



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 861**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06011173 .9**  
96 Fecha de presentación : **05.01.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1772465**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2007**

54 Título: **Dominios de inmunoglobulina sintética con propiedades de enlace modificadas en regiones de la molécula diferentes de las regiones de determinación de complementariedad.**

30 Prioridad: **05.01.2005 US 641144 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.06.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.06.2009**

73 Titular/es: **f-star Biotechnologische Forschungs-  
und Entwicklungsges. mbH**  
**Gastberggasse 5-13**  
**1230 Wien, AT**

72 Inventor/es: **Wozniak-Knopp, Gordana;**  
**Rüker, Florian y**  
**Himmler, Gottfried**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 321 861 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

Dominios de inmunoglobulina sintética con propiedades de enlace modificadas en regiones de la molécula diferentes de las regiones de determinación de complementariedad.

La presente invención se refiere a un método para el diseño y fabricación de una inmunoglobulina modificada.

El campo general es la ingeniería de proteínas con la finalidad de conferirles propiedades de enlace específicas. Más específicamente, las proteínas de diseño de relevancia aquí son inmunoglobulinas (anticuerpos), y aún más específicamente, dominios sencillos o pares o combinaciones de dominios sencillos de inmunoglobulinas. Las propiedades de enlace específicas de inmunoglobulinas son características importantes ya que controlan la interacción con moléculas tales como antígenos, y hacen útiles a las inmunoglobulinas para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

La estructura de anticuerpos básica se explicará aquí utilizando como ejemplo una inmunoglobulina IgG1 intacta.

Dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos ligeras idénticas (L) se combinan para formar la molécula de anticuerpo en forma de Y. Las cadenas pesadas tienen cada una cuatro dominios. Los dominios variables amino terminales (VH) están en las puntas de la Y. Estos son seguidos por tres dominios constantes: CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> carboxi terminal, en la base del tronco Y. Un tramo corto, el conmutador, conecta las regiones constantes y variables de la cadena pesada. La bisagra conecta CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> (el fragmento Fc) al resto de anticuerpo (los fragmentos Fab). Un Fc y dos fragmentos Fab idénticos se pueden producir por escisión proteolítica de la bisagra en una molécula de anticuerpo intacta. Las cadenas ligeras están construidas con dos dominios, el variable (VL) y el constante (CL), separados por un conmutador.

Los enlaces disulfuro en la región bisagra conectan dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se acoplan a las cadenas pesadas por enlaces disulfuro adicionales. Las porciones carbohidrato enlazadas por Asn se conectan en diferentes posiciones en dominios constantes dependiendo de la clase de inmunoglobulina. En 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 a través de dos enlaces disulfuro adicionales, entre Cys229s en los dominios CH<sub>1</sub> y Cys214s en los dominios CL. Las porciones carbohidrato se conectan a la Asn306 de cada CH<sub>2</sub>, generando un bulto pronunciado en el tronco de la Y.

Estas características tienen consecuencias funcionales profundas. Las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras (VH) y (VL) se encuentran en las "puntas" de la Y, donde se ubican para reaccionar con el antígeno. Esta punta de la molécula es el lado en el que se ubica el extremo N de la secuencia de aminoácidos. El tronco de la Y se proyecta de forma que medie eficientemente en funciones efectoras tales como la activación del complemento y la interacción con receptores Fc o ADCC y ADCP. Sus dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> se abultan para facilitar la interacción con proteínas efectoras. El extremo C de la secuencia de aminoácidos se ubica en el lado opuesto de la punta, que puede denominarse "fondo" de la Y. La estructura de una IgG1 intacta se ilustra en la Figura 1a.

En los anticuerpos se encuentran dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Una inmunoglobulina dada, tiene cadenas  $\kappa$  o cadenas  $\lambda$ , nunca una de cada. No se ha encontrado diferencia funcional entre anticuerpos que tengan con cadenas ligeras  $\kappa$  o  $\lambda$ .

La organización estructural de los monómeros de la clase de inmunoglobulina humana principal se ilustra en la Figura 1b. Las clases difieren en la composición y la secuencia de sus cadenas pesadas respectivas. Tanto IgM como IgE carecen de una región bisagra pero cada una contiene un dominio de cadena pesada extra (CH<sub>4</sub>). Los números y las ubicaciones de los enlaces disulfuro (líneas) que enlazan las cadenas difieren entre los isotipos. También difieren en la distribución de los grupos carbohidrato N-enlazados, mostrados simbólicamente como círculos.

Cada dominio en una molécula de anticuerpo tiene una estructura similar de dos hojas beta empaquetadas apretadamente entre sí en un barril beta antiparalelo comprimido. Esta estructura conservada se denomina pliegue de la inmunoglobulina. El pliegue de la inmunoglobulina de dominios constantes contiene una hoja de 3-hebras empaquetadas contra una hoja de 4-hebras. El pliegue se estabiliza por puentes de hidrógeno entre las hebras beta de cada hoja, por enlace hidrofóbico entre los residuos 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, la hoja de 4-hebras tiene las hebras A, B, E y D. Las letras A a G representan las posiciones secuenciales de las hebras beta sobre la secuencia de aminoácidos del pliegue de la inmunoglobulina.

El pliegue de los 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 los dominios constantes, pero contiene las hebras extra C' y C''. El resto de las hebras (A, B, C, D, E, F, G) tiene la misma topología y una estructura similar a sus complementarias en el dominio constante de los pliegues de la inmunoglobulina. Un enlace disulfuro une las hebras B y F en hojas opuestas, como en los dominios constantes. El pliegue de la inmunoglobulina se ilustra en la Figura 2 para un dominio constante y uno variable de una inmunoglobulina.

Los dominios variables tanto de las cadenas de inmunoglobulina ligeras como de las pesadas contienen tres bucles hipervariables, o regiones para la determinación de complementariedad (Es). Las tres CDRs de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDRs son bucles que conectan las hebras beta B-C, C'-

## ES 2 321 861 T3

C'' y F-G del pliegue de la inmunoglobulina. Los residuos en las CDRs varían de una molécula de inmunoglobulina a otra, impartiendo especificidad de antígeno a cada anticuerpo.

5 Los dominios VL y VH en las puntas de las moléculas de anticuerpo están estrechamente empaquetados de tal manera que las 6 CDRs (3' en cada dominio) cooperan para construir una superficie (o cavidad) para el enlace específico de antígeno. Así, el sitio de enlace del antígeno natural de un anticuerpo se compone de 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.

10 Utilizando la estructura 3D de una proteína como ayuda para diseño, los residuos aminoácido ubicados en la superficie de muchas proteínas se han distribuido aleatoriamente utilizando como patrón la estructura del núcleo de la proteína. Ejemplos de esta estrategia se describen o resumen en las siguientes referencias, incorporadas aquí por referencia: Nygren PA, Uhlen M., *Curr Opin Struct Biol.* (1997) 7:463-9; Binz HK, Amstutz P, Kohl A, Stumpp MT, Briand C, Forrer P, Grutter MG, Pluckthun A. *Nat Biotechnol.* (2004) 22:575-82; Vogt M, Skerra A. *Chembiochem.* (2004) 5:191-9; US 6,562,617.

20 El principio básico de esta técnica se base en la observación de que muchas proteínas tienen un núcleo estable, formado por configuraciones específicas de elementos de estructura secundaria, tales como hojas beta o hélices alfa, que se interconectan a través de estructuras tales como bucles, giros o vueltas o espirales al azar. Típicamente, estos tres elementos estructurales son poco cruciales para la estructura total de la proteína, y los residuos aminoácido en estos elementos estructurales pueden intercambiarse a menudo sin destruir el pliegue general de la proteína. Un ejemplo de origen natural para este principio de diseño son las CDRs de los anticuerpos. Ejemplos artificiales incluyen lipocalinas, anquirinas y otros patrones de proteínas.

25 Los bucles que no son bucles CDR en una inmunoglobulina nativa no tienen especificidad de unión a antígeno o a epítipo pero contribuyen al pliegue correcto de la molécula de inmunoglobulina y/o su efector u otras funciones y por lo tanto se denominan bucles estructurales para el propósito de esta invención.

30 En la patente de los E.U.A. N° 6,294,654 se muestra que pueden elaborarse anticuerpos alterados donde un antígeno peptídico se puede incorporar en un bucle no-CDR de un anticuerpo (Ab) en la región CH<sub>1</sub> entre la región bisagra y la región variable, y el Ab resultante puede ser recuperado en una APC de tal manera que el antígeno peptídico se presente en la superficie de la APC en el contexto de MHC II, produciendo de este modo una respuesta inmune. Estos péptidos insertados son epítopos y la estructura total de la molécula portadora no es importante. Se demostró que un péptido ras puede situarse en un bucle (no-CDR) de una inmunoglobulina y ésta aún ser secretada. Hay un "control de calidad" severo en las células que evita que la inmunoglobulina sea secretada a menos que se pliegue adecuadamente, y alterar la secuencia de aminoácidos del bucle puede provocar que la proteína pliegue en una estructura que la célula detectará como incorrecta, y por lo tanto la degradará. De esta manera, además de los ejemplos mostrados, se considera difícil modificar adicionalmente los bucles estructurales sin cambiar la naturaleza de la inmunoglobulina.

40 La solicitud de patente de los E.U.A. N° 2004/0101905 describe el enlace de moléculas que comprenden un sitio de enlace diana y un péptido efector Fc. El péptido efector Fc es un péptido que interactúa con la molécula efectora. Se muestra la inserción de un péptido efector en un bucle no-DDR de un dominio CH<sub>1</sub> de un fragmento de inmunoglobulina.

45 Los péptidos efectores Fc son estructuras de origen natural en bucles no-CDR de anticuerpos y por lo tanto se espera que no perturben la estructura de la inmunoglobulina si se injertan en diferentes sitios equivalentes en una inmunoglobulina.

50 Sin embargo, todo péptido injertado en un bucle no-CDR de acuerdo con esta descripción tiene una alta probabilidad de ser inactivo por el diferente entorno estructural que se ha seleccionado.

55 Se establece en los dos documentos de la técnica anterior mencionados previamente que es difícil insertar péptidos en el bucle que debe retener su estructura y su función, siendo crítico no perturbar la estructura de pliegue de la inmunoglobulina ya que esto es importante para su funcionamiento y secreción.

60 Las solicitudes de patente de los E.U.A. N° 2004/0132101 y 2005/0244403 describen inmunoglobulinas mutantes con afinidad alterada de unión a un ligando efector, que son ligandos naturales para bucles estructurales de anticuerpos. En este documento se describe una variedad de mutaciones en diversas regiones a lo largo de toda la molécula de inmunoglobulina, que influyen la función efectora del anticuerpo completo.

El documento WO 01/83525 se refiere a proteínas que comprenden dominios Fc fundidos con péptidos biológicamente activos, en que dichos péptidos están fundidos a los dominios Fc en sus extremos N o C.

65 El documento US 2002/0106370 da a conocer polipéptidos quiméricos que comprenden una porción de enlace que muestra una afinidad específica de unión a la superficie de la célula eucariótica diana y una porción efectora.

## ES 2 321 861 T3

El documento WO 02/32925 da a conocer proteínas capaces de una función anticuerpo similar. Para conseguirlo, también se introducen estructuras de bucle en dichas proteínas, que corresponden en estructura y posición a bucles CDR.

5 El documento WO 2006/036834 da a conocer moléculas y métodos en los que los péptidos biológicamente activos se incorporan en una región del bucle de un dominio Fc. El péptido biológicamente activo con la actividad biológica deseada se selecciona en primer lugar y después se introduce en los dominios Fc, bien enlazando en péptido con la proteína o por inserción del ácido nucleico respectivo en el ácido nucleico que codifica el dominio Fc.

10 Otros documentos de la técnica anterior muestran que el patrón tipo inmunoglobulina se ha empleado hasta ahora con el propósito de manipular el sitio de unión de antígeno existente, introduciendo de este modo nuevas propiedades de enlace. Sin embargo, hasta la fecha sólo las regiones CDR han sido sometidas a ingeniería para el enlace de antígeno, en otras palabras, en el caso del pliegue de la inmunoglobulina sólo se ha modificado el sitio de enlace del antígeno natural para cambiar su afinidad o especificidad de enlace. Existe una gran cantidad de bibliografía que describe diferentes formatos de estas inmunoglobulinas manipuladas, expresadas frecuentemente en forma de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o fragmentos Fab, ya sean presentados en la superficie de partículas fago o expresados en forma soluble en diversos sistemas de expresión procarióticos o eucarióticos. Entre los autores principales en este campo están Greg Winter, Andreas Plückthun y Hennie Hoogenboom.

20 Es objeto de la presente invención proporcionar inmunoglobulinas con nuevos sitios de enlace de antígeno introducidos y métodos para diseñar y fabricar dichas inmunoglobulinas.

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere a otros métodos, bibliotecas, empleos y kits, como se definen en las reivindicaciones.

El método para diseñar una inmunoglobulina que comprende al menos una modificación en una región del bucle estructural de la inmunoglobulina y para determinar el enlace de dicha inmunoglobulina con un epítipo de un antígeno, en el que la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo, comprende las etapas de:

30 - proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región del bucle estructural,

- modificar al menos un residuo nucleótido de al menos una de dichas regiones del bucle estructural,

35 - transferir el ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,

- expresar dicha inmunoglobulina modificada,

40 - poner en contacto la inmunoglobulina modificada expresada con un epítipo, y

- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une a dicho epítipo.

