

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 121**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2017 PCT/JP2017/035504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2018 WO18062495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2017 E 17856444 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023 EP 3521307**

54 Título: **Método de adquisición de anticuerpos**

30 Prioridad:

**30.09.2016 JP 2016192472**

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

**14.03.2023**

73 Titular/es:

**CHIOME BIOSCIENCE INC. (100.0%)  
3-12-1 Honmachi, Shibuya-ku  
Tokyo 151-0071, JP**

72 Inventor/es:

**KAMIMURA, YOSUKE y  
YAMAMOTO, KOTARO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 936 121 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de adquisición de anticuerpos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para obtener un anticuerpo. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para obtener un anticuerpo que se une a un antígeno con alta afinidad a partir de una colección de anticuerpos.

Antecedentes de la técnica

10 El anticuerpo, como componente principal, se une a un antígeno específico en un cuerpo vivo y provoca diversas reacciones biológicas de defensa. El fármaco de anticuerpo es un agente terapéutico que utiliza las propiedades antes mencionadas de un anticuerpo y, por lo tanto, se requiere que un anticuerpo terapéutico tenga una alta especificidad antigénica y una alta afinidad por un antígeno diana.

15 La afinidad de un anticuerpo por un antígeno se indica a menudo como una constante de disociación KD. El método de análisis comúnmente utilizado es la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). De acuerdo con el análisis cinético, se miden una constante de velocidad de asociación (valor ka o valor kon) y una constante de velocidad de disociación (valor kd o valor koff), y luego se calcula KD. Se requiere que un anticuerpo monoclonal, como candidato para el desarrollo de productos farmacéuticos, tenga un valor KD de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor. Por ejemplo, Humira (marca registrada) y Lucentis (marca registrada), que se han utilizado como fármacos de anticuerpos, son anticuerpos de alta afinidad que tienen una KD de  $3,0 \times 10^{-11}$  M y  $4,6 \times 10^{-11}$  M, respectivamente (Bibliografías No Patente 1 y 2).

20 Los métodos de producción de anticuerpos se clasifican en métodos que utilizan la inmunización animal y métodos que no utilizan la inmunización animal. Como método para utilizar la inmunización animal se ha aplicado, por ejemplo, un método de hibridoma que comprende inmunizar un animal con un antígeno y luego fusionar las células B obtenidas con mielomas. Sin embargo, este método ha sido problemático, porque se requieren tiempo y esfuerzo para obtener un anticuerpo porque se utilizan animales, y porque no se puede obtener un anticuerpo debido a la tolerancia inmunológica en algunos casos. Como método para no utilizar la inmunización animal se ha aplicado, por ejemplo, un método de presentación en fagos. Este es un método que comprende presentar un anticuerpo monocatenario que consiste en una región variable de anticuerpo (fragmento variable monocatenario; scFv) a partículas de fago para obtener un clon que se une a un antígeno diana. Sin embargo, este método ha sido problemático porque la calidad de una colección depende de una diversidad de scFv y porque se generan cambios en la especificidad o afinidad en el proceso de convertir scFv en un anticuerpo de longitud completa.

30 Además de las técnicas de producción de anticuerpos arriba descritas, se ha desarrollado una técnica de producción de anticuerpos mediante la utilización de una línea de células DT40 derivadas de células B de pollo, el sistema ADLib (marca registrada), y se ha hecho posible utilizar una colección capaz de generar anticuerpos humanos de acuerdo con la transferencia génica (Bibliografía de Patentes 1, 2 y 3, y Bibliografía No Patente 3). Dado que un clon que tiene un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno se puede seleccionar de una colección de acuerdo con este sistema, se puede evitar la inmunotolerancia y se puede obtener rápidamente un anticuerpo de longitud completa. Lo que es más, dado que la diversificación de las secuencias de genes de anticuerpos se produce principalmente como resultado de la recombinación homóloga (conversión de genes) en las aves, este sistema tiene la ventaja de que pueden esperarse cambios en las secuencias de genes de anticuerpos de acuerdo con un mecanismo diferente de la diversificación de seres humanos o ratones.

40 Ya se han llevado a cabo varios medios para obtener anticuerpos de alta afinidad, pero al mismo tiempo dichos medios presentan varios problemas. En la inmunización de animales se ha aplicado un método de inmunización repetida de un animal con el mismo antígeno para inducir células B que expresan anticuerpos de alta afinidad, que se denomina "inmunizaciones múltiples". Sin embargo, este método requiere tiempo y esfuerzo, y también es probable que aumente la unión no específica. En el método de presentación en fagos, se ha aplicado un método de selección repetida de un clon de anticuerpo que se une a un antígeno diana para concentrar un clon con alta afinidad. Sin embargo, puede haber algunos casos en los que un anticuerpo de cadena sencilla con alta afinidad pierda su afinidad cuando se cambia a un anticuerpo de longitud completa. Además, también se ha utilizado un método de introducir aleatoriamente una mutación en la secuencia de una región variable de anticuerpo obtenida por cada método, para obtener un anticuerpo de alta afinidad. Sin embargo, la afinidad no mejora necesariamente. De lo contrario, mientras se mejora la afinidad, es probable que aumenten los enlaces no específicos, o es probable que el anticuerpo obtenido no pueda expresarse y/o funcionar correctamente como resultado de la mutación introducida.

55 Además de los métodos mencionados anteriormente, también se ha desarrollado un método para fomentar la diversificación de secuencias para obtener un anticuerpo de alta afinidad. Ejemplos de dicho método incluyen: métodos de utilización: inmunización de animales usando ratones GANP (marca registrada), en los que se inducen muchas mutaciones somáticas en la región variable del anticuerpo de células B del centro germinal en comparación con ratones normales de tipo salvaje (Bibliografía de Patentes 4); células B aviares que comprenden un gen XRCC3 inactivado (Bibliografía de Patentes 5); células B aviares en las que se ha controlado la expresión de un gen AID (Bibliografía de Patentes 6); o una línea celular DT40-SWΔC, en la que se ha introducido AID mutante con actividad AID potenciada

asociada con la introducción de mutaciones (Bibliografía No Patente 4). Sin embargo, todos estos métodos no siempre están directamente ligados con la mejora de la afinidad.

5 Como se mencionó anteriormente, con respecto a los fármacos de anticuerpos, es un objeto extremadamente importante obtener un anticuerpo que tenga alta afinidad y, por lo tanto, se ha deseado desarrollar un método para obtener simplemente un anticuerpo de este tipo que tenga alta afinidad con alta probabilidad.

Lista de Citas

Bibliografía de Patentes

Bibliografía de Patentes 1: Patente Japonesa N° 4214234

Bibliografía de Patentes 2: Documento WO2008/047480

10 Bibliografía de Patentes 3: Documento WO2015/167011 (documento EP3138903)

Bibliografía de Patentes 4: Patente Japonesa N° 4478577

Bibliografía de Patentes 5: Publicación de Patente JP (Kokai) N° 2009-060850 A

Bibliografía de Patentes 6: Patente Japonesa N° 4487068

Bibliografía No Patente 1: Kaymakcalan y col., Clin. Immunol., Vol. 131, 308-316, 2009

15 Bibliografía No Patente 2: Papadopoulos y col., Angiogenesis, Vol. 15, 171-185, 2012

Bibliografía No Patente 3: Seo y col., Nature Biotechnol., Vol. 23, 731-735, 2005

Bibliografía No Patente 4: Yuichi Kanehiro et al.: Abstract of Annual Meeting, The Society for Biotechnology, Japón, p. 109, 2008.

Bibliografía No Patente 5: Sigal y col., Annu. Rev. Immunol. Vol. 10, 519-560, 1992

20 Sumario de la Invención

Problema Técnico

Teniendo en cuenta las circunstancias arriba descritas, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para obtener un anticuerpo de una colección de anticuerpos de células B aviarias y, más específicamente, proporcionar un método para obtener un anticuerpo que tenga alta afinidad de una colección de anticuerpos de células B aviarias.

