos sobre hielo, como control las células se incuban con equivalente de anti-HIS-Alexafluor 488 solo (1/200 de dilución en SB). Despues de la incubación las células se lavan dos veces con SB 50
55
60

helado y se analizan en FACS. En general, > 50% de todas las células en cada biblioteca expresan Fcabs diméricas sobre su superficie celular.

Biotinilación de antígeno (Her2)

Se hizo antígeno recombinante, por ejemplo, Her2 (Bendermedsystems) con el sistema EZ link de Pierce según las instrucciones del fabricante. En resumen, el antígeno se dializa contra PBS, se diluye a 1 mg/ml en PBS y se mezcla con sulfo-LC-LC-biotina 10 mM (EZ link, Pierce), que se disolvió previamente en agua. La relación final entre antígeno y biotina es 1:3 y la mezcla se incuba a temperatura ambiente a partir de 30'. Después la mezcla se "dializa" contra PBS usando columnas Vivaspin MWCO3000 (Sartorius) (5x8', 4000 rpm). Finalmente, la concentración del antígeno biotinilado (Her2) se prueba por HPLC y se almacenan alícuotas a -20 °C.

- 5 La calidad del antígeno biotinilado se prueba por ELISA. Primero, las placas se recubren con un anticuerpo anti-Her2 (por ejemplo, Herceptin) a 10 µg/ml en PBS, 100 µl/pocillo durante la noche a 4 °C, después de esto la placa se lava 3x con tampón de lavado (WB)(PBS + 0,05% de Tween20) y se bloquea por tampón de bloqueo (BB) (PBS + 2% de BSA) 1 h a temperatura ambiente. Después de 3x lavados con WB, se añaden diferentes concentraciones de Her2-biotina en 100 µl/pocillo de BB durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de 3x lavados con WB. Finalmente, la placa se incuba con 1:25000 de estreptavidina-HRP (GE Healthcare) en BB durante 1 h a temperatura ambiente y se lava 3x con WB. El color se desarrolla añadiendo 100 µl/pocillo del sustrato TMB (Sigma), después de ~10 minutos la reacción se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de 30% de H₂SO₄. Los resultados se analizan con un lector de ELISA a 450-630 nm.
- 10 La calidad del antígeno biotinilado se prueba por ELISA. Primero, las placas se recubren con un anticuerpo anti-Her2 (por ejemplo, Herceptin) a 10 µg/ml en PBS, 100 µl/pocillo durante la noche a 4 °C, después de esto la placa se lava 3x con tampón de lavado (WB)(PBS + 0,05% de Tween20) y se bloquea por tampón de bloqueo (BB) (PBS + 2% de BSA) 1 h a temperatura ambiente. Después de 3x lavados con WB, se añaden diferentes concentraciones de Her2-biotina en 100 µl/pocillo de BB durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de 3x lavados con WB. Finalmente, la placa se incuba con 1:25000 de estreptavidina-HRP (GE Healthcare) en BB durante 1 h a temperatura ambiente y se lava 3x con WB. El color se desarrolla añadiendo 100 µl/pocillo del sustrato TMB (Sigma), después de ~10 minutos la reacción se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de 30% de H₂SO₄. Los resultados se analizan con un lector de ELISA a 450-630 nm.
- 15 La calidad del antígeno biotinilado se prueba por ELISA. Primero, las placas se recubren con un anticuerpo anti-Her2 (por ejemplo, Herceptin) a 10 µg/ml en PBS, 100 µl/pocillo durante la noche a 4 °C, después de esto la placa se lava 3x con tampón de lavado (WB)(PBS + 0,05% de Tween20) y se bloquea por tampón de bloqueo (BB) (PBS + 2% de BSA) 1 h a temperatura ambiente. Después de 3x lavados con WB, se añaden diferentes concentraciones de Her2-biotina en 100 µl/pocillo de BB durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de 3x lavados con WB. Finalmente, la placa se incuba con 1:25000 de estreptavidina-HRP (GE Healthcare) en BB durante 1 h a temperatura ambiente y se lava 3x con WB. El color se desarrolla añadiendo 100 µl/pocillo del sustrato TMB (Sigma), después de ~10 minutos la reacción se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de 30% de H₂SO₄. Los resultados se analizan con un lector de ELISA a 450-630 nm.