En particular, la presente invención se refiere a un método para la construcción de una inmunoglobulina que se une específicamente con un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumor, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales. 45 través de la modificación en la región del bucle estructural, la inmunoglobulina puede ser diseñada para unirse al epítipo. En una modalidad preferida, la inmunoglobulina se une específicamente a al menos dos de dichos epítipos, que difieren entre sí, ya sean del mismo antígeno o de diferentes antígenos.

50 Por ejemplo, el método de acuerdo con la invención se refiere al diseño de una unión específica de inmunoglobulina con al menos un primer epítipo y que comprende al menos una modificación en al menos una región del bucle estructural de dicha inmunoglobulina y la determinación del enlace específico de al menos dicha región del bucle hasta al menos un segundo epítipo, seleccionándose éste del grupo de antígenos mencionados anteriormente, donde la región no modificada del bucle estructural (región no-CDR) no se une específicamente al menos a dicho segundo 55 epítipo, comprendiendo las etapas de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente con al menos un primer epítipo que comprende al menos una región del bucle estructural,

60 - modificar al menos un residuo nucleótido de al menos una de dichas regiones del bucle estructural,

- transferir el ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,

65 - expresar dicha inmunoglobulina modificada,

- poner en contacto la inmunoglobulina modificada con al menos dicho segundo epítipo, y

- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une al segundo epítipo.

El método, de acuerdo con la invención, se refiere preferiblemente a al menos una modificación en al menos una región del bucle estructural de la inmunoglobulina y a la determinación de al menos dicha región del bucle con al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumor, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos virales y antígenos protozoarios, onde la inmunoglobulina que contiene una región del bucle estructural no modificada no se une específicamente a al menos dicho antígeno.

El término “inmunoglobulinas” que se modifican de acuerdo con la presente invención (como se emplea aquí, los términos inmunoglobulina y anticuerpo son intercambiables) pueden mostrar propiedades de unión mono- o multi-específicas o multivalentes, al menos dos, preferiblemente al menos tres sitios de unión específicos para epítopos de, por ejemplo, antígenos, moléculas/proteínas efectoras. Las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención también son fragmentos funcionales aceptados en la técnica, tales como Fc, Fab, scFv, dímeros de cadena sencilla de dominios CH/CL, Fv, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas, dominios de las cadenas pesadas y ligeras de la región variable (tales como Fd, Vl, Vk, Vh) y la región constante de un anticuerpo intacto tal como CH1, CH2, CH3, CH4, Cl y Ck, así como mini-dominios consistentes en dos hebras beta de un dominio inmunoglobulina conectado por un bucle estructural.

Se entiende que el término “inmunoglobulina”, “inmunoglobulina modificada” “inmunoglobulina de acuerdo con la invención” incluye también un derivado de inmunoglobulinas. Un derivado es cualquier combinación de una o varias inmunoglobulinas de la invención y/o una proteína de fusión en la que cualquier dominio o mini-dominio de la inmunoglobulina de la invención se puede fundir en cualquier posición de una o varias proteínas (tales como otras inmunoglobulinas, ligandos, proteínas patrón, toxinas enzimáticas y similares). Un derivado de la inmunoglobulina de la invención también se puede obtener mediante el enlace con otras sustancias mediante diversas técnicas químicas, tales como enlace covalente, interacción electrostática, enlaces disulfuro, etc.

Las tres sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de ellas (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también es una inmunoglobulina con la misma secuencia de aminoácidos, pero construida completa o parcialmente a partir de aminoácidos no naturales o químicamente modificados.

Las moléculas diseñadas de acuerdo con la presente invención serán útiles como proteínas autónomas, así como proteínas de fusión o derivados, más típicamente fusionadas de manera tal que sean parte de estructuras de anticuerpo mayores o moléculas de anticuerpo completas o partes de ellas, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc, fragmentos Fv y otros. Será posible utilizar las proteínas diseñadas para producir moléculas que son mono-específicas, biespecíficas, trispecíficas e incluso pueden soportar más especificidades al mismo tiempo, y también será posible controlar y preseleccionar la valencia de enlace al mismo tiempo de acuerdo con los requerimientos del uso planeado de dichas moléculas.

De acuerdo con la presente invención, las regiones o sitios de unión a antígenos de todo tipo de alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales, pueden introducirse en un bucle estructural de una estructura de anticuerpo dada.

El término “antígeno” de acuerdo con la presente invención representa moléculas o estructuras que se sabe que interactúan o son capaces de interactuar con la región del bucle CDR de las inmunoglobulinas. Las regiones del bucle estructural de la técnica anterior no interactúan con antígenos sino que más bien contribuyen a la estructura total y/o al enlace a moléculas efectoras.

El término “alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales” de acuerdo con la presente invención debe incluir todos los alérgenos y antígenos capaces de ser reconocidos por una estructura de anticuerpo y fragmentos de dichas moléculas (en especial subestructuras a las que se refiere generalmente como “epítopos” (por ejemplo, epítopos de células B)), siempre que sean inmunológicamente relevantes, es decir, que también sean reconocibles por anticuerpos naturales o monoclonales.

El término “epítipo” de acuerdo con la presente invención representa una estructura molecular que puede constituir completamente un sitio de unión específica o ser parte de un sitio de unión específica al dominio de enlace o la inmunoglobulina de la presente invención.

Químicamente, un epítipo puede estar compuesto por un carbohidrato, un péptido, un ácido graso, una sustancia inorgánica o sus derivados y cualquier combinación de las mismas. Si el epítipo es un polipéptido, usualmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferiblemente 8 a 50 aminoácidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 a 20 aminoácidos en el péptido. No hay límite superior crítico para la longitud del péptido, que puede comprender casi toda la longitud de la secuencia del polipéptido. Los epítopos pueden ser lineales o epítopos conformacionales. Un epítipo lineal comprende un solo segmento de una secuencia primaria de una cadena de polipéptido. Los epítopos lineales pueden ser contiguos o superpuestos. Los epítopos conformacionales comprenden aminoácidos reunidos por plegado del polipéptido, para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal.

## ES 2 321 861 T3

Específicamente, los epítomos son al menos parte de moléculas relevantes para el diagnóstico, es decir, la ausencia o presencia de un epítomo en una muestra se correlaciona cualitativa o cuantitativamente ya sea con una enfermedad o con un estado de salud o con el estado de un proceso de fabricación o un estado ambiental y alimentario. Los epítomos también pueden ser al menos parte de moléculas terapéuticamente relevantes, es decir, moléculas que pueden ser diana del dominio de unión específica que cambia el curso de la enfermedad.

Los “alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales” preferidos son aquellos alérgenos o antígenos que ya han demostrado su capacidad de ser inmunológica o terapéuticamente relevantes o que lo son, en especial aquéllos en los que se ha probado su eficacia clínica.

Por otra parte, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención también pueden introducirse otras capacidades de enlace en las regiones del bucle estructural, por ejemplo capacidades de enlace para moléculas pequeñas, tales como fármacos o enzimas, sitios catalíticos de enzimas o sustratos enzimáticos o para un análogo del estado de transición de un sustrato enzimático.

Preferiblemente, el nuevo sitio de unión de antígeno en los bucles estructurales es ajeno a la inmunoglobulina no codificada. De esta manera, las dianas como moléculas efectoras o receptoras Fc se excluyen preferiblemente de las moléculas de enlace y la especificidad de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, los nuevos sitios de enlace de antígeno en los bucles estructurales se introducen por sustitución, delección y/o inserción de la inmunoglobulina codificada por el ácido nucleico seleccionado.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, la modificación de al menos un nucleótido da como resultado una sustitución, delección y/o inserción de la inmunoglobulina codificada por dicho ácido nucleico.

La modificación de al menos una región del bucle puede dar como resultado una sustitución, delección y/o inserción de 1 o varios aminoácidos, preferiblemente una mutación puntual, intercambio de bucles enteros, más preferiblemente el cambio de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 30 aminoácidos.

También es preferible la mutación aleatoria dirigida al sitio. Con este método uno o varios residuos aminoácido específicos del bucle se intercambian o introducen utilizando insertos generados aleatoriamente en dichos bucles estructurales. De forma alternativa, es preferible el uso de enfoques combinatorios.

Preferiblemente al menos una región del bucle se muta o modifica de forma aleatoria, semi-aleatoria, o en particular por métodos de mutagénesis aleatoria dirigida al sitio. Estos métodos pueden emplearse para hacer modificaciones de aminoácidos en posiciones deseadas de la inmunoglobulina de la presente invención. En estos casos las posiciones se eligen al azar, o los cambios de aminoácidos se realizan utilizando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los residuos pueden mutarse a alanina, en referencia al cribado de alanina. Estos métodos pueden acoplarse con enfoques de ingeniería más sofisticados que emplean métodos de selección para cribar niveles superiores de diversidad de secuencia. Un método preferido de acuerdo con la invención se refiere a la molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente que comprende al menos una unidad de repetición de nucleótido que tiene la secuencia 5'-NNS-3', 5'-NNN-3' o 5'-NNK-3'.

La molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente puede comprender las unidades repetitivas identificadas anteriormente, que codifican todos los aminoácidos de origen natural conocidos.

Como es bien conocido en la especialidad, hay una variedad de técnicas de selección que pueden emplearse para la identificación y el aislamiento de proteínas con ciertas características y afinidades de enlace, incluyendo por ejemplo tecnologías de expresión tales como presentación en fago, presentación en ribosoma, presentación en superficies celulares y similares, como se describe a continuación. Los métodos para producción y cribado de variantes de anticuerpos son bien conocidos por la técnica. Los métodos generales para biología molecular de anticuerpos, expresión, purificación y cribado 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.

Un “bucle estructural” o “bucle no-CDR” de acuerdo con la presente invención debe entenderse de la forma siguiente: las inmunoglobulinas están formadas de dominios con el llamado pliegue de la inmunoglobulina. En esencia, las hojas beta antiparalelas se conectan mediante bucles formando un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, varios de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión al antígeno. Estos bucles se denominan bucles CDR. Todos los otros bucles de dominios de anticuerpo contribuyen más bien a la estructura de la molécula y/o a la función efectora. Estos bucles se definen aquí como bucles estructurales o bucles no-CDR.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las inmunoglobulinas modificadas (e incluidas siempre a través de toda la especificación siguiente: fragmentos de inmunoglobulina) pueden clonarse en células huésped, expresadas y ensayadas para sus especificidades de enlace. Estas prácticas se llevan a cabo utilizando procedimientos bien conocidos y una variedad de métodos que pueden usarse en la presente invención se describen en *Molecular Cloning-A*

Laboratory Manual, 3.sup.rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Los ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar dichas inmunoglobulinas. Los vectores de expresión comprenden típicamente una inmunoglobulina enlazada operativamente que se coloca en una relación funcional, con control de secuencias reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier socio de fusión y/o elementos adicionales. Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se pueden producir por cultivo de una célula huésped transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión que contiene ácido nucleico que codifica las inmunoglobulinas modificadas, bajo las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de las inmunoglobulinas modificadas. Los métodos de introducción de moléculas de ácido nucleico exógenas en un huésped son bien conocidas por la técnica y variarán según el huésped empleado. Por supuesto, también se pueden emplear sistemas de expresión libre celular o acelular para la expresión de inmunoglobulinas modificadas.

En una modalidad preferida de la presente invención, las inmunoglobulinas modificadas se purifican o aíslan después de la expresión. Las inmunoglobulinas modificadas pueden aislarse o purificarse en una variedad de formas conocidas por los especialistas en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis, filtración, concentración y cromatofocalización. La purificación se puede facilitar a menudo mediante un socio de fusión particular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser purificados utilizando resina de glutatión si se emplea una fusión GTS, usando cromatografía de afinidad  $Ni^{+2}$  si se emplea un His-tag o usando un anticuerpo anti-flag inmovilizado y se utiliza un flag tag. Como guía general sobre técnicas de purificación apropiadas, véase Antibody Purification: Principles and Practice, 3 sup.rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. Por supuesto, también es posible expresar las inmunoglobulinas codificadas de acuerdo con la presente invención en la superficie de un huésped, en particular en la superficie de una célula bacteriana, de insecto o de levadura o en la superficie de fagos o virus.

Las inmunoglobulinas modificadas se pueden cribar utilizando una variedad de métodos, incluyendo pero sin limitarse a ellos, los que utilizan ensayos *in vitro*, ensayos *in vivo* y basados en células, y técnicas de selección. Las técnicas de automatización y cribado de alto rendimiento pueden utilizarse en los procedimientos de cribado. El cribado puede emplear un socio o etiqueta de fusión, por ejemplo un enzima, una etiqueta inmune, una etiqueta isotópica o una etiqueta de molécula pequeña como un colorante fluorescente o colorimétrico o una molécula luminogénica.

En una modalidad preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las inmunoglobulinas se criban en un ensayo *in vitro*. En una modalidad preferida, se criba la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo su capacidad de catalizar una reacción o su afinidad de enlace a su diana.

Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección, incluyendo pero sin limitarse a etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicas.