25 Solución al Problema

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos dirigidos a obtener un anticuerpo que tenga alta afinidad por un antígeno diana. Como resultado, los inventores han hecho reaccionar una colección de anticuerpos de células B aviarias con un antígeno diana en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar, han seleccionado células B que generan un anticuerpo específico para el antígeno y luego han cultivado las células B junto con un inhibidor de la calcineurina y suero aviar, por lo que los inventores han logrado obtener un anticuerpo con alta afinidad.

30 El inhibidor de la calcineurina se ha utilizado como un agente inmunosupresor en el trasplante de órganos y el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Se sabe que FK506 y ciclosporina A, que son inhibidores de la calcineurina, se unen específicamente a FKBP y ciclofilina, respectivamente, para formar un complejo con calcineurina, suprimiendo así la activación de las células T. Se dice que, en las células B, la calcineurina está asociada con la diferenciación o el crecimiento de las células B (Bibliografía No Patente 5). Sin embargo, los efectos proporcionados por el inhibidor de la calcineurina aún no se conocen bien.

35 En las circunstancias antes mencionadas, los presentes inventores han descubierto que se puede obtener un anticuerpo que exhibe una alta afinidad por un antígeno mediante la obtención de células B que generan un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno diana de una colección de anticuerpos de células B aviarias en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar, completando así la presente invención.

40 Por lo tanto, la presente invención incluye los siguientes (1) a (9).

(1) Un método para obtener un anticuerpo de una colección de anticuerpos de células B aviarias, que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

45 (a) una etapa para permitir que una colección de anticuerpos de células B aviarias entre en contacto con un antígeno en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar,

(b) una etapa de selección de células B aviares que se unen al antígeno en la etapa (a) en presencia de inhibidor de la calcineurina y suero aviar,

(c) una etapa de cultivo de las células B aviares seleccionadas en la etapa (b) en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar, y

5 (d) una etapa para obtener las células B aviares obtenidas a través de la etapa (c) y un anticuerpo expresado por las células B aviares.

(2) El método de acuerdo con el (1) anterior, que comprende, además, una etapa para determinar las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y/o cadena pesada del anticuerpo expresado por las células B aviares obtenidas en la etapa (d).

10 (3) El método de acuerdo con el (1) anterior, que se caracteriza porque las células B aviares son células B de pollo.

(4) El método de acuerdo con el (3) anterior, que se caracteriza porque las células B de pollo son células DT40.

(5) El método de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores (1) a (4), que se caracteriza porque el método es para obtener un anticuerpo que tiene una constante de disociación de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor.

15 (6) El método de acuerdo con una cualquiera de los anteriores (1) a (5), que se caracteriza porque el inhibidor de la calcineurina es FK506 y/o ciclosporina A.

(7) El método de acuerdo con una cualquiera de los anteriores (1) a (6), que se caracteriza porque el anticuerpo expresado por las células B aviares es IgM o IgG.

20 (8) El método de acuerdo con una cualquiera de los anteriores (1) a (7), que se caracteriza porque el anticuerpo expresado por las células B aviares es un anticuerpo aviar, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

(9) Un método para producir un anticuerpo, que se caracteriza porque el método comprende el método de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores (1) a (8).

#### Efectos Ventajosos de la Invención

25 De acuerdo con el método de la presente invención, es posible obtener de forma sencilla y rápida un anticuerpo que tiene una alta afinidad por un antígeno diana.

#### Breve Descripción de los Dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra los resultados de la clasificación de células individuales.

30 La Figura 1 muestra los citogramas obtenidos mediante la clasificación de células individuales en un medio complementado con suero aviar (CS) y FK506 (en lo sucesivo denominado "medio CS/FK506") (a), y en un medio no complementado con CS y FK506 (en lo sucesivo denominado "medio CS(-)") (b).

[Figura 2] La Figura 2 muestra el examen ELISA de fase sólida de antígeno.

35 La Figura 2 muestra ejemplos de los resultados de ELISA en fase sólida de antígeno, usando los sobrenadantes de cultivo de un grupo de reacción de medio CS/FK506 (a) y un grupo de reacción de medio CS(-) (b). El eje horizontal indica el número de clon. hVEGF-A se usa como antígeno y hTNF-alfa, lisozima y estreptavidina (que se denomina "SA" en la figura) se usan como antígenos negativos.

[Figura 3] La Figura 3 muestra los resultados de los sensogramas SPR de un grupo CS/FK506 (10 tipos). El número de clon se muestra en la parte superior derecha de cada sensograma.

[Figura 4] La Figura 4 muestra los resultados de los sensogramas SPR de un grupo CS(-) (10 tipos).

[Figura 5] La Figura 5 muestra los resultados de los sensogramas SPR de un grupo común (6 tipos).

40 [Figura 6] La Figura 6 muestra una constante de tasa de asociación (kon), una constante de tasa de disociación (koff) y un valor KD, que se obtienen entre un antígeno y un anticuerpo.

Con respecto a los clones del grupo CS(-) o del grupo CS/FK506, se realizó una comparación en cuanto al valor medio de cada parámetro ((a) kon, (b) koff y (c) KD).

45 [Figura 7] La Figura 7 muestra un gráfico de correlación de la estabilidad con respecto a la unión entre un antígeno y un anticuerpo.

Se trazaron las unidades de respuesta (RU) de Unión y Estabilidad en el grupo CS(-), el grupo CS/FK506 y el grupo

común. La línea continua indica el grupo CS(-) y la línea punteada indica el grupo CS/FK506, respectivamente.

#### Descripción de Realizaciones

La realización de la presente invención se refiere a un método para obtener un anticuerpo a partir de una colección de anticuerpos de células B aviares, en particular, un método para obtener un anticuerpo con alta afinidad, en donde el método comprende las siguientes etapas (a) a (d):

- 5
- (a) una etapa para permitir que una colección de anticuerpos de células B aviares entre en contacto con un antígeno en presencia de un inhibidor de la calcineurina (por ejemplo, FK506 o ciclosporina A, etc.) y suero aviar,
  - (b) una etapa de seleccionar células B aviares que se unen al antígeno en la etapa (a) en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar,
  - 10 (c) una etapa de cultivo de las células B aviares seleccionadas en la etapa (b) en presencia de un inhibidor de la calcineurina (por ejemplo, FK506 o ciclosporina A, etc.) y suero aviar, y
  - (d) una etapa para obtener las células B aviares obtenidas mediante la etapa (c) y/o un anticuerpo expresado por las células B aviares.

15 En la presente descripción, la expresión "en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar" significa un estado en el que un inhibidor de la calcineurina y suero aviar están presentes en un medio o una solución. Ejemplos del inhibidor de la calcineurina incluyen un compuesto (con un peso molecular bajo, un peso molecular medio o un peso molecular alto), una proteína, un péptido y un ácido nucleico, que son capaces de inhibir la actividad de la calcineurina. Además, un compuesto (con un peso molecular bajo, un peso molecular medio o un peso molecular alto), una proteína, un péptido, un ácido nucleico y similares, que reducen o eliminan la expresión de calcineurina, también pueden usarse como inhibidores de la calcineurina. Ejemplos preferidos del inhibidor de la calcineurina incluyen ciclosporina A y FK506 y, además, también se puede usar un análogo de ciclosporina A o un análogo de FK506. La concentración del inhibidor de la calcineurina en un medio o una solución no está particularmente limitada. Por ejemplo, la ciclosporina A se usa deseablemente en una concentración de 5 nM o menos, y FK506 se usa deseablemente en una concentración de 1  $\mu$ M o menos.

20 Además, aparte del método de añadir un inhibidor de la calcineurina, también se pueden utilizar células B aviares, en las que se ha reducido o eliminado la expresión de calcineurina y, por tanto, también es posible obtener los efectos equivalentes a los de la presencia de un inhibidor de la calcineurina.

25 El suero aviar utilizado es preferiblemente suero de pollo, y puede utilizarse el suero de un ave adulta o el suero de un ave joven. La concentración de suero aviar utilizado no está limitada, y es deseable utilizar el suero aviar en una concentración de, por ejemplo, 10 % o menos, y más preferiblemente, 5 % o menos. El inhibidor de la calcineurina y suero aviar se agregan deseablemente en las etapas (a) y (c), pero se pueden agregar o no en las etapas (b) y/o (d).