Ejemplo 6: Producción de Fcab específicas de antígeno (Her2)

- 20 Selección de Fcab específicas de antígeno (Her2) usando FACS

Primera ronda de selección:

Dos días antes de FACS sorting se induce una biblioteca de levadura que contiene 2,5 x10e8 clones de Fcab individuales con medio SG/R-CAA para expresar los Fcabs sobre su superficie celular como se ha descrito anteriormente. Después de dos días, se incuba la cantidad de células que cubre, por ejemplo 10 veces la biblioteca (= 2,5 x10e9), durante 30 minutos sobre hielo con antígeno biotinilado 500 nM (Her2) en 2 ml de SB. Entonces, las células se lavan una vez con SB frío y posteriormente se incuban durante 30' sobre hielo con estreptavidina-PE (de R&D Systems) diluido 1:100 en SB. Las células se lavan dos veces con SB helado y se diluyen a una concentración final de 1x10e9 células/ml. Se hacen tinciones de control con 5x10e6 célula/ml en 100 µl con estreptavidina-PE solo, en ausencia de antígeno. Se analizan tanto la biblioteca completa como las tinciones de control en, por ejemplo, un FACS ARIA de BD. Para fijar las puertas para la clasificación se usan células de control. Primero se establece una puerta de FSC/SSC (G1) para identificar células de levadura sanas, de G1 se hace una representación de anchura de FSC frente al área de FSC y solo se seleccionan células no agregantes en nueva puerta (G2). Las células en G2 se analizan posteriormente para reactividad con estreptavidina-PE usando FSC frente a FL-2 (canal PE). G3 se establece para incluir 0,1% de células positivas (falsas). Posteriormente, se analizan al menos 5x10e8 células teñidas (dos veces el tamaño de la biblioteca, idealmente más) con los parámetros que se indican anteriormente y las células en G3 se clasifican en un tubo que contiene 2-3 ml de medio SD-CAA. Se recogen aproximadamente 5x10e5 células (Conjunto 1) en la primera ronda de selección y se propagan durante 1 a 2 días, después de lo cual las células pueden almacenarse a -80 °C y pueden inducirse alícuotas para expresar las Fcabs como se ha descrito anteriormente. Después de dos días más puede tener lugar la siguiente ronda de selección.

- 40 Segunda ronda de selección:

Se induce el Conjunto 1 seleccionado en la ronda 1 para expresar Fcab sobre su superficie como se ha descrito anteriormente. Se incuban al menos 5x10e6 células (que comprenden múltiples copias del Conjunto 1) durante 30' sobre hielo con antígeno biotinilado 500 nM (Her2) en 1 ml de SB. Entonces las células se lavan una vez con SB frío y posteriormente se incuban durante 30' sobre hielo con estreptavidina-PE (de R&D Systems) diluido 1 en 100 en SB junto con 2 µg/ml de proteína A-FITC (Fluka). A continuación, las células se lavan dos veces con SB helado y se diluyen a una concentración final de ~2x10e6 células/ml. Además, se hacen tinciones de control en las que 5x10e6 células/ml del Conjunto 1 en 100 µl de células se incuban con una mezcla de Prot A y estreptavidina-PE como se indica anteriormente, pero sin la incubación con el antígeno (Her2). Además, 5x10e5 células en 100 µl de un clon de levadura que expresa fragmento Fc no aleatorizado de Fcab wt se tiñe con Prot A-FITC como se ha descrito anteriormente en ausencia de estreptavidina-PE. Las células que expresan Fcab-wt se analizan, por ejemplo, en un FACS ARIA de BD para establecer puertas por clasificación. Primero, se establece una puerta de FSC/SSC (G1) para identificar células de levadura sanas, a partir de G1 se hace una representación de anchura de FSC frente a área de FSC y solo se seleccionan células no agregantes en la nueva puerta (G2).