Como se conoce en la técnica, un subconjunto de métodos de criba son aquellos métodos que seleccionan miembros favorables de una biblioteca. Los métodos se refieren aquí como "métodos de selección", y estos métodos se usan en la presente invención para el cribado de inmunoglobulinas modificadas. Cuando se criban las bibliotecas de inmunoglobulinas utilizando un método de selección, sólo aquellos miembros de una biblioteca que son favorables, es decir, que satisfacen algún criterio de selección, se propagan, aíslan y/u observan. Como se apreciará, debido a que se observan sólo las variantes más aptas, estos métodos permiten la criba de bibliotecas más grandes que las que se pueden cribar por métodos que analizan individualmente la aptitud de los miembros de bibliotecas. La selección es posible por cualquier método, técnica o socio de fusión que une de forma covalente o no covalente el fenotipo de inmunoglobulinas con su genotipo, que es la función de un anticuerpo con el ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, el uso de presentación en fagos como método de selección es permitido por la fusión de miembros de la biblioteca a la proteína gen III. De esta forma, la selección o el aislamiento de inmunoglobulinas modificadas que satisfacen algunos criterios, por ejemplo la afinidad del unión a la diana de la inmunoglobulina, también selecciona o aísla el ácido nucleico que la codifica. Una vez aislado, el gen o los genes que codifican las inmunoglobulinas modificadas pueden ser amplificados. Este proceso de aislamiento y amplificación, referido como selección por ciclos de adsorción-desorción puede repetirse, permitiendo que se enriquezcan las variantes de anticuerpo favorables en la biblioteca. La secuenciación del ácido nucleico del ácido nucleico unido permite finalmente la identificación del gen.

En la técnica se conoce una variedad de métodos de selección que se pueden usar en la presente invención para el cribado de bibliotecas de inmunoglobulina. Estos incluyen, sin estar limitados a ellos, la presentación en fago (Phage display of peptides and antibodies: a laboratory manual, Kay *et al.*, 1996, Academic Press, San Diego, Calif., 1996; Lowman *et al.*, 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317) y infección selectiva de fago (Malmborg *et al.*, 1997, J Mol Biol 273:544-551), fagos infectivos selectivos (Krebber *et al.*, 1997, J Mol Biol 268:619-630) y selección por ciclos de adsorción-desorción de infectividad retardada (Benhar *et al.*, 2000, J Mol Biol 301:893-904), expresión en superficie celular (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399) tales como presentación en bacterias (Georgiou *et al.*, 1997, Nat Biotechnol 15:29-34; Georgiou *et al.*, 1993, Trends Biotechnol 11:6-10; Lee *et al.*, 2000, Nat Biotechnol 18:645-648; Jun *et al.*, 1998, Nat Biotechnol 16:576-80), levadura (Boder & Wittrup, 2000, Methods Enzymol 328:430-44; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557) y células de mamífero (Whitehorn *et al.*, 1995, Bio/technology 13:1215-1219), así como tecnologías de presentación *in vitro* (Amstutz *et al.*, 2001, Curr Opin Biotechnol 12:400-405) tales como expresión de polisoma (Mattheakis *et al.*, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:9022-9026) expresión de ribosoma (Hanes *et al.*, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942), expresión de ARNm (mRNA) (Roberts & Szostak, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:12297-12302; Nemoto *et al.*,

1997, FEBS Lett: 414:405-408) y el sistema de expresión por inactivación de ribosoma (Zhou *et al.*, 2002, J Am Chem Soc 124, 538-543).

Otros métodos de selección que se pueden usar en la presente invención incluyen métodos que no se basan en expresión, como métodos *in vivo*, incluyendo pero sin limitarse a ellos, la criba citométrica y la expresión periplásmica (Chen *et al.*, 2001, Nat Biotechnol. 19:537-542), el ensayo de complementación de fragmentos de anticuerpo (Johnsson & Varshavsky, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10340-10344; Pelletier *et al.*, 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:12141-12146) y la criba de dos híbridos de levadura (Fields & Song, 1989, Nature 310:245-246) empleada en el modo de selección (Visintin *et al.*, 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:11723-11728). En una modalidad alternativa, la selección se activa por un socio de fusión que se une a una secuencia específica en el vector de expresión, enlazándose así de forma covalente o no covalente al socio de fusión y al miembro de la biblioteca variante de Fc asociado, con el ácido nucleico que los codifica. Por ejemplo, los documentos PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702 y PCT WO 02/07466 describen un socio de fusión y una técnica tales, que se pueden usar en la presente invención. En una modalidad alternativa, se puede producir la selección *in vivo* si la expresión del anticuerpo imparte alguna ventaja de crecimiento, reproducción o supervivencia a la célula.

Un subconjunto de métodos de selección referidos como métodos de “evolución dirigida” son aquellos que incluyen el acoplamiento o desarrollo de secuencias favorables durante la selección, en ocasiones con la incorporación de nuevas mutaciones. Como apreciarán los expertos en la materia, los métodos de evolución dirigida pueden facilitar la identificación de las secuencias más favorables en una biblioteca y pueden incrementar la diversidad de las secuencias que se criban. Una variedad de métodos de evolución dirigida conocidos en la técnica se puede usar en la presente invención para cribar variantes de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a ellos, el barajado de ADN (PCT WO 00/42561 A3; PCT WO 01/70947 A3), el barajado de exones (patentes de los E.U.A. n° 6,365,377; Kolkman & Stemmer, 2001, Nat Biotechnol 19:423-428), el barajado de familias (Crameri *et al.*, 1998, Nature 391:288-291; la patente de los E.U.A. n° 6,376,246), RACHITT.TM (Coco *et al.*, 2001, Nat Biotechnol 19:354-359; PCT WO 02/06469), cebado aleatorio y “STEP” de recombinación *in vitro* (Zhao *et al.*, 1998, Nat Biotechnol 16:258-261; Shao *et al.*, 1998, Nucleic Acids Res 26:681-683), ensamblaje de genes mediado por exonucleasa (patente de los E.U.A. n° 6,352,842; patentes de los E.U.A. n° 6,361,974), Gene Site Saturation Mutagenesis TM (Patente de los E.U.A. n° 6,358,709), Gene Reassembly.TM (Patente de los E.U.A. n° 6,358,709), SCRATCHY (Lutz *et al.*, 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:11248-11253), métodos de fragmentación de ADN (Kikuchi *et al.*, Gene 236:159-167), barajado de ADN de una sola hebra (Kikuchi *et al.*, 2000, Gene 243:133-137) y tecnología de ingeniería de anticuerpos de evolución dirigida AMEsystem (Applied Molecular Evolution) (patente de los E.U.A. n° 5,824,514; patente de los E.U.A. n° 5,817,483; patente de los E.U.A. n° 5,814,476; patente de los E.U.A. n° 5,763,192; patente de los E.U.A. n° 5,723,323).

Las variantes de los anticuerpos se pueden cribar utilizando uno o varios ensayos basados en células *in vivo*. Para dichos ensayos, las inmunoglobulinas modificadas purificadas o no purificadas se añaden típicamente de forma exógena, de tal manera que las células se exponen a inmunoglobulinas individuales o conjuntos de inmunoglobulinas que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos, típicamente pero no siempre, se basan en la función de la inmunoglobulina; esto es, la capacidad del anticuerpo de unirse a su objetivo y mediar varios eventos bioquímicos, por ejemplo la función efectora, la inhibición de unión ligando/receptor, la apoptosis y similares. Estos ensayos a menudo incluyen el seguimiento de la respuesta de las células frente al anticuerpo, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, el cambio en la morfología celular o la activación transcripcional, como la expresión celular de un gen natural o gen reportero. Por ejemplo estos ensayos pueden medir la capacidad de las variantes de los anticuerpos para producir ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos puede ser necesaria la adición de células o componentes adicionales, es decir, además de las células diana, puede ser necesario añadir, por ejemplo, complemento de suero o células efectoras tales como monolitos de sangre periférica (PBMCs, del inglés peripheral blood monocytes), células NK, macrófagos y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferiblemente de humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Las inmunoglobulinas pueden provocar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar el ataque en células diana por células inmunes que se han añadido al ensayo. Los métodos para el seguimiento de la muerte o la viabilidad celular son conocidos por la técnica e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunológicos, citológicos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción con caspasas pueden permitir la medición de la apoptosis y la absorción o liberación de sustratos radioactivos o colorantes fluorescentes, tales como el azul alamar pueden permitir el seguimiento del crecimiento o la activación celular. En una modalidad preferida, se puede emplear el ensayo de citotoxicidad basado en DELFIA.RTM.EuTDA (Perkin Elmer, MA) pueden emplearse. De forma alternativa, se puede seguir la muerte o el daño de las células diana midiendo el desprendimiento de uno o varios componentes intracelulares naturales, por ejemplo, la lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en los ensayos basados en células. En este caso, se puede seguir la respuesta mediante el análisis de genes naturales o inmunoglobulinas que pueden ser reguladas al alza, por ejemplo, se puede medir la liberación de ciertas interleuquinas o de forma alternativa, se puede realizar la lectura mediante una construcción reportera. Los ensayos basados en células también pueden incluir la medición de cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de inmunoglobulinas modificadas. Las células para estos ensayos pueden ser de tipo procariótico o eucariótico y se puede emplear una variedad de líneas celulares conocidas en la técnica. De forma alternativa, los tamices basados en células se elaboran usando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Es decir, las variantes de anticuerpos no se añaden de forma exógena a las células. Por ejemplo, en una modalidad, el tamiz basado en células utiliza la expresión en superficie celular. Puede emplearse un socio de fusión que permita la expresión de inmunoglobulinas modificadas en la superficie de las células (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol,12:395-399).

En una modalidad preferida, la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas modificadas puede determinarse experimentalmente utilizando uno o varios ensayos basados en células. En una modalidad preferida, los ensayos de activación de células T *ex vivo* se emplean para cuantificar experimentalmente la inmunogenicidad. En este método, las células que presentan antígeno y las células T nativas de donantes apareados se prueban una o varias veces con un péptido o un anticuerpo entero de interés. Entonces, la activación de las células T puede detectarse utilizando una variedad de métodos, por ejemplo haciendo el seguimiento de la producción de citoquinas o midiendo la absorción de timidina tritiada. En la modalidad más preferida, la producción de interferón gama se sigue utilizando ensayos Eilspot (Schmittel *et. al.*, 2000, J. Immunol. Meth., 24: 17-24).

Las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden caracterizarse en experimentos en células, tejidos y organismos enteros. Como se conoce en la técnica, a menudo los fármacos se ensayan en animales, incluyendo pero sin limitarse a ellos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, a fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad o un modelo de enfermedad o para medir la farmacocinética, toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Los animales pueden ser referidos como modelos de enfermedad. Los agentes terapéuticos a menudo se prueban en ratones, incluyendo pero sin limitarse a ellos, ratones desnudos, ratones SCID, ratones de xenoinjerto y ratones transgénicos (incluyendo “knockins” y “knockouts”). Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo que se debe utilizar como agente terapéutico. Cualquier organismo, preferiblemente los mamíferos, puede emplearse para las pruebas. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos apropiados y de esta manera pueden emplearse para analizar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. Finalmente se requieren pruebas en humanos para la aprobación como fármacos y por supuesto se contemplan estos experimentos. De esta manera, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden ensayarse en humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden encontrar utilidad en un amplio rango de productos de anticuerpos. En una modalidad, la variante de anticuerpo de la presente invención se utiliza para la terapia o la profilaxis, para uso preparativo o analítico, como un compuesto de diagnóstico, un compuesto industrial o un reactivo de investigación, preferiblemente un agente terapéutico. La variante del anticuerpo puede utilizarse en una composición de anticuerpos que es monoclonal o policlonal. En una modalidad preferida, se usa una inmunoglobulina modificada de la presente invención para exterminar células diana que contienen el antígeno diana, por ejemplo células cancerosas. En una modalidad alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo por antagonización de una citoquina o un receptor de citoquina. En una modalidad alternativa preferida las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana y exterminar las células diana que contienen el antígeno diana. En una modalidad preferida alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento y exterminar las células diana que contienen o requieren el antígeno diana. En una modalidad preferida alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar enzimas y sustratos de enzimas.

Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden emplearse para diversos propósitos terapéuticos. En una modalidad preferida, un anticuerpo que comprende las inmunoglobulinas modificadas se administra a un paciente para tratar un desorden específico. Un “paciente” para los propósitos de la presente invención incluye tanto a humanos como a otros animales, preferiblemente mamíferos y más preferiblemente humanos. Aquí se entiende por “desorden específico” un desorden que puede mejorar por la administración de una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención.

En una modalidad, una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. De forma alternativa, la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención se administra en combinación con uno o varios agentes terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a ellos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasa, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores u otros agentes terapéuticos. Las inmunoglobulinas modificadas pueden administrarse de forma concomitante con uno e varios regímenes terapéuticos. Por ejemplo, una variante del anticuerpo de la presente invención puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, con terapia de radiación o con ambas terapias de quimioterapia y radiación. En una modalidad, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden administrarse junto con uno o varios anticuerpos, que pueden o no comprender una variante del anticuerpo de la presente invención. De acuerdo con otra modalidad de la invención, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y uno o varias terapias anticáncer distintas se emplean para tratar células cancerosas *ex vivo*. Se contempla que dicho tratamiento *ex vivo* pueda ser de utilidad en el trasplante de médula ósea y particularmente en trasplante de médula ósea autólogo. Por supuesto, se contempla que los anticuerpos de la invención se puedan emplear en combinación con aún otras técnicas terapéuticas, como la cirugía.