30 La "colección de anticuerpos de células B aviares" utilizada en la presente realización es una población de células B aviares que generan una diversidad de anticuerpos. Además, en la presente descripción, la "colección de anticuerpos de células B aviares" incluye no solo una población de células B aviares que generan diferentes anticuerpos, sino también una población de células B aviares que generan anticuerpos de un solo tipo. Aquí, las células B aviares no están particularmente limitadas, y ejemplos de las células B aviares incluyen células DT40 como una línea celular derivada de células B de pollo y células B de pollo de origen biológico. Además, ejemplos de células B aviares también incluyen células B aviares, en las que se ha realizado un tratamiento de introducción de una diversidad de mutaciones, tales como las células B aviares en las que se ha inactivado un gen XRCC3 (Publicación de Patente JP (Kokai) N° 2009-060850 A), células B aviares, en las que se ha controlado la expresión de un gen AID (Publicación de Patente JP (Kokai) N° 2006-109711 A), células B aviares, en las que se ha diversificado una secuencia de anticuerpos usando un inhibidor de HDAC (Histona Deacetilasa) que comprende TSA (Tricostatina A) y células B aviares, en las que se ha introducido en el cromosoma de las mismas una secuencia génica extraña o una parte de la misma (p. ej., células B aviares, en las que se ha introducido cualquier secuencia de gen de anticuerpo dada, etc.).

35 El cultivo, etc. de la "colección de anticuerpos de células B aviares" utilizada en la presente realización se puede llevar a cabo fácilmente de acuerdo con un método bien conocido por un experto en la técnica y, por lo tanto, las condiciones de cultivo, etc., no están particularmente limitadas. Por ejemplo, en el caso de que las células B aviares sean células DT40, se puede utilizar medio IMDM (Invitrogen), etc., y las células se pueden cultivar en presencia de aproximadamente un 5 % de CO<sub>2</sub> a aproximadamente 39,5 °C.

40 Además, la "colección de anticuerpos de células B aviares" arriba descrita también puede haber sido cultivada, de antemano, en presencia de un inhibidor de la calcineurina (por ejemplo, FK506, etc.) y suero aviar, antes de permitir que entre en contacto con un antígeno.

45 En la presente realización, ejemplos del "anticuerpo generado a partir de células B aviares" incluyen un anticuerpo aviar, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En la presente descripción, el anticuerpo quimérico es un anticuerpo formado por la unión de regiones que tienen diferentes orígenes entre sí, y

ejemplos del anticuerpo quimérico incluyen un anticuerpo formado por la unión de una región variable a una región constante, cuyos orígenes son diferentes entre sí, y un anticuerpo formado por la unión de una región Fab a una región Fc, cuyos orígenes son diferentes entre sí, pero no se limitan a ellos. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico de ave-ratón es un anticuerpo formado al enlazar la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado de un gen aviar con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado de un gen de ratón. Otros ejemplos del anticuerpo quimérico incluyen: un anticuerpo quimérico de ave-ser humano formado al enlazar la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado de un gen aviar con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado de un gen humano; un anticuerpo quimérico de ave-conejo formado al enlazar la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado de un gen aviar con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado de un gen de conejo; y un anticuerpo quimérico de ave-cabra formado al enlazar la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado de un gen aviar con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo derivado de un gen de cabra.

El anticuerpo humanizado es un anticuerpo en el que, entre las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo generado, algunas secuencias son secuencias derivadas de genes aviares y otras secuencias son secuencias derivadas de genes humanos. Por otro lado, el anticuerpo humano es un anticuerpo en el que todas las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo generado son secuencias derivadas de genes humanos.

Además, en la presente realización, el "anticuerpo generado a partir de células B aviares" incluye anticuerpos que comprenden la totalidad o una parte de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos derivados de especies animales distintas de las aves. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos que comprenden la totalidad o una parte de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos obtenidos de un ratón, una rata, un conejo, un bovino, una cabra y similares.

En la presente realización, los isotipos del "anticuerpo generado a partir de células B aviares" no están particularmente limitados. Ejemplos de un isotipo de este tipo incluyen IgM, IgG, IgA e IgY.

En la presente realización, el "anticuerpo de alta afinidad" significa un anticuerpo que tiene una alta afinidad de unión a un antígeno. La constante de disociación (KD) se usa comúnmente como un índice de la afinidad de unión de un anticuerpo. Un ejemplo de afinidad de unión preferida es, pero no se limita particularmente a afinidad que tiene una constante de disociación de  $1 \times 10^{-5}$  M o menos,  $1 \times 10^{-6}$  M o menos,  $1 \times 10^{-7}$  M o menos,  $1 \times 10^{-8}$  M o menos,  $1 \times 10^{-9}$  M o menos,  $1 \times 10^{-10}$  M o menos o  $1 \times 10^{-11}$  M o menos. La constante de disociación también puede ser  $1 \times 10^{-15}$  M o más,  $1 \times 10^{-14}$  M o más,  $1 \times 10^{-13}$  M o más,  $1 \times 10^{-12}$  M o más,  $1 \times 10^{-11}$  M o más,  $1 \times 10^{-10}$  M o más, o  $1 \times 10^{-9}$  M o más. Una afinidad de este tipo se puede medir mediante un método bien conocido por un experto en la materia y, en general, el método de medición es deseablemente un método SPR y, además de SPR, también se puede aplicar un método BLI (interferometría de bio-capas, por sus siglas en inglés). Además, la afinidad también se puede medir mediante un método de equilibrio, y ejemplos de dicho método de equilibrio que se pueden aplicar aquí incluyen FCM (citometría de flujo) y ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

Ejemplos del "antígeno" usados en la presente realización incluyen un compuesto (con un peso molecular bajo, un peso molecular medio o un peso molecular alto), una proteína, un péptido, un lípido y un ácido nucleico. El "antígeno" usado aquí también puede ser, por ejemplo, un compuesto marcado, un complejo de un compuesto y una proteína, un complejo de un compuesto y un anticuerpo, un complejo de una proteína y un anticuerpo, etc. La proteína puede ser una proteína secretada en fluido corporal, una proteína expresada en la superficie de una célula, una proteína presentada por una bacteria, un virus, una partícula similar a un virus o una lipopartícula, o una proteína reconstruida a partir de una proteína de membrana tal como Nanodisc. Por ejemplo, puede usarse una citocina, un factor de crecimiento, una hormona, un receptor o similares. Además, en el caso de obtener un anti-anticuerpo, se puede utilizar un anticuerpo como antígeno. En el caso de usar un anticuerpo como antígeno, se puede usar un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, o similares. Con respecto a la forma de un anticuerpo, puede usarse un anticuerpo de longitud completa, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv, Fc, etc.), una proteína que comprende las secuencias de aminoácido de las regiones variables de la cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo, y similares, pero no se limitan a los mismos. El antígeno puede someterse a modificación química tal como modificación postraduccional y la modificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, con azúcar, ácido fosfórico o lípido.

En la presente realización, la expresión "para permitir que una colección de anticuerpos de células B aviares entre en contacto con un antígeno" significa la creación de un estado, en el que una célula (grupo) que constituye la colección puede entrar en contacto (interactuar) con un antígeno, o la creación de un estado, en el que un anticuerpo se expresa en la superficie de la célula (grupo) o se puede permitir que un anticuerpo secretado por la célula entre en contacto (interactúe) con un antígeno. Por ejemplo, el contacto de la colección de anticuerpos de células B aviares con el antígeno puede llevarse a cabo agregando una cantidad adecuada de antígeno a un medio o una solución de la colección y luego cultivando la mezcla durante un período de tiempo adecuado, aunque el método de contacto no se limita a ello.

Como antígeno usado en el presente documento se puede usar un antígeno marcado o un antígeno etiquetado. Ejemplos del antígeno marcado que se puede usar aquí incluyen: un antígeno que está marcado directamente con biotina o un colorante fluorescente; y un antígeno que está marcado indirectamente a través de un anticuerpo o similar.