- 55 Las células en G2 se analizan posteriormente para la expresión de proteína A usando FSC frente a FL-1 (FITC). Se establece que G3 cubre fuertemente células positivas para Prot A (50-60% de puerta parental) y se establece que G4 cubre débilmente células positivas para Prot A (20-30% de células parentales). G3+G4 incluirá aproximadamente el 70-80% de todas las células en G2. Ahora, se usan las células del conjunto teñidas para estreptavidina-PE en presencia de Prot A-FITC para establecer el resto de las puertas de clasificación. Primero, se comprueban G1 y G2

con las células del conjunto y si fuera necesario se ajustan. Las células del conjunto tendrán menos eventos en G3 y pueden también estar en G4, que indica que no todas las células en el Conjunto 1 expresan Fcabs que se pliegan como Fcab-wt. Usando la células del conjunto de control tañidas se prepara una nueva puerta tanto para G3 como G4. Las nuevas puertas se establecen en una representación FSC y FL-2 (PE). Se prepara la puerta (G5) que incluye 5 0,1% de células positivas para estreptavidina (falsas) en G3 y se hace lo mismo para las células en G4 que producen G6. En la siguiente etapa se clasifican al menos 5x10e6 células teñidas para Her2-biotina + estreptavidina-PE y Prot A-FITC por FACS-ARIA. Las células se recogen a partir de G5 (Conjunto 2.1 y G6 (Conjunto 2.2) en tubos separados 10 que contienen 2-3 ml de medio de cultivo de levadura. Pueden esperarse entre 10 y 1000 clones de ambas puertas. Ambos nuevos conjuntos se propagan durante 1 o 2 días y se guardan a -80 °C. Las células de 2.1 y 2.2 puede ser usadas tanto para clasificación adicional directa en una tercera ronda como pueden someterse (preferiblemente después de la mezcla de los dos clones juntos otra vez) a una ronda de aleatorización adicional del bucle AB (maduración por afinidad) antes se clasificarse adicionalmente en FACS.

Maduración por afinidad para clones/conjuntos seleccionados

Para la maduración por afinidad, se introduce diversidad en clones seleccionados o en conjuntos de clones seleccionados en el bucle AB. Para este fin, se hace una PCR con un cebador que contenía codones degenerados en 15 las posiciones 359, 360 y 361 (numeración de EU) (cebador Abmut, gaaccacagggtacaccctgccccatccggatgagctgnnnbnnbca ggtcagctgacctgcc tggtaaaag, SEQ ID No. 26) o alternativamente con un cebador que contenía codones degenerados en las posiciones 358, 359, 360, 361 y 362 (numeración de EU) (cebador Abmut2LR, gaaccacagggtacaccctgccccatccggatgagnnbnnbnnbnnbgtcagc 20 ctgacctgcctggtaaaag, SEQ ID No. 27). El segundo cebador usado en estas PCR es gapfcs3 en ambos casos. Con el fin de crear secuencias flanqueantes para la eficiente reparación de huecos en levadura, los productos de PCR resultantes se amplifican adicionalmente con el par de cebadores gapch35 y gapfsc3 y posteriormente se transforman en la cepa EBY100 de *Saccharomyces cerevisiae* por transformación con acetato de litio junto con pYD1CH12 escindido por Xhol como se ha descrito anteriormente. Como cebadores alternativos para la aleatorización de los 25 restos descritos en el bucle AB, también pueden usarse cebadores tales como Abmut1L (gaaccacagggtacaccctgccccatccggatgagnnbnnbnnbcaggcagc ctgacctgcctggtaaaag, SEQ ID No. 28) o Abmut1R (gaaccacagggtacaccctgccccatccggatgagctgnnnbnnbnnbgtcagcctgactgcctggtaaaag, SEQ ID No. 29). En una manera análoga, los restos en el bucle EF pueden aleatorizarse, por ejemplo, por aleatorización total o 30 por aleatorización usando oligonucleótidos enriquecidos como cebadores o por técnicas de mutagénesis similares. El cebador Abmut dará 8000 variantes nuevas (Conjunto 2.3) de cada clón y el cebador Abmut2LR dará 3x10e6 variantes nuevas (Conjunto 2.4). Por tanto, los Conjuntos 2.3. y 2.4 producirán ambos nuevas bibliotecas de aproximadamente 10e8 individuos ya que el material de partida (Conjunto 2.1+2.2) ya contiene aproximadamente 10-1000 clones.