Una variedad de otros agentes terapéuticos se puede usar para la administración con las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. En una modalidad, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente anti-angiogénico, que es un compuesto que bloquea o interfiere en cierto grado en el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico, por ejemplo, puede ser una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, fusión Fc, o citoquina, que se une a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento involucrado en la estimulación de la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido aquí es un anticuerpo que se une al Factor de

## ES 2 321 861 T3

Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor). En una modalidad alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente terapéutico que induce o mejora la respuesta inmune adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo que hace diana en CTLA-4. En una modalidad alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un inhibidor de tirosina quinasa, que es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una modalidad alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se administran con una citoquina. Por "citoquina", tal y como se emplea aquí, se entiende un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúa en otra célula como mediadores intercelulares, incluyendo las quimioquinas.

Se contemplan composiciones farmacéuticas donde se formulan las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y uno o varios agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las variantes de anticuerpo de la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado deseado de pureza, con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que se tienen que usar para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. Las inmunoglobulinas modificadas y otros agentes terapéuticamente activos aquí descritos pueden formularse también como inmunoliposomas y/o atrapados en microcápsulas.

La administración de la composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención, preferiblemente en forma de una solución acuosa estéril, puede realizarse en una variedad de formas, incluyendo pero sin limitarse a ellas, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intranasalmente, intraóticamente, transdérmicamente, tópicamente (por ejemplo geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), en forma intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (por ejemplo, la tecnología inhalable AERx™ comercialmente disponible de Aradigm, o el sistema de suministro pulmonar Inhance™ comercialmente disponible en Inhale Therapeutics), en forma vaginal, parenteral, rectal o intraocular.

Como se emplea aquí, la expresión "se une específicamente" se refiere a una reacción de enlace que es determinante del ligando afín de interés en una población heterogénea de moléculas. De esta manera, bajo las condiciones designadas (por ejemplo, las condiciones de inmunoensayo en el caso de una inmunoglobulina), el anticuerpo especificado se une a su "diana" particular y no se une en cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. De forma comparable a las CDRs de anticuerpos, las regiones modificadas del bucle estructural son porciones de proteínas de unión de antígeno o de unión de molécula y no son antígenos como tales.

El término "sistema de expresión" se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias control en enlace operativo, de manera que los huéspedes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, el sistema de expresión puede estar incluido en un vector; sin embargo, el ADN relevante también puede estar integrado en el cromosoma huésped.

El sistema de expresión puede comprender un vector. Cualquier vector de expresión conocido en la técnica puede ser apropiado para este propósito.

La inmunoglobulina modificada se expresa preferiblemente en un huésped, preferiblemente en una célula bacteriana, de levadura, de planta, en una célula de animal o en una planta o en un animal.

Se puede emplear una amplia variedad de células huésped apropiadas para expresar la inmunoglobulina modificada, incluyendo pero no limitadas a células de mamíferos (células de animales), células de plantas, bacterias (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), células de insecto y levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*). Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden ser de utilidad en la presente invención se describe en el catálogo de líneas celulares ATCC, disponible en American Type Culture Collection. Además, también pueden emplearse plantas y animales como huéspedes para la expresión de la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención. La expresión así como los vectores o casetes de transfección pueden seleccionarse de acuerdo con el huésped empleado.

Por supuesto también se pueden emplear sistemas de expresión de proteínas libres de células o acelulares. Las plataformas de expresión de proteínas de transcripción/traducción *in vitro*, que producen cantidades suficientes de proteínas, ofrecen muchas ventajas de una expresión de proteínas libre de células, eliminando la necesidad de etapas laboriosas secuencia adelante y atrás (por ejemplo, transformación de célula huésped, cultivo, o lisis) típicamente asociadas con sistemas de expresión basados en células.

Otro método para la producción de una inmunoglobulina o una preparación farmacéutica de la misma que comprende al menos una modificación en una región del bucle estructural de la inmunoglobulina y que determina la unión de dicha inmunoglobulina a un epítipo de un antígeno, en que la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo, que comprende los pasos de:

- se proporciona un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región del bucle,

## ES 2 321 861 T3

- se modifica al menos un residuo nucleótido de al menos de una de dichas regiones del bucle,
- se transfiere dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión,
- 5 - se expresa dicha inmunoglobulina modificada,
- la inmunoglobulina modificada expresada se pone en contacto con un epítipo,
- se determina si dicha inmunoglobulina modificada se une a dicho epítipo, y
- 10 - se proporciona el enlace de la inmunoglobulina modificada a dicho epítipo y opcionalmente se acaba en una preparación farmacéutica.

En particular, la presente invención se refiere a un método para la fabricación de una inmunoglobulina multi-específica que se une de forma específica al menos a una primera molécula o a una preparación farmacéutica de la misma que comprende al menos una modificación en al menos una región del bucle estructural de dicha inmunoglobulina y determina el enlace específico de al menos una región del bucle a al menos una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales, donde la inmunoglobulina que contiene una región del bucle estructural no se une específicamente a al menos la segunda molécula como mínimo, que comprende los pasos de:

- se proporciona un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente al menos a una primera molécula que comprende al menos una región del bucle estructural,
- 25 - se modifica al menos un residuo nucleótido de al menos de una de dichas regiones del bucle codificada por dicho ácido nucleico,
- se transfiere dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión,
- 30 - se expresa dicha inmunoglobulina modificada,
- la inmunoglobulina modificada expresada se pone en contacto con al menos una segunda molécula, y
- se determina si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente a la segunda molécula y
- 35 - se proporciona el enlace de la inmunoglobulina modificada al menos a dicha segunda molécula y opcionalmente se acaba en una preparación farmacéutica.

Se prefiere el diseño de más de una especificidad en un miembro de un par de enlace específico (Kufer *et al.* (2004) Trends in Biotechnology vol. 22 páginas 238-244).

Se han realizado numerosos intentos de producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales multiespecíficos, por ejemplo biespecíficos. Un problema en la producción de anticuerpos biespecíficos hechos de dos cadenas de polipéptido diferentes (cadena pesada y ligera) es la necesidad de expresar 4 cadenas diferentes (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) en una célula, dando como resultado numerosas combinaciones diferentes de moléculas que se tienen que separar de la molécula biespecífica deseada en la mezcla. Debido a su similitud, la separación de estas moléculas es difícil y costosa. Se han empleado numerosas técnicas para reducir al mínimo la ocurrencia de estos apareamientos indeseados (Carter (2001) Journal of Immunological Methods, vol 248, páginas 7-15).

Una solución al problema es la producción de una cadena de polipéptido con dos especificidades, como por ejemplo dos scFvs enlazados entre sí o la producción de los denominados diacuerpos. Estas moléculas han demostrado estar muy lejos del pliegue de una molécula natural y son notoriamente difíciles de producir (LeGall *et al.* (2004) Protein Engineering, Design & Selection vol 17 páginas 357-366).

Otro problema del presente desarrollo de anticuerpos biespecíficos es el hecho de que incluso si los anticuerpos precursores se unen bivalentemente a su socio de enlace respectivo (p.ej. IgG), el anticuerpo biespecífico resultante es monovalente para cada socio de enlace respectivo.

Las moléculas multiespecíficas preferidas de la presente invención resuelven estos problemas:

Es posible la expresión de una molécula biespecífica como cadena polipeptídica (un dominio Ig modificado con dos especificidades de unión, ver sección de ejemplos) que es más fácil de lograr que la expresión de las dos cadenas polipeptídicas de anticuerpo (Cabilly *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277 (1984)).

También se puede elaborar como una molécula tipo anticuerpo (es decir, hecha de dos cadenas de polipéptido) debido al hecho que la segunda especificidad se ubica en la parte no variable de la molécula; no hay necesidad de dos cadenas pesadas o ligeras diferentes. De esta manera, no hay posibilidad de un apareamiento erróneo de las dos cadenas.

## ES 2 321 861 T3

Un anticuerpo de la presente invención puede consistir en una cadena pesada y una cadena ligera, que forman en conjunto una región variable que se une a un socio de enlace específico, pudiendo estar formada la segunda especificidad por un bucle modificado de cualquiera de los bucles estructurales ya sea de la cadena pesada o de la cadena ligera. El sitio de unión también puede estar formado por más de un bucle no-CDR que puede ser estructuralmente un vecino (ya sea en la cadena pesada o en la cadena ligera o en ambas cadenas).

El anticuerpo o derivado modificado puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo (p.ej. Fab, CH1-CH2, CH2-CH3).

Se puede unir de forma mono o multivalente a los socios de enlace o incluso con diferente valencia a socios de enlace diferentes, dependiendo del diseño.

Como hay numerosos bucles diferentes disponibles para la selección y el diseño de un sitio de enlace específico en las regiones no-CDR de las cadenas pesadas y ligeras, es posible diseñar derivados de anticuerpo con incluso más de dos especificidades sin los problemas anteriormente mencionados.

Los dominios de enlace específico dentro de una cadena de polipéptido se pueden conectar con o sin un péptido enlazador.

Algunas clases de anticuerpo pueden considerarse multiespecíficas, en particular biespecíficas, por naturaleza: se unen a un antígeno (que típicamente es, por ejemplo, una estructura extraña o una estructura asociada con cáncer) con la región variable y se unen a moléculas efectoras Fc con la parte Fc (por ejemplo, receptores Fc en diversas células inmunes o una proteína de complemento) permitiendo así efectos tales como ADCC, ADCP o CDC.

Las moléculas Fc efectoras se unen por la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina (para IgG1 consiste en los dominios CH2 y CH3) y se han descrito numerosos métodos para optimizar la función efectora al mejorar el enlace de la parte Fc de una molécula de anticuerpo ya sea por técnicas de glicoingeniería (patente de los E.U.A. n° 6,602,684) o por ingeniería de proteínas o bien directamente en Fc (US 2005/0054832), o indirectamente por ingeniería fuera de Fc (US 2005/02444403). Ambos, la unión de la región Fc al receptor Fc y/o la unión a las proteínas de complemento, tales como Cq1, se ha alterado por estas técnicas. Usualmente, se busca mejorar la afinidad de unión a estas moléculas Fc efectoras, ya que esto se correlaciona con funciones efectoras mejoradas.

Sin embargo, para ciertas versiones de la presente invención, las características efectoras de un anticuerpo determinado que se tienen que modificar, no deben cambiarse directamente sino que permanecen sin ser afectadas por la modificación en el bucle estructural, de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención, la inmunoglobulina es de origen humano o de ratón.

Como la inmunoglobulina modificada se puede emplear para diversos propósitos, en particular en composiciones farmacéuticas, la inmunoglobulina es preferiblemente de origen humano o de ratón. Por supuesto, la inmunoglobulina modificada también puede ser una inmunoglobulina humanizada o quimérica.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, la inmunoglobulina humana se selecciona del grupo formado por IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y IgM.

La inmunoglobulina de ratón se selecciona de preferencia del grupo formado por IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3 y IgM.

La inmunoglobulina modificada puede derivarse de una de las clases de inmunoglobulina identificadas anteriormente.

La inmunoglobulina comprende preferiblemente una cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina o una parte de la misma.

La inmunoglobulina modificada puede comprender una cadena pesada y/o ligera, al menos un dominio variable y/o constante.

La inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente al menos un dominio constante y/o por lo menos un dominio variable de la inmunoglobulina o una parte de la misma incluyendo un minidominio.

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

Un dominio variable es una unidad de inmunoglobulina plegada de la parte variable de una inmunoglobulina, referida también como un dominio de la región variable (por ejemplo, Vh, Vk, VI, Vd).

## ES 2 321 861 T3

Una inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención consiste en un dominio constante que se selecciona del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3, CH4, I<sub>g</sub>k-C, I<sub>g</sub>l-C, I<sub>g</sub>l-C, o una parte de la misma que incluye un minidominio, con al menos una región bucle, y se caracteriza porque al menos una región del bucle comprende al menos una modificación de aminoácido que forma al menos una región del bucle modificada, en la que al menos dicha región modificada del bucle se une específicamente al menos a un epítipo de un antígeno.

Otra inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención, consiste en un dominio variable de una cadena pesada o ligera, o una parte de la misma que incluye un minidominio, por lo menos con una región bucle, y se caracteriza porque por lo menos dicha región bucle comprende por lo menos una modificación de aminoácidos que forma por lo menos una región bucle modificada, en donde por lo menos dicha región bucle modificada se une específicamente por lo menos a un epítipo de un antígeno.

De acuerdo con una versión preferida, el dominio constante se selecciona del grupo de los dominios CH1, CH2, CH3, CH4, I<sub>g</sub>k-C, I<sub>g</sub>l-C y combinaciones de los mismos.

La inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente puede comprender uno o varios dominios constantes (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, diez dominios). Si más de un dominio está presente en la inmunoglobulina modificada, estos dominios pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes (por ejemplo, CH1-CH1-CH2, CH3-CH3). Por supuesto el orden de los dominios simples también puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, CH1-CH3-CH2, CH4-CH1-CH3-CH2).