Ejemplos del antígeno etiquetado que se pueden usar en este documento incluyen antígenos a los que se les asigna una etiqueta como una etiqueta FLAG, una etiqueta His, una etiqueta Myc, una etiqueta Strep, GST (glutación S-transferasa), MBP (proteína de unión a maltosa) o GFP (proteína fluorescente verde).

5 En la "etapa de seleccionar células B aviares que se unen a un antígeno" de la presente realización se puede aplicar preferentemente un método de selección de células B aviares que se unen a un antígeno marcado o a un antígeno etiquetado, utilizando perlas magnéticas sobre las que se inmovilizan anticuerpos, proteínas o compuestos específicos. Por ejemplo, las células B aviares unidas a antígeno pueden seleccionarse utilizando Dynabeads (marca registrada) (Thermo Fisher) o microperlas MACS (Miltenyi Biotec), o también pueden seleccionarse utilizando un anticuerpo antietiqueta marcado con fluorescencia o similar.

10 En la "etapa de cultivo de células B aviares seleccionadas en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar" de la presente realización, el tiempo de cultivo de las células B aviares en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 168 horas.

15 En la presente realización, las células B aviares obtenidas como resultado del cultivo de las células B aviares seleccionadas en presencia de un inhibidor de la calcineurina (por ejemplo, FK506 o ciclosporina A, etc.) y suero aviar incluyen células B aviares que expresan un anticuerpo de alta afinidad. El anticuerpo secretado por las células B aviares se puede obtener como un anticuerpo de alta afinidad y luego, mediante la determinación de las secuencias génicas de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo expresado por las células B aviares, se puede obtener la secuencia génica del anticuerpo de alta afinidad.

20 Además, las células B aviares se cultivan en un medio que no está complementado con un inhibidor de la calcineurina y suero aviar para obtener un "grupo de control", mientras que las células B aviares se cultivan en un medio complementado con un inhibidor de la calcineurina y suero aviar para obtener un "grupo de inhibidores de la calcineurina/suero aviar". A continuación, se determinan las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos expresados por los dos grupos anteriores. Posteriormente, el anticuerpo expresado por las células B aviares derivadas del "grupo inhibidor de la calcineurina/suero aviar" que expresa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la del "grupo de control" puede seleccionarse como un candidato de anticuerpo de alta afinidad.

25 La presente invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo ejemplos ilustrativos de las realizaciones de la presente invención y, por lo tanto, no pretenden limitar el alcance de la presente invención, que se define en las reivindicaciones.

## 30 Ejemplos

### Selección de anticuerpos de alta afinidad

#### 1. Construcción de vector de expresión de antígeno

35 Se sintetizaron la secuencia del gen de VEGF 165 como una isoforma del VEGF-A humano (secuencia de aminoácidos 27-191, UniProt<sup>®</sup> P15692-4, en lo sucesivo denominada "hVEGF-A") y la secuencia del gen del TNF-alfa humano (secuencia de aminoácidos 77-233, UniProt<sup>®</sup> P01375, en lo sucesivo denominada "hTNF-alfa"). De acuerdo con la PCR, se agregó una etiqueta FLAG al extremo N de cada secuencia y luego, cada una de ellas se insertó en un vector pEF1 (V92020, Invitrogen) para obtener los vectores de expresión, FLAG-hVEGF-A/pEF1 y FLAG-hTNF-alfa/pEF1.

#### 2. Introducción y expresión de genes

40 El método de introducción de genes se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos de NeoFection (N462, ASTEC CO., LTD.). Células FreeStyle 293F (R790-07, Life Technologies) ( $1,0 \times 10^6$  células/mL), que habían sido transfectadas con los vectores de expresión (FLAG-hVEGF-A/pEF1 y FLAG-hTNF-alfa/pEF1) utilizando NeoFection, se sometieron a cultivo en agitación a 37 °C, en presencia de 8 % de CO<sub>2</sub> durante 5 días, en 3 L de una solución de cultivo (BioShaker CO2-BR-180LF, TAITEC). Para el cultivo se utilizó Medio de Expresión FreeStyle 293 (12338-026, Life Technologies) y Penicilina-Estreptomomicina al 1 % (15140-122, Life Technologies).

#### 45 3. Purificación de antígeno

50 Se recuperó cada sobrenadante de cultivo (3 L), luego se adsorbió en gel de afinidad ANTI-FLAG M2 (A2220-25ML, SIGMA) y luego se lavó con D-PBS(-) (045-29795, Wako). A continuación, lo resultante se eluyó con 0,1 mg/mL de péptido FLAG (F-3290, SIGMA) y D-PBS(-). Cada fracción y la fracción de flujo continuo se confirmaron mediante SDS-PAGE y Transferencia Western usando anticuerpo monoclonal ANTI-FLAG M2 producido en ratón (F3165-1MG, SIGMA). Se recuperó una fracción que comprendía una proteína de interés, luego se concentró utilizando Amicon Ultra-15 10K (UFC901024, Millipore) y luego se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (MILLEX-GV, SLGVJ13SL, Millipore).

La muestra de purificación FLAG concentrada se eluyó de D-PBS(-) utilizando una columna de filtración en gel de 120 mL, HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (28-9893-35, GE Healthcare). Cada fracción se observó por SDS-PAGE y, como resultado, se confirmó que la proteína de interés estaba purificada.

Después de completar la filtración en gel y la purificación, la muestra se concentró utilizando Amicon Ultra-15 10K y luego se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. La concentración de la proteína en cada uno de los antígenos purificados (hVEGF-A y hTNF-alfa) se calculó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000c.

#### 4. Cultivo de la colección

- 5 El método de cultivo de una colección humana utilizando, como huésped, una célula DT40 que es una línea celular derivada de células B de pollo se llevó a cabo mediante el siguiente método. Las células se cultivaron a 39,5 °C, en presencia de 5 % de CO<sub>2</sub>. Como medio se utilizó IMDM (12440-079, Life Technologies), que se complementó con FBS al 10 % (11824, Biosera) y penicilina-estreptomicina al 1 %. De aquí en adelante, un medio CS(-) indica el medio antes mencionado, a menos que se especifique lo contrario. Por otra parte, un medio complementado con CS/FK506 indica un medio CS(-), al que se le añade un suero aviar al 5 % (16110-082, Life Technologies) y 1 µM de FK506 (1007965, Cayman).

#### 5. Adsorción específica utilizando perlas magnéticas y clasificación celular continua mediante citómetro de flujo

- 15 Como colección se utilizó la colección humana descrita en el documento WO2015/167011. Se prepararon dos conjuntos de colecciones, y una de las colecciones se suspendió en el medio complementado con CS/FK506, y la otra colección se suspendió en el medio CS(-). A la colección suspendida en cada medio se añadieron el antígeno hVEGF-A (concentración final: 10 nM) y un anticuerpo anti-FLAG marcado con biotina (F9291-1MG, SIGMA) (cantidad: 1/500), y la mezcla así obtenida se hizo reaccionar a continuación a 4 °C durante 30 minutos, mientras se realizaba la mezcladura por inversión. Una vez completada la reacción, lo resultante se lavó dos veces con cada medio y luego se suspendió de nuevo en cada medio. Microperlas anti-Biotina UltraPure (130-105-637, Miltenyi Biotec) (cantidad: 1/100), IgG-PE anti-humano de cabra (2040-09, SouthernBiotech) (cantidad: 1/10000) y conjugado de estreptavidina Alexa Fluor 647 (S21374, Life Technologies) (cantidad: 1/1000) se añadieron a la suspensión, y la mezcla obtenida se hizo reaccionar luego a 4 °C durante 10 a 30 minutos, mientras se realizaba la mezcladura por inversión. Una vez completada la reacción, la concentración de la columna se llevó a cabo utilizando autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) y la fracción que no se adsorbió en la columna (fracción negativa) se midió utilizando FACS Aria Fusion (BD), de modo que se ajustó el intervalo de clasificación. Después de ello, se cargó una cantidad total de muestra de fracción positiva y luego se llevó a cabo la clasificación, de modo que se pudiera agregar una población de células positivas, en una cantidad de una sola célula/pocillo, en una placa de 96 pocillos, en la que cada medio había sido dispensado (Figura 1). Con respecto al grupo de reacción del medio complementado con CS/FK506, se clasificaron 170 pocillos (una sola célula/pocillo) en el medio complementado con CS/FK506. Con respecto al grupo de reacción del medio CS(-), se clasificaron 255 pocillos (una sola célula/pocillo) en el medio CS(-).