Tercera ronda de selección

Se inducen los Conjuntos 2.3 y 2.4 madurados por afinidad, y si fuera necesario el Conjunto 2.1 (solo se prefieren las 35 células positivas para Prot A), para expresar Fcabs sobre su superficie celular como se ha descrito anteriormente y posteriormente se clasifican como se describe para "Segunda ronda de selección", con excepción de que los Conjuntos 2.3 y 2.4 son mucho mayores y, por tanto, los volúmenes de tinción para los conjuntos son iguales a aquellos de la tinción de biblioteca descrita en "Primera ronda de selección". En la tercera ronda de selección, solo se clasifican 40 células positivas para Her2/positivas para Prot A. Los conjuntos derivados de estas selecciones contienen normalmente > 20% de células positivas para Her2/Prot A. Si no, entonces puede realizarse una cuarta y quinta (o incluso más) ronda(s) de selección que combinan Prot A con Her2.

Análisis de clones:

Se preparan clones individuales de conjuntos que contienen células Her2/Prot A (se prefiere > 20%) tanto sembrando 45 los conjuntos sobre placas de agar con medio SD-CAA como clasificando las células individuales (=clones) directamente a partir de FACS ARIA sobre las placas sin generar un conjunto. Se deja que los clones crezcan y se transfieren a cultivos líquidos y se guardan a -80 °C. Las alícuotas de los clones son posteriormente inducidas para expresar Fcabs sobre su superficie celular como se ha descrito anteriormente y se criban para varios parámetros en 50 FACS. Estos parámetros pueden ser: un intervalo de respuesta a dosis del antígeno usado para la selección (Her2) con y sin la presencia de Prot A-FITC, tinción de CD64 como se ha descrito anteriormente. Además, usando protocolos de tinción similares pueden cribarse varios antígenos biotinilados irrelevantes para identificar Fcabs que reaccionan no de forma cruzada.

Cabe esperar que, después de varias rondas de selección de células positivas para antígeno (Her2) + Prot A, un gran 55 porcentaje de clones muestre >25% de positividad de antígeno (Her2) cuando se tiñan con antígeno 500 nM (Her2) y > 70% de positividad de Prot A cuando se tiñan con 2 µg/ml de Prot A-FITC. En la mayoría de los casos estos clones también mostrarán > 50% de unión a CD64. Imitando así los niveles de Prot A y CD64 de fragmentos Fc no aleatorizados (Fcab wt) expresados en levadura.

Clones seleccionados como se ha descrito anteriormente con características como se han descrito anteriormente están ahora listos para ser producidos como moléculas solubles. Esto puede hacerse por transfección transitoria o por transfección estable del ADN de Fcаб en nuevas células huésped. Para este fin, el ADN de clones de levadura

- individual se aísla usando procedimientos convencionales. El ADN relevante que codifica el dominio CH3 completo o solo la parte del dominio CH3 que se aleatoriza en la biblioteca se amplifica por PCR y se transfiere a un nuevo vector de expresión que contiene la parte que falta de Fcab + un promotor adecuado y uno o más marcadores de selección tales como G418, que permite la selección de células transfectadas fuera de un conjunto de células no transfectadas.
- 5 El nuevo vector se transfecta transitoriamente entonces, por ejemplo, en una nueva célula huésped tal como HEK293 o CHO. Se dejan recuperar las células huésped y posteriormente se cultivan durante varios días. El sobrenadante de los cultivos contendrá el Fcab soluble que puede usarse para la prueba adicional con o sin purificación sobre, por ejemplo, Prot A. También pueden prepararse líneas celulares estables mediante procedimientos convencionales.

Tabla 2. Secuencias de clones de Her2 seleccionados: con referencia a la numeración de Seq.ID No.1