Toda la numeración de las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas sigue el esquema de numeración IMGT (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc *et al.*, 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212; Ruiz *et al.*, 2000 Nucleic Acids Res. 28: 219-221; Lefranc *et al.*, 2001, Nucleic Acids Res. 29: 207-209; Lefranc. *et al.*, 2003, Nucleic Acids Res. 307-310; Lefranc *et al.*, 2005, Dev Comp Immunol 29:185-203).

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención las regiones modificadas del bucle de CH1, CH2, CH3 y CH4 comprenden los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 y los aminoácidos 106 a 117.

Las regiones del bucle estructural de I<sub>g</sub>k-C y I<sub>g</sub>l-C de origen humano comprenden preferiblemente los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117 y los aminoácidos 123 a 126.

Las regiones bucle de I<sub>g</sub>k-C e I<sub>g</sub>l-C de origen ratón, comprenden de preferencia los aminoácidos 8 a 20, aminoácidos 26 al 36, aminoácidos 43 a 79, aminoácidos 83 a 85, aminoácidos 90 a 101, aminoácidos 108 a 116 y aminoácidos 122 a 125.

Las regiones del bucle estructural del dominio variable de la inmunoglobulina de origen humano comprenden preferiblemente los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76 y los aminoácidos 89 a 101.

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención las regiones bucle estructurales del dominio variable de la inmunoglobulina de origen ratón, comprenden los aminoácidos 6 a 20, aminoácidos 44 a 52, aminoácidos 67 a 76 y aminoácidos 92 a 101.

Las regiones de los aminoácidos anteriormente identificadas de las inmunoglobulinas respectivas comprenden las regiones del bucle que se tienen que modificar.

La inmunoglobulina de acuerdo con la invención, es de preferencia de origen camello.

Los anticuerpos del camello comprenden solamente una cadena pesada y tienen la misma afinidad al antígeno que los anticuerpos normales formados de cadenas ligeras y pesadas. En consecuencia los anticuerpos de camello son mucho más pequeños que por ejemplo los anticuerpos humanos, lo cual les permite penetrar tejidos densos para alcanzar el antígeno, donde las proteínas más grandes no pueden. Sin embargo, la simplicidad comparativa, la alta afinidad y especificidad y el potencial para alcanzar e interactuar con sitios activos, los anticuerpos de cadena larga de camello presentan ventajas sobre los anticuerpos habituales, en el diseño, producción y aplicación de compuestos de valor clínico.

La inmunoglobulina de origen camello, comprende de preferencia por lo menos un dominio constante seleccionado del grupo formado por CH1, CH2 y CH3.

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención las regiones bucle de CH1, CH2 y CH3 de la inmunoglobulina de camello, comprenden los aminoácidos 8 a 20, aminoácidos 24 al 39, aminoácidos 42 a 78, aminoácidos 82 a 85, aminoácidos 91 a 103 y los aminoácidos 108 a 117.

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención, la unión específica de la inmunoglobulina modificada a la molécula se determina mediante un ensayo de unión seleccionado del grupo que consiste en ensayos in-

## ES 2 321 861 T3

munológicos, preferiblemente ensayos inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, espectroscopia de resonancia magnética nuclear con diferencia de transferencia de saturación, espectroscopia de resonancia magnética nuclear de transferencia NOE (trNOE), ensayos competitivos, ensayos de unión de tejido, ensayos de unión de células vivas y ensayos de extracto celular.

5 Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a métodos basados en FRET (Transferencia de energía de resonancia-fluorescencia, del inglés Fluorescent Resonance Energy Transfer) y BRET (Transferencia de energía de resonancia-bioluminiscencia, del inglés Bioluminescence Resonance Energy Transfer), AlphaScreen.TM. (Ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada), ensayo de proximidad-escintilación, ELISA (Ensayo inmunosorbente ligado a enzima SPR (Resonancia de plasmón superficial, del inglés Surface Plasmon Resonance), también conocida como BIACORE.RTM.), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de cribado diferencial, electroforesis en gel y cromatografía incluyendo gel filtración. Éstos y otros métodos pueden aprovechar varios socios de fusión o etiqueta.

15 La inmunoglobulina modificada se conjuga preferiblemente con una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en moléculas orgánicas, etiquetas de enzimas, etiquetas radioactivas, etiquetas de color, etiquetas fluorescentes, etiquetas cromogénicas, etiquetas luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y sus mezclas.

20 La inmunoglobulina modificada puede conjugarse con otras moléculas que permiten la detección simple de dicho conjugado, por ejemplo, en ensayos de unión (por ejemplo, ELISA) y estudios de unión.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una inmunoglobulina que consta de en un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C, o una parte de los mismos incluyendo minidominios, o combinaciones de los mismos, con al menos una región del bucle, caracterizado porque al menos una región del bucle comprende al menos una modificación del aminoácido que forma al menos una región del bucle modificada, en la que al menos dicha región del bucle modificada se une específicamente al menos a un epítipo de un antígeno.

30 Se prefiere combinar molecularmente al menos un dominio del anticuerpo modificado (= enlace al socio específico mediante las secuencias no variables o el bucle estructural) con al menos otra molécula de enlace que puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un receptor soluble, un ligando u otro dominio de anticuerpo modificado.

35 La molécula se selecciona del grupo que consiste en moléculas proteináceas, ácidos nucleicos y carbohidratos.

Las regiones del bucle de las inmunoglobulinas modificadas pueden ligarse específicamente a cualquier tipo de moléculas de enlace, en particular a moléculas proteináceas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glicanos, carbohidratos, lípidos, pequeñas moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas. Por supuesto, las inmunoglobulinas modificadas pueden comprender al menos dos regiones del bucle, de manera que cada una de las regiones del bucle se puede unir específicamente a otras moléculas o epítopos.

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención el enlace de la molécula con la región modificada del bucle estructural se selecciona del grupo que consiste en antígenos asociados con tumor, en particular EpCAM, glicoproteína-72 asociada con tumor (TAG-72), el antígeno asociado con tumor CA 125, el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA, del inglés Prostate specific membrane antigen), antígeno asociado con melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA, del inglés High molecular weight melanoma-associated antigen), antígeno asociado con tumor que expresa carbohidratos relacionado con Lewis Y, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18 y antígeno asociado con tumor de citoqueratina, antígenos bacterianos, antígenos virales, alérgenos, fluoresceína, lisozima, receptor 9 tipo toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, 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-18, IL-23, interferón alfa, interferón beta, interferón gama; TNF-alfa, TNFbeta2, TNF.alfa, TNFalfabeta, TNFR1, TNFR-II, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, TRAIL receptor-1, receptor de adenosina A1, receptor de Linfotoxina Beta, 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, FCFR-3, factor de crecimiento de queratinocitos, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de células T, B7-1, B7-2, VNRintegrina, TGFbeta1, TGEbeta2, eotaxina 1, Blas (estimulador de linfocito-B), complemento C5, IgE, factor VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB4), factor tisular, VEGF, VEG-FR, receptor de endotelina, VLA-4, carbohidratos tales como antígenos de grupo sanguíneo y carbohidratos relacionados, glicosilación Galili, gastrina, receptores de gastrina, carbohidratos asociados con tumor, hapteno NP-cap o NIP-cap, receptor de células T alfa/beta, E-selectina, digoxina, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y fosfatasa alcalina testicular tipo PLAP, receptor de transferrina, heparanasa I, miosina cardiaca humana, glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glicoproteína de la cubierta gH del citomegalovirus humano (HCMV), HIV gp120, HCMV, Virus sincitial respiratorio RSV F, RSVF Fgp, VNRintegrina, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, bucle HIV IIIB gp120 V3, virus sincitial respiratorio (RSV) Fgp, glicoproteína gD del virus del Herpes simplex (HSV), glicoproteína HSV gB, glicoproteína de la cubierta HCMV gB, toxina *Clostridium perfringens* y sus fragmentos.

## ES 2 321 861 T3

La inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención se puede unir preferiblemente a una de las moléculas descritas anteriormente. Estas moléculas comprenden también alérgenos.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención se modifican los residuos aminoácido de las posiciones 15 a 17, 29 a 34, 85.4 a 85.3, 92 a 94, 97 a 98 y/o 108 a 110 de CH3.

La modificación de la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención es preferiblemente una delección, una sustitución o una inserción.

De acuerdo con la presente invención se eliminan al menos 1, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 15 aminoácidos, substituyendo con otros aminoácidos (también con aminoácidos modificados) o se insertan en la región del bucle de la inmunoglobulina. Sin embargo, el número máximo de aminoácidos insertados en la región del bucle de una inmunoglobulina no puede exceder el número de 30, preferiblemente 25, más preferiblemente 20 aminoácidos. La sustitución y la inserción de los aminoácidos se realiza preferiblemente de forma aleatoria por métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente solicitud de patente.

La inmunoglobulina de acuerdo con la invención se corresponde con una modalidad específica caracterizada porque la región CH3 comprende SEC ID N°. 16 o SEC ID N°. 18, cuando EpCam se une a dicha inmunoglobulina, SEC ID N°. 20, cuando la fluoresceína se une a la inmunoglobulina, SEC ID N°. 22, 24, 26, 28, 30 a 32, cuando la lisozima se une a dicha inmunoglobulina, SEC ID N°. 34, 36, 38 o 40, cuando TLR9 se une a la inmunoglobulina, y SEC ID N°. 42, cuando el lisozima y/o la eritropoyetina se unen a dicha inmunoglobulina.

De acuerdo con una modalidad específica de la invención la inmunoglobulina se caracteriza por comprender la SEC ID n° 44 o SEC ID n° 46, cuando la lisozima y gp41 se unen a dicha inmunoglobulina.

La inmunoglobulina modificada se conjuga preferiblemente con una molécula etiqueta o reporter seleccionada entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas, etiquetas enzimáticas, etiquetas radioactivas, etiquetas coloreadas, etiquetas fluorescentes, etiquetas cromogénicas, etiquetas luminescentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y sus mezclas.

Las inmunoglobulinas modificadas conjugadas con etiquetas como se especifica anteriormente, se pueden emplear, por ejemplo, en métodos de diagnóstico.

Una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención o que se obtiene por un método de acuerdo con la presente invención, puede ser inadecuada para la preparación de una vacuna para la inmunización activa. De esta manera, la inmunoglobulina se utiliza como un fármaco antigénico para formular una vacuna o bien se utiliza para la captura o pesca de estructuras antigénicas para el uso en la formulación de una vacuna.

La presente invención se refiere al uso de una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención o que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, para la preparación de una biblioteca de proteínas de inmunoglobulinas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la unión y/o detección específica de una molécula que comprende las etapas de:

(a) puesta en contacto de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, con una muestra de ensayo que se sospecha que contiene dicha molécula, y

(b) detección de la formación potencial de un complejo específico molécula/inmunoglobulina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para el aislamiento específico de una molécula que comprende las etapas de:

(a) puesta en contacto de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, con una muestra de ensayo que se contiene dicha molécula, y

(b) separación del complejo específico molécula/inmunoglobulina formado, y

(c) opcionalmente, aislamiento de la molécula de dicho complejo.

Las inmunoglobulinas según la invención pueden emplearse para aislar específicamente moléculas a partir de una muestra. Si se emplean inmunoglobulinas multiespecíficas, puede aislarse más de una molécula de una muestra. Es especialmente ventajoso utilizar inmunoglobulinas modificadas en estos métodos, porque permite, por ejemplo, generar una matriz con una superficie homogénea con cantidades definidas de socios de unión (es decir, inmunoglobulinas modificadas) inmovilizadas allí, que son capaces de unirse a las moléculas que se tienen que aislar. En contraste a ello, si se usan socios de enlace monoespecíficos no se puede generar una matriz homogénea debido a que los socios de enlace sencillos no se unen con la misma eficacia a la matriz.

## ES 2 321 861 T3

La presente invención se refiere a un método para detectar un compuesto en un objetivo, que comprende las etapas de:

5 (a) poner en contacto una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, capaz de unirse específicamente a dicho compuesto,

(b) suministrar el complejo compuesto/inmunoglobulina a la diana.

10 Las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención pueden emplearse para suministrar al menos un compuesto ligado a las regiones CDRs y/o modificadas del bucle a una diana. Estas inmunoglobulinas pueden emplearse para hacer diana en sustancias terapéuticas en un sitio de acción preferido en el curso del tratamiento de una enfermedad.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una biblioteca de proteínas que comprende una inmunoglobulina según la presente invención o que se puede obtener de acuerdo con la presente invención.

20 Los métodos preferidos para construir dicha biblioteca pueden encontrarse arriba y en los ejemplos. La biblioteca de acuerdo con la presente invención puede emplearse para identificar inmunoglobulinas que se unen a una molécula distinta.