#### 6. Cribado según ELISA en fase sólida de antígeno

- Una solución de antígeno hVEGF-A y una solución de antígeno de control negativo (20 µL cada una), que se habían diluido a 2,5 µg/mL con D-PBS(-) (14249-24, Nacalai Tesque, Inc.), se dispensaron cada una en MAXISORP 384 IMMUNO PLATE (464718, NUNC), y luego se hicieron reaccionar a 4°C, durante la noche, para la consolidación. Posteriormente, la solución se eliminó por centrifugación usando una pequeña centrífuga especializada para microplacas (GYRO mini GM-01, MICRONIX), y luego se agregaron 45 µL de una solución de bloqueo (PBS que contenía BSA al 1 % (A8022, SIGMA)) al residuo, seguido de realizar una reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eso, la solución se eliminó por centrifugación con GYRO mini y luego se agregaron 25 µL de un sobrenadante de cultivo al residuo, seguido de una reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eso, la solución se eliminó por centrifugación con GYRO mini, y luego se agregaron al residuo 25 µL de IgG anti-humano de cabra-Fc conjugado con HRP (A80-104P, BETHYL), que se había diluido 2000 veces con una solución de bloqueo, seguido de una reacción a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente, lo resultante se lavó cinco veces con una solución de lavado (PBS que contenía Tween20 al 0,05 % (167-11515, Wako)) y luego se añadieron 25 µL de TMB (53-00-02, KPL) a lo resultante, seguido de realizando de una reacción durante 5,5 minutos. Posteriormente, se añadieron 25 µL de ácido sulfúrico 1 N (192-04696, Wako) a la solución de reacción para terminar la reacción y luego se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas (infinite M1000, TECAN). Como antígenos negativos se usaron el hTNF-alfa preparado, lisozima (L6876, SIGMA) y estreptavidina (32243-24, Nacalai Tesque, Inc., indicado como "SA" en la figura). Se utilizó como DO un valor de corrección obtenido restando el fondo de la absorbancia obtenida, y la relación S/N indica un valor obtenido según la fórmula: DO (hVEGF-A) / DO (hTNF-alfa).
- 50 El grupo de reacción del medio complementado con CS/FK506 se cultivó durante 6 días después de completar la clasificación y luego se sometió a ELISA en fase sólida con antígeno. La formación de colonias se confirmó en 113 pocillos de los 170 pocillos clasificados, y en los 113 pocillos se confirmaron 63 clones que reaccionaban específicamente con antígenos (DO > 1; relación S/N > 10) (Tabla 1 y Figura 2).
- 55 El grupo de reacción del medio CS(-) se cultivó durante 7 días después de completar la clasificación y luego se sometió a ELISA en fase sólida de antígeno. La formación de colonias se confirmó en 148 pocillos de los 255 pocillos clasificados, y en los 148 pocillos se confirmaron 43 clones que reaccionaban específicamente con antígenos (DO > 1; relación S/N > 10) (Tabla 1 y Figura 2).

[Tabla 1]

Condiciones	Número de pocillos clasificados	Número de colonias en crecimiento	Tasa de crecimiento	Numero positivo	
				DO > 1	DO > 0,2
CS/FK506	170	113	66,5%	63	78
CS(-)	255	148	58,0%	43	75

### 7. Análisis y agrupación de secuencias

5 Todos los clones positivos, que cumplieran los estándares (DO > 1, y relación S/N > 10), se analizaron en términos de secuencia de anticuerpo de la región variable del mismo, y los clones positivos cuyas regiones variables, incluidas las de la región pesada y las cadenas ligeras que codificaban la misma secuencia de aminoácidos se clasificaron en un grupo. De acuerdo con este método, se llevó a cabo la agrupación. Finalmente, se confirmó que había 16 tipos de grupos de reacción de medio complementados con CS/FK506 y 16 tipos de grupos de reacción del medio CS(-). Entre ellos, se confirmó la presencia de 6 tipos en los dos grupos anteriores (Tabla 2). En lo sucesivo, el grupo que tiene una secuencia común en ambos grupos se denominará "grupo común" y grupos de secuencias, en los que dicho grupo común se eliminó del grupo de reacción del medio CS(-) y del grupo de reacción del medio complementado con CS/FK506, se denominaron "grupo CS(-)" y "grupo CS/FK506", respectivamente.

[Tabla 2]

Grupo de secuencia	Número de grupos
Grupo CS/FK506	10
Grupo CS(-)	10
Grupo común	6

### 15 8. Cribado de afinidad

Con respecto a los 26 tipos de clones representativos de los grupos de secuencias individuales, se preparó de nuevo un sobrenadante de cultivo y luego se midió la afinidad por el antígeno según un método SPR (Biacore T200, GE Healthcare). Utilizando el kit de captura de anticuerpos humanos (BR100839, GE Healthcare), se inmovilizó un anticuerpo IgG (Fc) anti-humano en un chip sensor CM5 (BR100530, GE Healthcare), y luego se capturó el anticuerpo en el sobrenadante del cultivo. A continuación, se dejó que reaccionara hVEGF-A 100 nM durante 240 segundos y luego se disoció durante 300 segundos. Después de eso, como solución de regeneración, MgCl<sub>2</sub> 3 M se dejó reaccionar con lo resultante durante 30 segundos y, por lo tanto, se completó un ciclo. Como tampón se utilizó HBS-EP+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y surfactante P20 al 0,05 % (v/v) (pH 7,4) (BR100669, GE Healthcare)) y se llevó a cabo la medición. a un caudal de 30 µL/min. Varios clones se midieron de nuevo utilizando hVEGF-A 30 nM de acuerdo con los mismos protocolos que los descritos anteriormente. Los sensogramas SPR de anticuerpos obtenidos de los clones representativos de grupos de secuencias individuales se compararon entre sí. Como resultado, muchos clones mostraron un sensograma en forma de caja con una gran tasa de asociación y una gran tasa de disociación, pero varios clones mostraron una tasa de disociación extremadamente baja (Figura 3 a Figura 5).

30 Empleando el software de evaluación Biacore T200 se llevó a cabo el ajuste en cada sensograma SPR de acuerdo con un modelo de enlace Langmuir 1:1, para calcular la constante de velocidad de asociación  $k_{on}$  y la constante de velocidad de disociación  $k_{off}$ . Luego, de acuerdo con la ecuación:  $KD = k_{off}/k_{on}$ , se determinó el valor de KD. Los clones del grupo CS(-) y del grupo CS/FK506 se compararon entre sí, en cuanto al valor medio de cada parámetro (Figura 6). Como resultado, el valor de  $k_{on}$  fue mayor y el valor de  $k_{off}$  fue menor en el grupo CS/FK506 que en el grupo CS(-), y el valor KD fue aproximadamente 4,7 veces menor en el grupo CS/FK506 que en el grupo CS(-) grupo (Tabla 3).

[Tabla 3]

Grupo	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	KD (M)
Grupo CS/FK506	2,73 E + 07	6,39 E -03	1,66 E -09
Grupo CS(-)	3,87 E + 06	2,20 E -02	7,83 E -09

Además, para confirmar la tasa de disociación del anticuerpo, la unidad de respuesta (RU) 5 segundos antes de la finalización de la medición de la reacción de asociación en el sensograma obtenido se definió como "Unión", y la RU 5 segundos antes de la finalización de la la reacción de disociación se definió como "Estabilidad" y se trazó la correlación de la Estabilidad con la Unión (Figura 7). Como resultado, se reveló que el valor de Estabilidad era mayor en el grupo CS/FK506 que en el grupo CS(-), es decir, que había muchos clones que tenían una tasa de disociación lenta. Además, se calculó la inclinación a partir de la fórmula de aproximación de cada grupo de acuerdo con la

regresión lineal, y luego se compararon los grupos individuales en términos del porcentaje de disociación de un complejo anticuerpo-antígeno. Como resultado, el porcentaje de disociación fue menor en el grupo CS/FK506 que en el grupo CS(-) (Tabla 4). Estos resultados sugieren que, en el grupo CS/FK506, el anticuerpo debería unirse al antígeno incluso después del inicio de la reacción de disociación con alta probabilidad.