| Nombre de clon | Bucle AB AA143ff | Bucle EF AA198ff |
|------------------|----------------------|------------------------------|
| Fcab wt | LTKNQ | -----DKSRWQQ |
| y-Her.C2-P3.1-1 | LDNSQ (SEQ ID No.30) | IRSSVGSRRWWWS (SEQ ID No.51) |
| y-Her.C2-P3.1-3 | YEGSS (SEQ ID No.31) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.52) |
| y-Her.C2-P3.1-5 | YMSAD (SEQ ID No.32) | SRRDSSLLRWAH (SEQ ID No.53) |
| y-Her.C2-P3.1-6 | YRRGD (SEQ ID No.33) | APGSKGYRRWAL (SEQ ID No.54) |
| y-Her.C2-P3.1-8 | LMSRQ (SEQ ID No.34) | DKPFWGTSRWSR (SEQ ID No.55) |
| y-Her.C2-P3.1-16 | LHLAQ (SEQ ID No.35) | SINDLINHRWPY (SEQ ID No.56) |
| y-Her.C2-P3.1-18 | YLSKD (SEQ ID No.36) | MWGSRDYWRWSH (SEQ ID No.57) |
| y-Her.C2-P3.2-3 | YRSGS (SEQ ID No.37) | NSGSAMMVRWAH (SEQ ID No.58) |
| y-Her.C2-P3.2-9 | LRDGQ (SEQ ID No.38) | QRSRLSRQRWWR (SEQ ID No.59) |
| y-Her.C2.P4.2-1 | YSANT (SEQ ID No.39) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.60) |
| y-Her.C2.P4.2-3 | YASNT (SEQ ID No.40) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.61) |
| y-Her.C2.P4.2-4 | YSDGD (SEQ ID No.41) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.62) |
| y-Her.C2.P4.2-5 | YSGGS (SEQ ID No.42) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.63) |
| y-Her.C2.P4.2-6 | YGRDS (SEQ ID No.43) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.64) |
| y-Her.C2.P4.2-8 | YAGGT (SEQ ID No.44) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.65) |
| y-Her.C2.P4.2-10 | YSSDS (SEQ ID No.45) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.66) |
| y-Her.C2.P4.2-12 | YHSGS (SEQ ID No.46) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.67) |
| y-Her.C2.P4.2-15 | YLTNS (SEQ ID No.47) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.68) |
| y-Her.C2.P4.2-18 | YGSEE (SEQ ID No.48) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.69) |
| y-Her.C2.P4.2-19 | YRSGE (SEQ ID No.49) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.70) |
| y-Her.C2.P4.2-20 | YGTDD (SEQ ID No.50) | ARYSPRMLRWAH (SEQ ID No.71) |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una biblioteca que contiene al menos 10^2 clones independientes de dímeros funcionales de dominios de anticuerpo modulares que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3, siendo dichos dímeros capaces de unirse a una diana y a un ligando de armazón seleccionado del grupo que consiste en CD64, CD16, CD32, receptores Fc, FcRn, albúmina sérica, Proteína A, Proteína G y Proteína L, en el que el ligando de armazón se une al esqueleto de cada dímero independientemente de la especificidad objetivo del dímero, y en el que la unión del ligando de armazón al esqueleto del dímero indica que el dímero se expresa y plega correctamente, y en el que cada dímero comprende un sitio de unión a antígeno para dicha diana en una región de bucle estructural del dominio CH2 o del dominio CH3.
- 10 2. Una biblioteca según la reivindicación 1, en la que el ligando de armazón se selecciona del grupo que consiste en FcRn, Proteína A y Proteína G.
3. Una biblioteca según la reivindicación 1, en la que el ligando de armazón se selecciona del grupo que consiste en CD64, CD16, CD32 y receptores Fc.
4. Una biblioteca según la reivindicación 1, en la que el ligando de armazón es proteína A.
5. Una biblioteca según la reivindicación 1, en la que el ligando de armazón es CD64.
- 15 6. Una biblioteca según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los dímeros funcionales de dominios modulares de anticuerpos son de origen humano.
7. Una biblioteca según la reivindicación 6, en la que los dímeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares se derivan de IgG1 humana.
- 20 8. Una biblioteca según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que los dímeros funcionales de dominios modulares de anticuerpos son fragmentos Fc de unión a antígeno.
9. Una biblioteca según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la biblioteca es una biblioteca de levadura y la célula huésped de levadura presenta en la superficie de la célula el dímero funcional de dominios de anticuerpo modulares.
- 25 10. Una biblioteca según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la biblioteca contiene al menos 10^6 clones independientes de dímeros funcionales de dominios de anticuerpos modulares que incluyen un dominio CH2 y un dominio CH3.

ES 2 975 748 T3

Figura 1

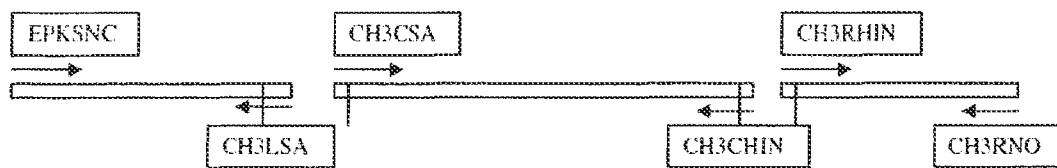


Figura 2