25 En particular, la presente invención se refiere al empleo de una biblioteca de proteínas que comprende una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención o que se puede obtener por el método de acuerdo con la presente invención para el diseño de derivados de inmunoglobulina. Una inmunoglobulina existente se puede cambiar para introducir sitios de unión de antígeno en cualquier dominio o minidominio, usando una biblioteca de proteínas del dominio respectivo de al menos 10, preferiblemente 100, más preferiblemente 1000, más preferiblemente 10000, más preferiblemente 100000, más preferiblemente más de 1000000 dominios variantes, con al menos un bucle modificado. Después la biblioteca se criba para la unión al antígeno específico. Después de la caracterización molecular para las propiedades deseadas, el dominio o minidominio seleccionado se clona en la inmunoglobulina original mediante técnicas de ingeniería genética, de tal manera que reemplaza la región de tipo salvaje. De forma alternativa, sólo se puede cambiar la codificación de ADN para los bucles o la codificación para los aminoácidos mutados para obtener una inmunoglobulina con el sitio de unión adicional para el antígeno específico.

35 La elección del sitio para el bucle estructural anti-específico mutado depende de la estructura de la inmunoglobulina original y del propósito del sitio de unión adicional. Si, por ejemplo, la molécula original es una inmunoglobulina completa que necesita tener insertado un sitio de unión de antígeno adicional sin perturbación de la función efectora, los bucles a modificar se seleccionarán a partir de dominios distantes de CH2 y CH3, que son los socios de unión naturales para las moléculas efectoras Fc. Si la inmunoglobulina original es una Fab, es posible la modificación de bucles en dominios constantes de las cadenas ligeras o las cadenas pesadas o los dominios variables respectivos. Para generar una biblioteca se pueden preparar bibliotecas de moléculas originales mutantes que tienen mutaciones en uno o varios bucles estructurales de uno o varios dominios. La selección con moléculas originales mutadas completas puede tener ciertas ventajas, ya que la selección para la unión de antígeno con un bucle estructural modificado proporcionará las modificaciones estéricamente ventajosas si también se analizan para las otras propiedades que deberá mostrar la inmunoglobulina mutada.

45 El requerimiento de tamaño (es decir, el número de variantes de proteínas) de una biblioteca de proteínas de un dominio o un minidominio mutado o una molécula de fusión depende de la tarea. En general, una biblioteca para generar un sitio de unión de antígeno de novo requiere ser mayor que una biblioteca empleada para modificar adicionalmente un sitio de unión de antígeno diseñado ya existente, hecho de un bucle estructural modificado (por ejemplo, para mejorar la afinidad o cambiar la especificidad fina al antígeno).

50 La presente invención se refiere también a una biblioteca de inmunoglobulinas o una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende numerosas inmunoglobulinas, por ejemplo un dominio constante o variable, un minidominio y/o al menos una región del bucle estructural contenida en un minidominio, o moléculas de ácido nucleico que los codifican. La biblioteca contiene miembros con diferentes modificaciones, en que la pluralidad se define por las modificaciones en al menos una región del bucle estructural. La biblioteca de ácidos nucleicos incluye preferiblemente al menos 10 miembros diferentes (que dan como resultado el intercambio de un aminoácido) y más preferiblemente incluye al menos 100, más preferiblemente 1000 o 10000 miembros diferentes (por ejemplo, diseñados por estrategias de aleatorización o técnicas combinatorias). También son preferibles números de miembros individuales incluso más diversificados, tales como al menos 1000000 o al menos 10000000.

65 Otro aspecto de la invención es la combinación de dos dominios o minidominios diferentes seleccionados a partir de al menos dos bibliotecas de acuerdo con la invención, a fin de generar inmunoglobulinas multispecíficas. Estas inmunoglobulinas específicas seleccionadas se pueden combinar entre sí y con otras moléculas, de forma similar a bloques de construcción, para diseñar la disposición óptima de los dominios o minidominios para obtener las propiedades deseadas.

Además, una o varias inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la invención pueden introducirse en varios o en todos los sitios diferentes de una proteína posible sin destruir la estructura de la proteína. Mediante esta técnica de “barajado de dominios” se crean nuevas bibliotecas que a su vez pueden seleccionarse para las propiedades deseadas.

5

La biblioteca preferida contiene inmunoglobulinas de acuerdo con la invención, seleccionadas del grupo que consiste en dominios de una inmunoglobulina, mini dominios o sus derivados.

Una modalidad preferida de la presente invención es una molécula de unión para un antígeno (molécula de unión de antígeno) que comprende al menos un dominio de inmunoglobulina y una región del bucle estructural que se modifica de acuerdo con la presente invención para unir el antígeno, en que dicha molécula de unión no comprende dominios variables de un anticuerpo. Puede comprender otras partes utilizables para las actividades del anticuerpo (por ejemplo, como regiones efectoras naturales o modificadas (secuencias); sin embargo, carece de la región de unión “natural” de anticuerpos, es decir, los dominios variables en sus posiciones de origen natural. Estas moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención tienen las ventajas descritas anteriormente para las presentes moléculas, aunque sin la actividad de unión específica de los anticuerpos; sin embargo, con una actividad de unión específica recientemente introducida en la región del bucle estructural.

Preferiblemente, estas moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención comprenden CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C y sus combinaciones; dichas combinaciones comprenden al menos dos, preferiblemente al menos cuatro, especialmente al menos seis dominios constantes y al menos una región del bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente estas regiones del bucle estructural se conectan mediante la región del bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención o bien mediante los bucles estructurales que están presentes naturalmente presentes entre estos dos dominios constantes. Una modalidad de estas moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención consiste de la región Fc de un anticuerpo con al menos una modificación en un bucle estructural de acuerdo con la presente invención. También para las moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención se prefiere que los nuevos sitios de unión de antígeno en los bucles estructurales se introduzcan por tecnologías de aleatorización, es decir, intercambiando uno o varios residuos aminoácido del bucle por técnicas de aleatorización o introduciendo insertos generados aleatoriamente en dichos bucles estructurales. De forma alternativa se prefiere el uso de enfoques combinatorios.

Una inmunoglobulina modificada puede tener un sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina no modificada e incorporado en uno o varios bucles estructurales. El término “ajeno” significa que el sitio de unión de antígeno no se forma naturalmente mediante la región específica de la inmunoglobulina, y un socio de unión ajeno, pero no el socio de unión natural de una inmunoglobulina, se une por el sitio de unión del antígeno. Esto significa que un socio de unión como un receptor Fc o un efector del sistema inmune, no se considera ligado por el sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina no modificada.

Preferiblemente, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en antígenos patógenos, antígenos asociados a tumor, enzimas, substratos, autoantígenos, moléculas orgánicas o alérgeno. Más preferiblemente, los antígenos se seleccionan del grupo que consiste en antígenos virales, antígenos bacterianos o antígenos de patógenos de eucariotas o fagos. Los antígenos virales preferidos incluyen antígenos de los virus HAV, HBV, HCV, HIV I, HIV II, Parvovirus, Gripe, HSV, Hepatitis, Flavivirus, virus del Nilo Occidental, virus Ébola, virus pox, virus de la viruela, virus del sarampión, virus del Herpes, Adenovirus, virus del Papiloma, virus del Polioma, Parvovirus, Rinovirus, virus Coxsackie, virus de la Polio, Ecovirus, virus de la Encefalitis Japonesa, virus del Dengue, virus de la Encefalitis transportado por garrapatas, virus de la fiebre amarilla, Coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza, virus de La Crosse, virus de Lassa, virus de la Rabia, Rotavirus; los antígenos bacterianos preferidos incluyen antígenos de Pseudomonas, Micobacterias, Estafilococos, Salmonela, Meningococos, Borelia, Listeria, Neisseria, Clostridium, Escherichia, Legionela, Bacilos, Lactobacilos, Estreptococos, Enterococos, Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus, Moraxella, Brucella, Campylobacter, Cardiobacterium, Francisella, Helicobacter, Haemophilus, Klebsiella, Shigella, Yersinia, Vibrio, Chlamydia, Leptospira, Rickettsia, Micobacterias, Treponema, Bartonella. Los antígenos eucarióticos preferidos de eucariotas patógenas incluyen antígenos de Giardia, Toxoplasma, Cyclospora, Cryptosporidium, Trichinella, Levaduras, Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Blastomyces, Histoplasma, Coccidioides.

Las inmunoglobulinas preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden al menos dos sitios de unión de antígeno, el primer sitio enlaza a un primer epítipo, el segundo sitio enlaza a un segundo epítipo.

De acuerdo con una modalidad preferida, la presente inmunoglobulina comprende al menos dos regiones del bucle, la primera región del bucle une a un primer epítipo, y la segunda región del bucle liga a un segundo epítipo. Tanto al menos la primera como al menos la segunda región del bucle o ambas pueden contener un bucle estructural. Las inmunoglobulinas de acuerdo con la presente invención incluyen fragmentos de ellas conocidos en la técnica que son funcionales, que contienen los elementos esenciales de acuerdo con la presente invención: la región del bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención está compuesta de al menos dos dominios de inmunoglobulina, o una parte de los mismos que incluye un minidominio y cada dominio contiene al menos un sitio de unión de antígeno.

## ES 2 321 861 T3

Se prefiere también una inmunoglobulina de acuerdo con la invención, la cual comprende puede comprender al menos un dominio de la región constante y/o por lo menos un dominio de la región variable de la inmunoglobulina, o una parte del mismo que incluye un minidominio. De esta manera, un dominio variable que, por ejemplo, se modifica en la región C-terminal o el dominio variable enlazado a una región CH1 modificada, por ejemplo un minidominio CH1 modificado, es una de las modalidades preferidas.

La inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención comprende un dominio que tiene al menos un 50% de homología con el dominio no modificado.

El término “homología” indica que los polipéptidos tienen los mismos residuos o residuos conservados en una posición correspondiente en su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término también se extiende a las o más secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos homólogos.

“Dominio de inmunoglobulinas homólogo” significa un dominio de inmunoglobulina de acuerdo con la invención que tiene al menos aproximadamente un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de dominio de inmunoglobulina de secuencia nativa de longitud completa o cualquier otro fragmento de una secuencia de dominio de inmunoglobulina de longitud completa como se describe aquí. Preferiblemente, un dominio de inmunoglobulina homólogo tendrá al menos aproximadamente un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente un 55% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 60% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 65% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a una secuencia de dominio de inmunoglobulina nativa, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de dominio de inmunoglobulina de longitud completa como se describe aquí.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de dominio de inmunoglobulina aquí identificadas, se define como el porcentaje de residuos aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácido en la secuencia de dominio de inmunoglobulina específica, después de alinear la secuencia e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna substitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la destreza en la técnica, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles para el público, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se pueden obtener como se describe a continuación al utilizar el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se ajustan a los valores predefinidos. Aquellos valores no ajustados a los valores predefinidos, es decir, los parámetros ajustables, se definen con los valores siguientes: overlap span=1, overlap fraction=0,125, Word threshold (T)=11, y scoring matrix=BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina un valor de % de identidad de secuencia de aminoácidos al dividir (a) el número de residuos aminoácidos idénticos que se corresponden con la secuencia de aminoácidos del dominio de inmunoglobulina de interés que tiene una secuencia derivada del dominio de inmunoglobulina nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la que se compara el dominio de inmunoglobulina de interés que puede ser el dominio de inmunoglobulina no modificado) como se determina por WU-BLAST-2 por (b) el número total de residuos aminoácido de las partes no aleatorias del dominio de la inmunoglobulina de interés. Por ejemplo, en la declaración “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos frente a la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del dominio de inmunoglobulina de interés.

En una versión preferida, la inmunoglobulina de acuerdo con la invención es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo de simple cadena biespecífico. Además, se prefiere que la inmunoglobulina comprenda un dominio biespecífico o una parte del mismo que incluya un minidominio.

La inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención puede emplearse para cualquier propósito conocido en la técnica para inmunoglobulinas, pero también permite aplicaciones que dependen de la combinación de especificidades introducidas por la presente invención. De acuerdo con esto, las inmunoglobulinas según la presente invención se emplean preferiblemente para uso terapéutico y preventivo (por ejemplo, como inmunoterapia activa o pasiva); para uso preparativo y analítico y para uso diagnóstico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de socios de unión que contiene

(a) una inmunoglobulina modificada que tiene un sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina incorporada en uno o varios bucles estructurales, y

(b) una molécula de unión que contiene un epítipo de dicho antígeno.

Dicha molécula de unión de este kit de acuerdo con la presente invención se puede emplear para identificar la especificidad de la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención. Al utilizar la molécula de unión de este kit de acuerdo con la presente invención, se puede determinar la potencia de las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención.

La potencia como aquí se define, es la propiedad de enlace de la molécula modificada a su antígeno. El enlace puede determinarse cuantitativa y/o cualitativamente en términos de especificidad y/o afinidad y/o avidéz, como se emplea para propósitos de control de calidad.

Además, la molécula de unión de un kit de acuerdo con la presente invención puede emplearse para seleccionar la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención a partir de una biblioteca que consiste en al menos 10, preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos 10000, en especial al menos 100000 inmunoglobulinas con diferentes modificaciones en los bucles estructurales.

De acuerdo con la presente invención, una de las características clave de la presente invención es que el diseño de los dominios de inmunoglobulina se lleva a cabo en regiones que normalmente no están involucradas en la unión de antígeno, en otras palabras, en regiones distintas de los CDRs de un anticuerpo. Se observó que el pliegue específico de dominios de inmunoglobulina permite la introducción de mutaciones aleatorias en regiones que estructuralmente son análogas a los CDRs pero diferentes en la posición en la secuencia. Las regiones identificadas por la presente invención son, como los CDRs, regiones del bucle que conectan las hebras beta del pliegue de la inmunoglobulina.