5

[Tabla 4]

Grupo	Inclinación	Porcentaje de disociación (%)
Grupo CS(-)	0,19	81
Grupo CS/FK506	0,63	37

#### Aplicabilidad Industrial

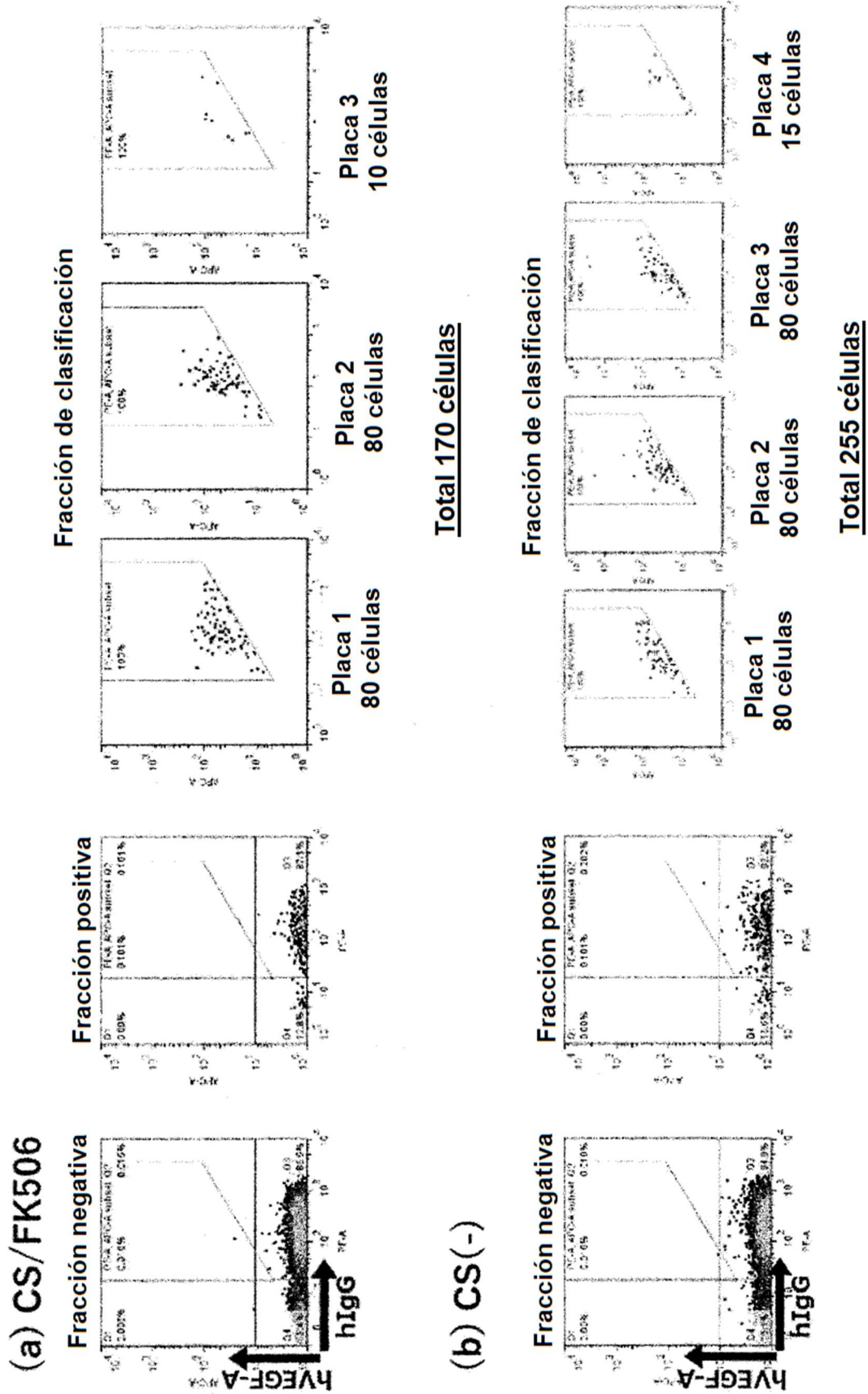
La presente invención se refiere a un método para obtener un anticuerpo que se une a un antígeno de interés con alta afinidad. Por lo tanto, se espera que la presente invención se utilice en el campo de la medicina y la farmacia que están asociados con fármacos de anticuerpos, o en el campo del uso de anticuerpos como reactivos de investigación.

10

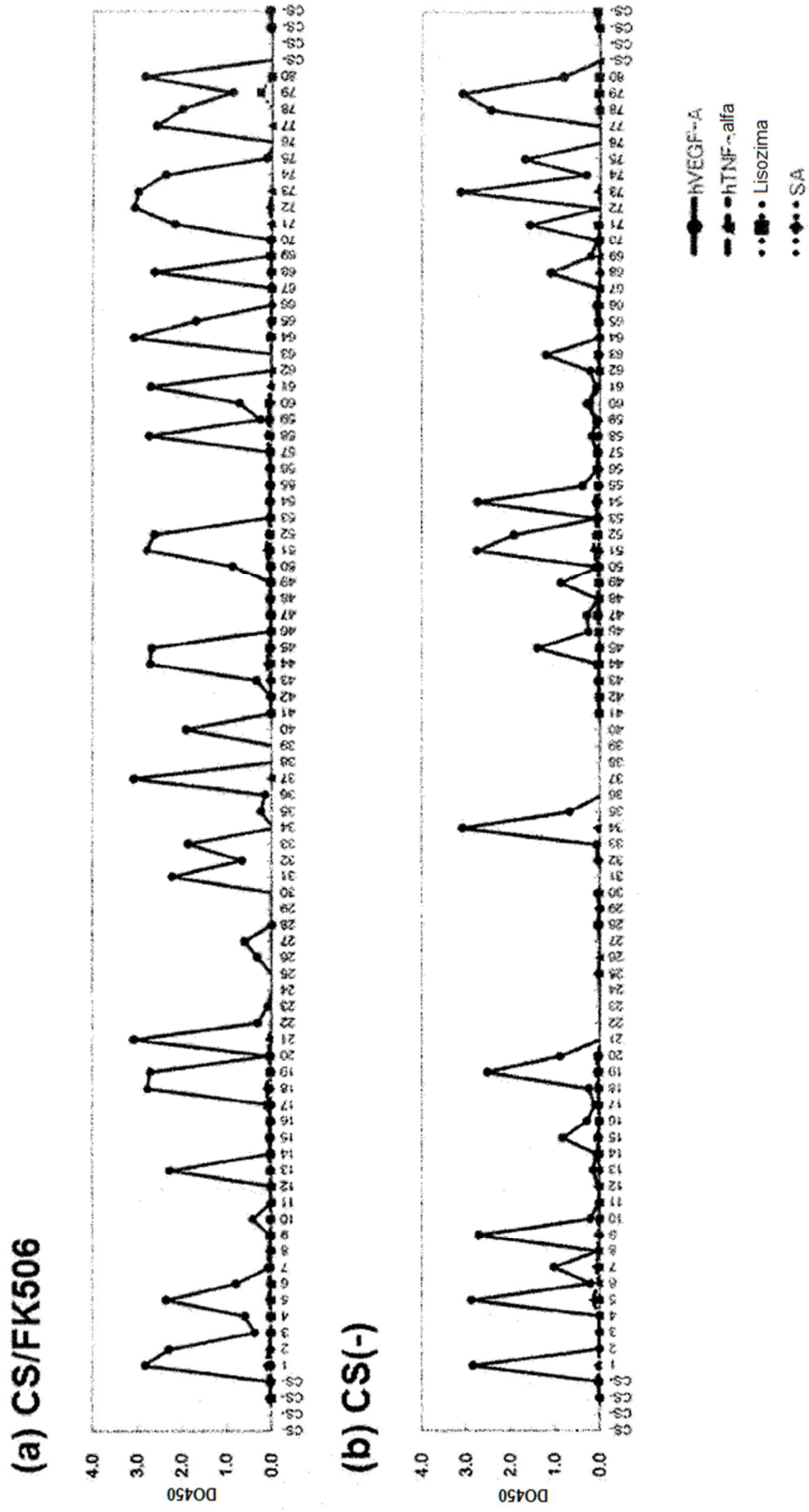
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para obtener un anticuerpo de una colección de anticuerpos de células B aviares, que comprende las siguientes etapas (a) a (d):
- 5 (a) una etapa para permitir que una colección de anticuerpos de células B aviares entre en contacto con un antígeno en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar,
- (b) una etapa de seleccionar células B aviares que se unen al antígeno en la etapa (a) en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar,
- (c) una etapa de cultivar las células B aviares seleccionadas en la etapa (b) en presencia de un inhibidor de la calcineurina y suero aviar, y
- 10 (d) una etapa para obtener las células B aviares obtenidas a través de la etapa (c) y un anticuerpo expresado por las células B aviares.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, una etapa para determinar las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera y/o cadena pesada del anticuerpo expresado por las células B aviares obtenidas en la etapa (d).
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza por que las células B aviares son células B de pollo.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que se caracteriza por que las células B de pollo son células DT40.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza por que el método es para obtener un anticuerpo que tenga una constante de disociación de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor.
- 20 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se caracteriza por que el inhibidor de la calcineurina es FK506 y/o ciclosporina A.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se caracteriza por que el anticuerpo expresado por las células B aviares es IgM o IgG.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se caracteriza por que el anticuerpo expresado por las células B aviares es un anticuerpo aviar, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 25 9. Un método para producir un anticuerpo, que se caracteriza por que el método comprende el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