Más específicamente, aquí se describe que al introducir mutaciones aleatorias en los bucles que conectan las hebras beta A-B y E-F de un dominio IgG1 CH3 humano, se seleccionaron dominios CH3 mutados que se unen específicamente a un péptido 9 receptor tipo Toll (TLR-9) o a una lisozima de huevo de gallina, que son un péptido y una proteína respectivamente que normalmente no son reconocidos y unidos por dominios CH3 humanos de IgGL. Las mutaciones introducidas por nosotros incluyen mutaciones en las que los residuos aminoácidos seleccionados en la secuencia salvaje se reemplazaron por residuos seleccionados aleatoriamente, y también incluyen inserciones de residuos aminoácido extra en los bucles anteriormente mencionados.

Por analogía los dominios de inmunoglobulina de cualquier clase de inmunoglobulinas y de inmunoglobulinas de cualquier especie son susceptibles a este tipo de ingeniería. Además, no sólo se pueden manipular los bucles específicos objetivo de la presente invención, sino que cualquier bucle que conecta hebras beta en dominios de inmunoglobulina puede ser manipulado de la misma forma.

Los dominios de inmunoglobulina diseñados a partir de cualquier organismo y de cualquier tipo de inmunoglobulina pueden emplearse de acuerdo con la presente invención ya sea como tales (como dominios sencillos), o como parte de una molécula más grande. Por ejemplo, pueden ser parte de una inmunoglobulina intacta, que de acuerdo con esto tendrá su región de unión de antígeno "normal" formada por los 6 CDRs y la nueva región de unión de antígeno diseñada. Como esto, se puede generar una inmunoglobulina multiespecífica, por ejemplo biespecífica. Los dominios de inmunoglobulina diseñados también pueden formar parte de cualquier proteína de fusión. El uso de estos dominios de inmunoglobulina diseñados se encuentra en el campo general del uso de inmunoglobulinas.

Los dominios de las siguientes inmunoglobulinas se entienden aquí como dominios de inmunoglobulina:

para IgG, IgD e IgA: VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3

para IgM e IgE: VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3, CH4

1. Dominios de inmunoglobulina sencillos aleatorizados en un lado, es decir, ya sea en bucles que conectan hebras beta B-C, D-E o F-G (la "punta", con la excepción de dominios variables que están cubiertos por muchas patentes) o hebras beta A-B, C-D, (C-C' y C"-D en el caso de dominios variables) o E-F (el "fondo"). Se pueden aleatorizar los bucles sencillos o cualquier combinación de bucles. Pueden cambiarse, eliminarse o insertarse residuos adicionales.

2. Dominios de inmunoglobulina sencillos aleatorizados en ambos lados, la punta y el fondo.

3. Cualquier proteína que contiene uno de los dominios sencillos aleatorizados, tales como:

a) dímeros de "CH3 de cadena sencilla" (scCH3), scCH2, scCH1/CL, aleatorizados en uno o ambos lados

b) Fv de cadena sencilla aleatorizados en el "fondo", es decir, en el lado opuesto a los CDRs

## ES 2 321 861 T3

- c) fragmentos Fab aleatorizados en el “fondo”, es decir, en el extremo C-terminal del dominos CH1 y del CL
- d) fragmentos Fc (es decir, proteínas que consisten en CH2-CH3) aleatorizadas en uno o ambos lados
- 5 e) inmunoglobulinas completas aleatorizadas en el fondo de Fc
- f) otros dominios convenientes

10 Las ventajas primarias de los dominios sencillos: son muy similares a todos los argumentos que se utilizan para estimular las moléculas VH de camello (“nanocuerpos” (nanobodies), ver [www.ablynx.com](http://www.ablynx.com)). Los dominios de inmunoglobulina aleatorizados son proteínas muy pequeñas (peso molecular aproximado 12-15 kDa, dependiendo del número de residuos aminoácido insertados) y por tanto tendrán las siguientes ventajas en comparación con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos convencionales tales como scFv y Fabs: reconocer epítomos no comunes u ocultos, unirse en cavidades o sitios activos de dianas de proteína, facilidad de fabricación, y muchos otros. En el caso  
15 de un dominio de inmunoglobulina que está aleatorizado en ambos lados, puede generarse una molécula bivalente o biespecífica. Las ventajas principales de los dominios sencillos como parte de proteínas de fusión son las propiedades de enlace adicionales que pueden diseñarse en cualquier otra proteína.

20 Se contempla que cualquier sistema de expresión pueda emplearse para hacer proteínas. Una analogía a los dominios sencillos como se describe aquí se puede encontrar en los anticuerpos del camello, que sólo tienen un VH pero ningún VL. En estas proteínas, solo 3 CDRs (en lugar de 6 como en los anticuerpos “normales” son responsables de la unión de antígeno).

25 Las siguientes referencias de patentes se incorporan aquí por referencia como si se establecieran en su totalidad:

Patente de los E.U.A. Nº 6,294,654 “Modified immunoglobulin molecule incorporating an antigen in a non-CUD loop region”

30 Patente de los E.U.A. Nº 5,844,094 “Target binding polypeptide”

Patente de los E.U.A. Nº 5,395,750 “Methods for producing proteins which bind to predetermined antigens”

Patente de los E.U.A. Nº 2004/0071690 “High avidity polyvalent and polyspecific reagents”

35 Patente de los E.U.A. Nº 2004/0018508 “Surrogate antibodies and methods of preparation and use thereof”

Patente de los E.U.A. Nº 2003/0157091 “Multi- functional proteins”

40 Patente de los E.U.A. Nº 2003/0148372 “Method to screen phage display libraries with different ligands”

Patente de los E.U.A. Nº 2002/0103345 “Bispecific immunoglobulin-like antigen binding proteins and method of production”

45 Patente de los E.U.A. Nº 2004/0097711 “Immunoglobulin superfamily proteins”

Patente de los E.U.A. Nº 2004/0082508 “Secreted proteins”

Patente de los E.U.A. Nº 2004/0063924 “Secreted proteins”

50 Patente de los E.U.A. Nº 2004/0043424 “Immunoglobulin superfamily proteins”

Patente de los E.U.A. Nº 5,892,019 “Production of a single-gene-encoded immunoglobulin”

55 Patente de los E.U.A. Nº 5,844,094 “Target binding polypeptide”.

La presente invención además se ilustra en las siguientes figuras y ejemplos sin estar restringida a ellos.

60 La Figura 1a muestra la estructura de una IgG1 intacta. Los dominios se indican con flechas.

La Figura 1b ilustra la organización estructural de los monómeros principales del isotipo de la inmunoglobulina humana. Los enlaces disulfuro se muestran como líneas, los grupos carbohidratos N-enlazados se muestran como círculos.

65 La Figura 2 muestra el pliegue de la inmunoglobulina para un dominio constante (izquierdo) y uno variable (derecho) de una inmunoglobulina. Las hebras beta se indican mediante flechas.

## ES 2 321 861 T3

La Figura 3 muestra un modelo molecular del dominio diseñado CH3 de acuerdo con la presente invención, con la parte aleatorizada indicada por una superficie accesible a solvente. La superficie está en un círculo.

La Figura 4 muestra una presentación esquemática de los PCRs utilizados para la producción de los fragmentos empleados para el ensamblaje del dominio CH3 mutado. Los cebadores PCR se indican mediante flechas con su orientación 5'-3' respectiva, y las líneas verticales indican las posiciones aproximadas de los sitios de restricción introducidos que se emplearon para el ensamblaje del gen mutado. Los siguientes sitios de restricción están contenidos en los cebadores para las ligaciones de los fragmentos PCR: CH3LNCO: NcoI; CH3LSAC y CH3CSAC: SacI; CH3CHIN y CH3RHIN: HindIII; CH3RNOT: NotI.

La Figura 5 muestra algunos ejemplos de cómo pueden utilizarse los dominios de la inmunoglobulina de la presente solicitud. Las regiones aleatorizadas se indican mediante un símbolo de estrella. Las especificidades de las regiones aleatorizadas en una molécula pueden ser idénticas o diferentes.

La Figura 6 muestra una presentación esquemática del diseño del dominio CH3 biespecífico de ingeniería. Los nombres de los cebadores se dan en casillas y las flechas indican la dirección en la que se alargan los cebadores. Las casillas con líneas inclinadas indican las posiciones relativas de las regiones que se aleatorizan en esta construcción, las casillas con líneas verticales indican las posiciones relativas de las regiones que se introdujeron para la generación del clon C24, y se indican los sitios de restricción empleados para el procedimiento de clonación.

La Figura 7 muestra una presentación esquemática del diseño del dominio CH3 biespecífico diseñado. La secuencia de nucleótidos y su traducción se muestra en el diseño básico del dominio CH3 biespecífico diseñado. Las secuencias rojas indican regiones aleatorizadas a fin de generar la construcción biespecífica, mientras que las casillas verdes indican regiones en las que la secuencia se aleatorizó a fin de generar el clon C24.

La Figura 8 muestra el listado de secuencia de las secuencias aquí descritas.

### Descripción de ejemplos específicos

#### Ejemplo 1

##### *Construcción de la biblioteca de CH3 y expresión en superficie de fago*

La estructura cristalina de un fragmento IgG1 Fc, que se publica en la Base de Datos Brookhaven como entrada 1OQO.pdb se usó para ayudar en el diseño del dominio CH3 mutado.

La secuencia que se utiliza como base para la construcción de la biblioteca CH3 se indica en la SEC ID N° 1. En esta secuencia, el primer aminoácido corresponde a Prolina 343 de la cadena A de la entrada loqo.pdb de la base de datos Brookhaven. El último residuo contenido en loqo.pdb es Serina 102 de la SEC ID N° 1. Después del análisis detallado de la estructura de loqo.pdb y mediante la inspección visual de los residuos que forman los bucles que conectan las hebras beta, se decidió aleatorizar los residuos 17, 18 y 19, que son parte del bucle que conecta la hebra A-B así como 71, 72, 73, 76 y 77, que son parte del bucle que conecta a la hebra beta E-F de SEC ID N° 1. Un modelo molecular del dominio CH3 diseñado, con la parte aleatorizada indicada por una superficie accesible a solvente se muestra en la Figura 3. El gen diseñado se produjo mediante una serie de reacciones PCR seguidas por ligación de los productos PCR resultantes. Para facilitar la ligación, algunos de los codones de la secuencia de nucleótidos que codifica para SEC ID N° 1 se modificaron para producir sitios de restricción sin cambiar las secuencias de aminoácidos (mutaciones silenciosas). Para la 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 cuadro con la señal de secreción pEIB, los residuos nucleótidos extra que codifican Met-Ala se conectaron en el extremo 5' de la secuencia para crear un sitio de restricción NcoI. Para los residuos aleatorizados, se eligió el codón NNS (código IUPAC, donde S significa C o G) que codifica todos los 20 aminoácidos de origen natural, pero se evitan 2 de 3 codones de parada. La secuencia diseñada se indica como una secuencia de nucleótido en SEC ID N° 2 y como una secuencia de aminoácidos en SEC ID N° 3. La letra X en SEC ID N° 3 representa residuos aminoácido aleatorizados. Las secuencias de los cebadores PCR utilizados para el ensamblaje del dominio CH3 mutado se indican en SEC ID N° 4 a 9. La Figura 4 muestra una presentación esquemática de los fragmentos PCR generados para el ensamblaje del gen mutado y los cebadores empleados para eso.

El ADNc de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3D6 (Felgenhauer M, Kohl J, Rüker F. Nucleotide sequences of the cD-NAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1-gp41. Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25; 18(16):4927) se usó como patrón para las reacciones PCR. Los 3 productos PCR se digirieron con SacI y/o HindIII respectivamente y ligaron en conjunto. El producto de ligación se digirió adicionalmente con NcoI y NotI y se ligó en el vector fagémido pHEN1 de expresión de superficie, que previamente se digirió con NcoI y NotI. Un número de clones seleccionados se controló por análisis de restricción y por secuenciado de ADN y se encontró que contienen el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas insertadas de forma correcta. Para las siguientes etapas de preparación del fago se siguieron protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transformó en células TGI de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, las

## ES 2 321 861 T3

partículas del fago se rescataron de células TG1 de *E. coli* con el fago M13-KO7 auxiliar. Después las partículas del fago se precipitaron a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disolvieron en agua y se usaron para la selección por ciclos o, de forma alternativa, se almacenaron a menos 80°C.

### 5 Ejemplo 2

#### *Construcción de la biblioteca CH3+3*

10 Esta biblioteca se construyó y clonó de la misma forma que la biblioteca CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción esta indica en SEC ID N° 10, la secuencia de nucleótidos correspondiente en SEC ID N° 11 y los cebadores empleados para la construcción fueron SEC ID N° 4-7, SEC ID N° 9 y SEC ID N° 12.

### 15 Ejemplo 3

#### *Construcción de la biblioteca CH3+5*

20 Esta biblioteca se construyó y clonó de la misma forma que la biblioteca CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción se indica en SEC ID N° 13, la secuencia de nucleótidos correspondiente en SEC ID N° 14, y los cebadores empleadas para la construcción fueron SEC ID N° 4-7, SEC ID N° 9 y SEC ID N° 15.