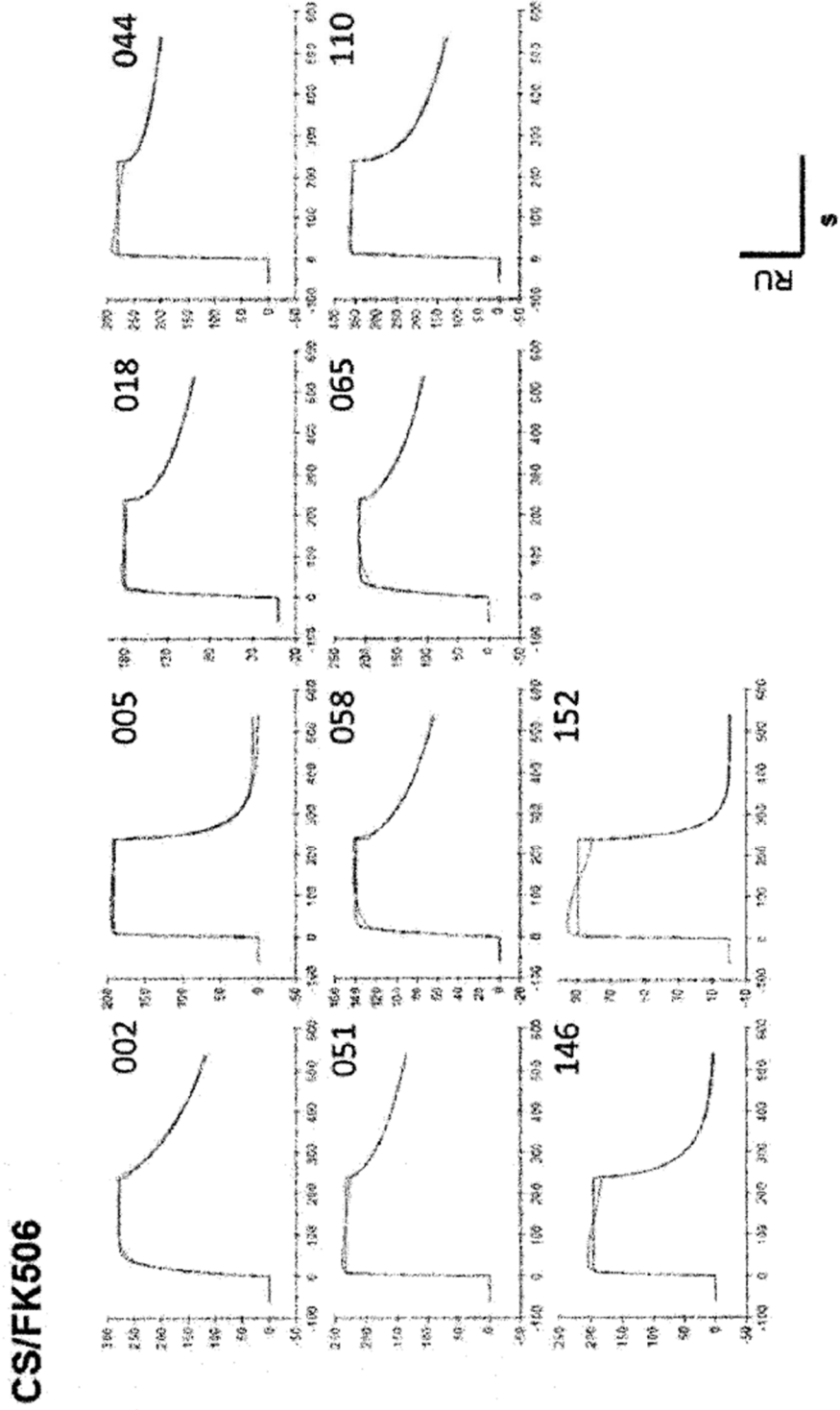
[Figura 1]



[Figura 2]

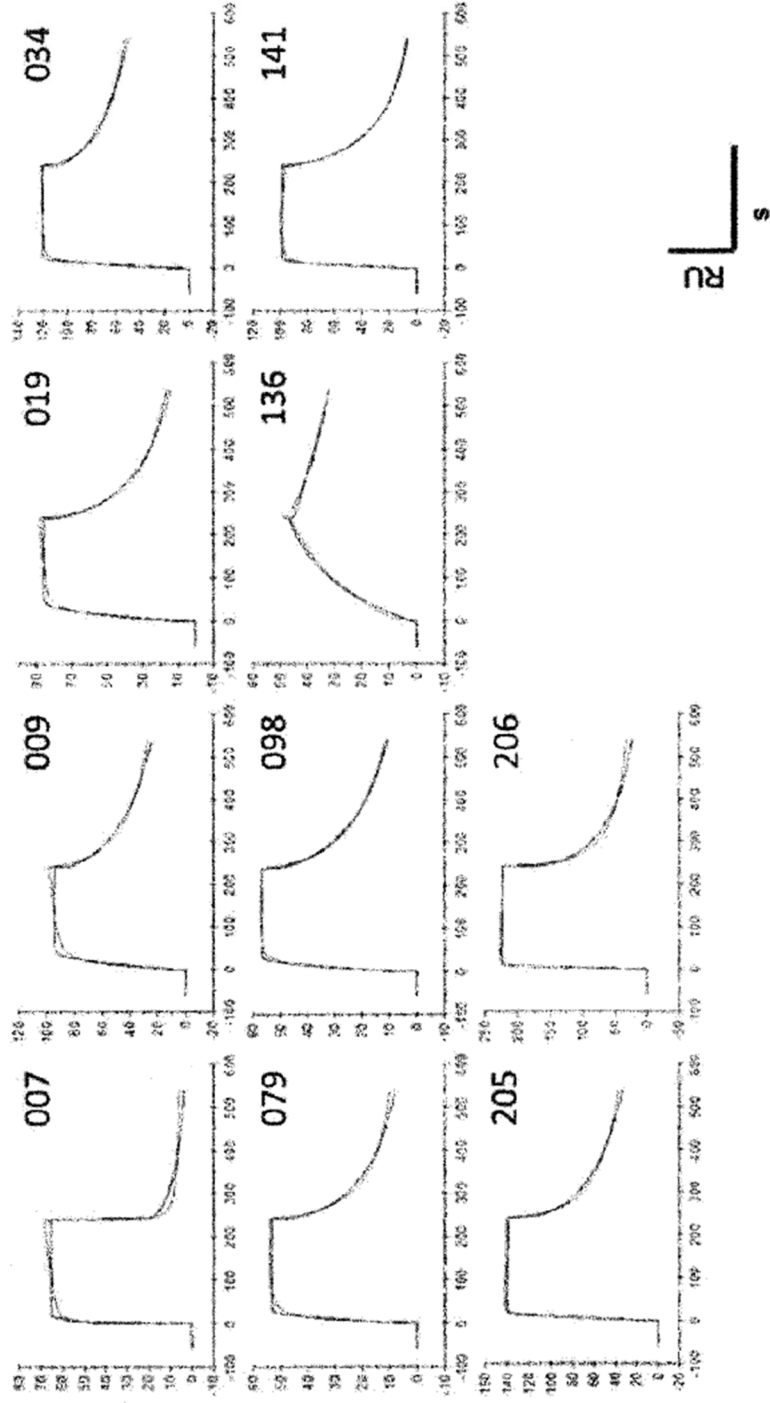


[Figura 3]

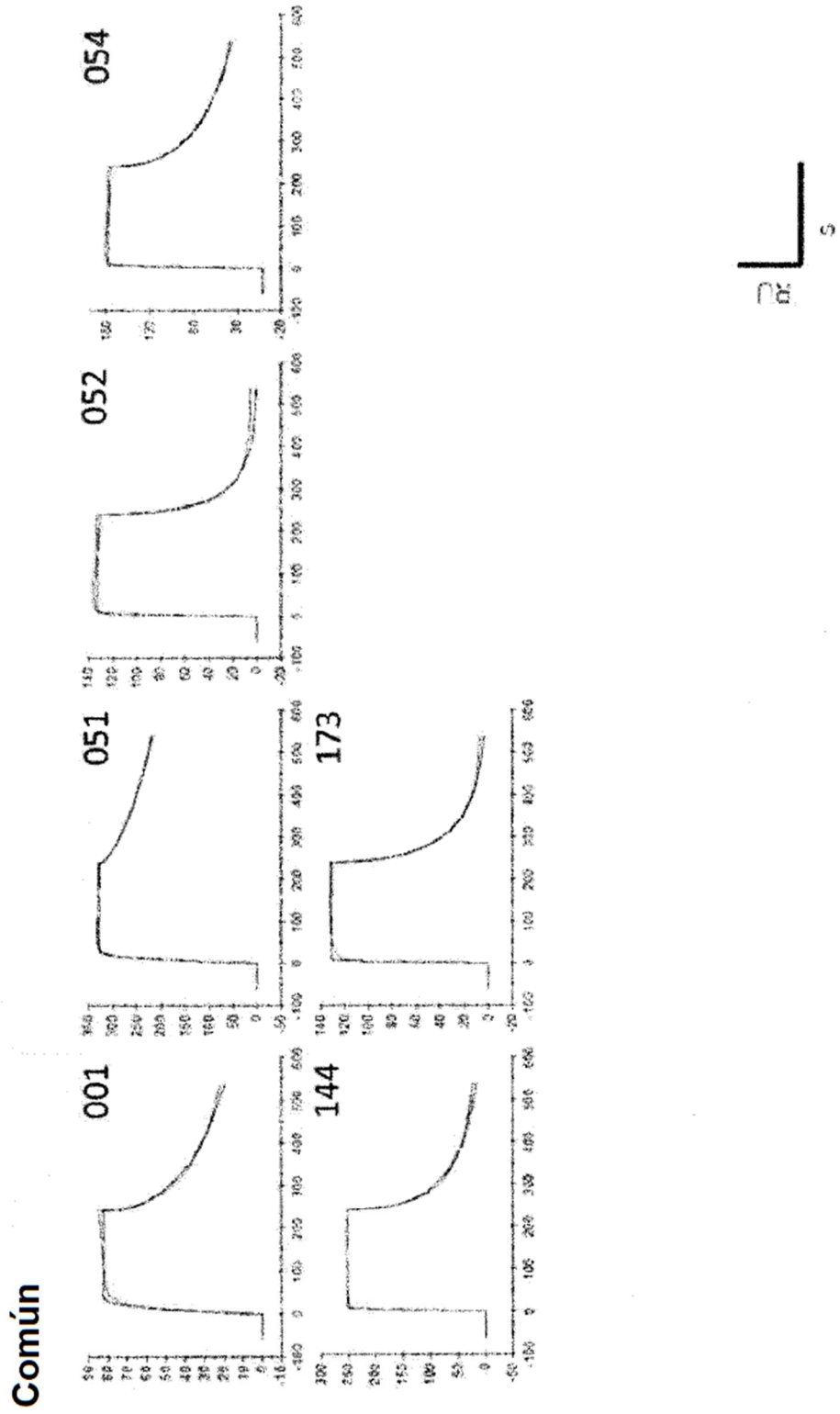


[Figura 4]

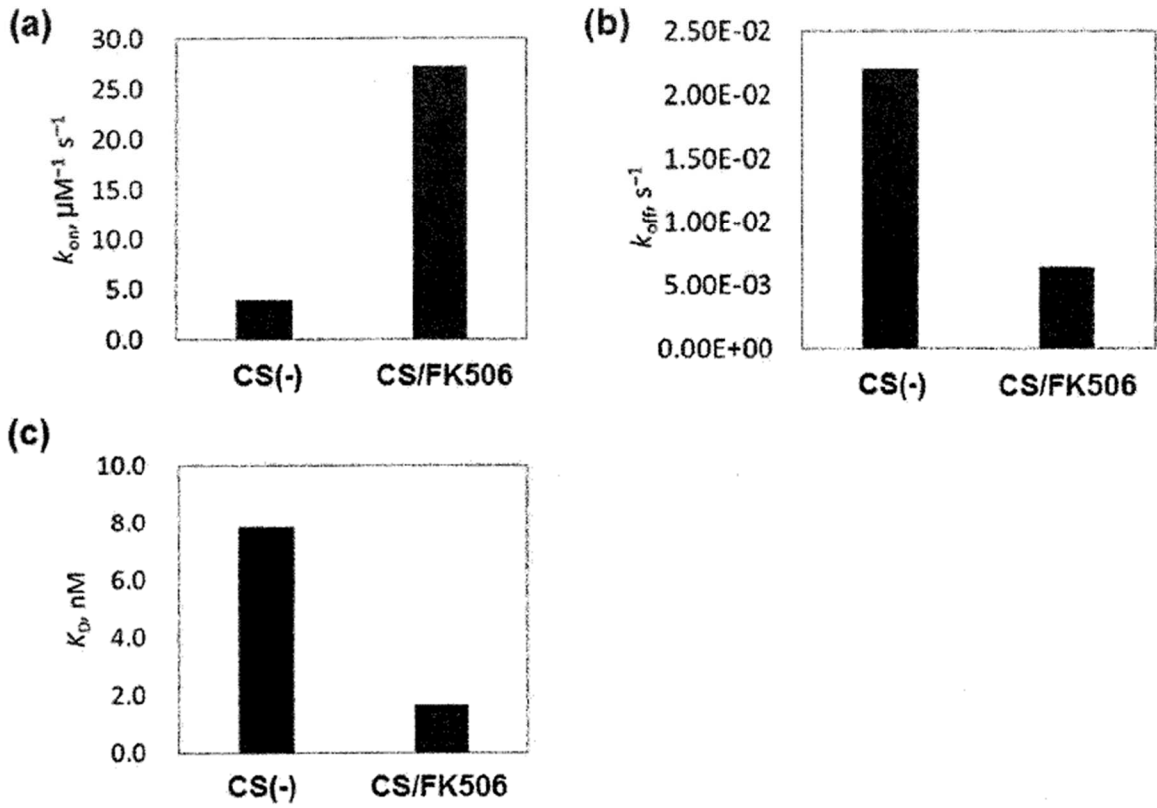
CS(-)



[Figura 5]



[Figura 6]



[Figura 7]