### Ejemplo 4

#### 25 *Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca CH3-fago en el péptido TLR-9*

Se realizaron 3 rondas de selección por ciclo de adsorción-desorción de acuerdo con protocolos estándar. Brevemente, se aplicó el siguiente método. Se recubrieron placas de 96 pocillos (Nunc) con un péptido sintético que representa parte de la secuencia del receptor 9 tipo toll (TLR-9). Se agregaron 200  $\mu$ l por pocillo de la siguiente solución: tampón carbonato Na 0,1M, pH 9,6, con las siguientes concentraciones de péptido disuelto:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml de péptido TLR-9

35 Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 500  $\mu$ g/ml de péptido TLR-9

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 100  $\mu$ g/ml de péptido TLR-9

40 Se realizó la incubación durante 1 hora aproximadamente a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-P133) con 200  $\mu$ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después, la biblioteca de fagos de expresión en superficie se dejó reaccionar con el péptido unido por adición de 100  $\mu$ l de suspensión de fago y 100  $\mu$ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

45 Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue. Después de la primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 5 x 300  $\mu$ l de PBS; después de la segunda selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 10x 300  $\mu$ l de PBS; después de la tercera selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 20 x 300  $\mu$ l de PBS.

50 La elusión de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200  $\mu$ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó la suspensión del fago mediante adición de 60  $\mu$ l de base Tris 2M, seguida de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y se incubaron a 30°C durante la noche.

60

65

## ES 2 321 861 T3

TABLA 1

*Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca CH3-fago en el péptido TLR-9 (títulos de fago)*

5

Ronda de selección por adsorción-desorción	Concentración de TRL-9 en por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fago/ml)	Salida (fago/ml)
1°	1 mg/ml	$6 \times 10^{18}$	$2 \times 10^{10}$
2°	0,5 mg/ml	$4 \times 10^{18}$	$2 \times 10^{10}$
3°	0,1 mg/ml	$4 \times 10^{22}$	$6 \times 10^{10}$

25

### Ejemplo 5

*Clonación de clones seleccionados de mutantes CH3 seleccionados contra TLR-9 para expresión soluble*

30

35

40

El ADN fagémido del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica regiones CH3 mutadas se amplificó por lotes por PCR y se clonó NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación y se desarrollaron a 30°C grados en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200  $\mu$ l de medio 2xYT con ampicilina, se desarrollaron durante la noche a 30°C y se indujeron por adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células se recolectaron por centrifugación y se trataron con 100  $\mu$ l de tampón borato Na, pH 8,0, a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. 50  $\mu$ l de los extractos periplásmicos se emplearon en ELISA (ver a continuación).

45

### Ejemplo 6

*ELISA de mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9*

50

Se analizó el enlace específico de los clones seleccionados frente al péptido TLR-9 por ELISA.

55

Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorp), 100  $\mu$ l por pocillo, 20  $\mu$ g de péptido TLR-9/ml tampón carbonato pH 9,6, 1 h a 37°C

60

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a temperatura ambiente

65

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Enlace de extractos periplásmicos: 50  $\mu$ l de extracto periplásmico 50 ml de BSA-PBS al 2% a temperatura ambiente durante la noche.

70

Lavado: 3x 200  $\mu$ l de PBS

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100  $\mu$ l por pocillo

75

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

## ES 2 321 861 T3

Segundo anticuerpo: cabra antiratón\*HRP (SIGMA), 1:1000 en BSA-PES al 1%, 90 min a TA, 100  $\mu$ l por pocillo

5 Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Detección: 3 mg/ml de OPD en tampón citrato/fosfato de Na, pH 4,5, 0,4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%

Parada: 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M

10 Lectura de absorbancia: 492/620 nm

15 Los clones que dieron señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describe anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 del volumen de cultivo como se describe anteriormente y se ensayaron con ELISA (como se describe arriba) para confirmación.

TABLA 2

Resultados del ELISA de confirmación

20

	Con antígeno	Sin antígeno
25 Clon	A 492/620 4 lecturas	A 492/620 1 lectura
A67	0,0435	0,019
30 B54	0,0937	0,051
C67	0,0295	0,013
35 Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo):	0,0115	

35

### Ejemplo 7

40 Selección por ciclos de adsorción - desorción de la biblioteca de fagos CH3 y CH3+5 en lisozima de huevo de gallina

Se realizaron 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción. Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxi-sorp (Nunc) con lisozima de huevo de gallina, por adición de 200  $\mu$ l de la siguiente solución por pocillo:

45 PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml HEL

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

50

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200  $\mu$ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

55

Después, se permite que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccione con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100  $\mu$ l de suspensión de fago y 100  $\mu$ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

60

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 5 x 300  $\mu$ l de PBS.

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 10 x 300  $\mu$ l de PBS.

65

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 20 x 300  $\mu$ l de PBS.

## ES 2 321 861 T3

La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200  $\mu$ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60  $\mu$ l de Base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, y se incubaron a 30°C durante la noche.

TABLA 3

*Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3 en lisozima de huevo de gallina (títulos de fago)*

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Concentración de HEL por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fago/ml)	Salida (fago/ml)
1°	2 mg/ml		$4,7 \times 10^{10}$
2°	1 mg/ml	$1,29 \times 10^{22}$	$8,0 \times 10^9$
3°	1 mg/ml	$5,71 \times 10^{20}$	$4,8 \times 10^{10}$

TABLA 4

*Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3+5 en lisozima de huevo de gallina (HEL) (títulos de fago)*

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Concentración de HEL por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fago/ml)	Salida (fago/ml)
1°	2 mg/ml	$8,3 \times 10^{16}$	$2,9 \times 10^9$
2°	1 mg/ml	$2,1 \times 10^{19}$	$2,6 \times 10^9$
3°	1 mg/ml	$5,4 \times 10^{19}$	$1,2 \times 10^{10}$

### Ejemplo 8

#### *Clonación de clones seleccionados del ejemplo 7 para expresión soluble*

La clonación de clones seleccionados para expresión soluble se realizó como se describe anteriormente para los mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9

## ES 2 321 861 T3

### Ejemplo 9

#### *Expresión soluble de clones seleccionados del ejemplo 7*

5 La expresión soluble de clones seleccionados se realizó como se describe anteriormente para los mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9. Los extractos periplásmicos se ensayaron en un ELISA preliminar (protocolo ver ejemplo 10).

10 Los clones que dieron señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describe anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 de volumen de cultivo como se describió anteriormente y se ensayaron con ELISA (como se describe en el ejemplo 10) para confirmación.

### Ejemplo 10

#### *ELISA de mutantes CH3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina*

20 Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorp), 100  $\mu$ l por pocillo, 100  $\mu$ l de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS, 1 h a 37°C.

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a TA

25 Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Enlace de extractos periplásmicos: 50  $\mu$ l de extracto periplásmico 50  $\mu$ l de BSA-PBS al 2% a temperatura ambiente durante la noche

30 Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100  $\mu$ l por pocillo

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

35 Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón\*HRP(SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100  $\mu$ l por pocillo

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

40 Detección: 3 mg/ml OPD en tampón citrato/fosfato Na, pH 4,5, 0,4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%

Parada: 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M

45 Lectura de absorbancia: 492/620 nm

TABLA 5

50 *Resultados de ELISA de confirmación de mutantes de CH3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina*

	Con antígeno	Sin antígeno
55 Clon	A <sub>492/620</sub> 4 lecturas	A <sub>492/620</sub> 1 lectura
60 B12	0,396	0,012
D10	0,415	0,026
D46	0,398	0,011
65 Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo):	0,1763	

## ES 2 321 861 T3

TABLA 6

*Resultados de ELISA de confirmación con diluciones de antígeno de mutantes de CH3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina*

C (µg/ml)	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,55	0,78	0,39
clon										
B12	0,707	0,532	0,432	0,297	0,192	0,150	0,148	0,049	0,034	0,015
D46	0,713	0,561	0,342	0,220	0,133	0,088	0,047	0,032	0,021	0,010
D10	0,415	0,685	0,571	0,368	0,231	0,175	0,171	0,068	0,047	0,026
-(nc)	0,449	0,360	0,165	0,072	0,038	0,023	0,017	0,013	0,009	0,007
Nc: sin extracto periplásmico añadido										

Se observa que la lisozima de huevo de gallina reacciona con anticuerpo anti-his4, por lo tanto se observa un fondo relativamente alto.

TABLA 7

*Resultados de ELISA de confirmación de mutantes of CH3+5 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina*

	Con antígeno	Sin antígeno
Clon	A 492/620 4 lecturas	A 492/620 1 lectura
A13	0,197	0,016
A66	0,461	0,019
B18	0,533 (5 lecturas)	No realizado
B20	0,184	0,016
B68	0,535	0,019
B40	0,706	0,051
C24	0,352	0,072
D22	0,147	0,019
C22	0,439	0,017
D37	0,360	0,026
D40	0,559	0,034
D56	0,369	0,019
Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo): 0,1334		
Nota: La lisozima de huevo de gallina reacciona con el anticuerpo anti-his4, por lo tanto se observa un fondo relativamente alto.		

## ES 2 321 861 T3

### Ejemplo 11

#### Biblioteca CL

5 La inspección visual de la estructura cristalina de un fragmento de Fab (se emplea la estructura del Fab del anti-  
cuerpo monoclonal humano 3D6: RSCB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) entrada 1DFB.PDB (He XM,  
*et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Aug 1;89(15):7154-8) y el análisis asistido por ordenador (por ejemplo, para este  
propósito se usa Protein Explorer (<http://molvis.sdsc.edu/protexpl/frntdoor.htm>)) de la estructura secundaria y terciaria  
10 de esta proteína) permite identificar residuos localizados en regiones del bucle que conectan las hebras beta de la plan-  
tilla del dominio CL. Estos residuos comprenden los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos  
42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117 y los aminoácidos 123 a 126  
(numeración de acuerdo con el sistema de numeración IMGT (Lefranc MP, *et al.* Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1; 33  
(Database issue):0593-7; Lefranc MP, *et al.* Dev Comp Immunol. 2005; 29(3):185- 203)).

15 Más específicamente, los residuos 11, 12, 14-18, y 92-95 se aleatorizan dentro del dominio CL humano (SEC ID  
Nº 48). La aleatorización se logra por amplificación PCR de las secuencias de codificación con cebadores PCR en que  
las posiciones de los codones relevantes se codifican por la secuencia de nucleótidos 5'-NNS-3', que potencialmente  
codifica todos los 20 aminoácidos, evitando 2 de los 3 codones de parada. El inserto de la biblioteca se amplifica  
mediante dos reacciones PCR separadas y los dos fragmentos PCR se ligan en conjunto mediante un sitio restricción  
20 HpyCH4IV que se introduce como mutación silenciosa mediante los cebadores PCR. Además, los cebadores propor-  
cionan los sitios de restricción de endonucleasa NcoI y NotI respectivamente para clonar en el vector de expresión  
de fago pHEN (Hoogenboom HR, *et al.* Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19(15):4133-7). La cisteína C-terminal del  
dominio CL no se incluye para la expresión de fago, pero puede agregarse posteriormente cuando se utiliza un clon  
CL modificado, por ejemplo, para la construcción de un fragmento Fab.

25 Como una plantilla para la amplificación PCR, se usa un plásmido pRcCMV-3D6LC (Rüker F, *et al.* Ann N Y  
Acad Sci. 1991 Dec 27; 646:212-9), que contiene como inserto la cadena ligera completa del anticuerpo monoclonal  
humano.

30 Para las bibliotecas CL+3 (SEC ID Nº 50, 51) y CL+5 (SEC ID Nº 52, 53), que contienen residuos adicionales  
insertados entre las posiciones 92 y 95 del dominio CL, se emplean los cebadores CLRHPY3 y CLRHPY5 respec-  
tivamente en lugar del cebador CLRHPY.

35 A continuación se muestra (SEC ID Nº 48, 49) la secuencia de aminoácidos y nucleótidos del producto final del  
PCR las ligaciones, clonada en el sitio NcoI de pHEN1, que conduce a la unión de una secuencia líder peIB con el  
extremo N de la construcción:

40 +3 M K Y L L P T A A A G L L L L A A  
1 ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC

45 NcoI  
+3 Q P A T A V A A P S V F I F P P  
51 CCAGCCGGCC ATGGCCGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT

55 +3 S Q A S V V C L L N  
101 CTNNSNNSCA GNNSNNSNNS NNSNNSGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT

60 +3 N F Y P R C A K V Q W K V D N A L  
151 AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT

65

## ES 2 321 861 T3

+3 Q S G N S Q E S V T E Q D S K D  
201 CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTCAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA

5

### HpyCH4IV

+3 S T Y S L S S T L T L Y E  
251 GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTACGT TGNNSNNSNN SNNSTACGAG

10

+3 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P  
301 AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC

15

### NotI

+3 V T K S F N R G E A A A  
351 CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGGC GGCCGCA

20

25

### *Lista de cebadores para la biblioteca CL*

30 cllnco: 5'-cttaccatgg ccgtggctgc accatctgtc ttcattctcc  
cgccatctnn snnscagnns nnsnnsnnsn nsgcctctgt tgtgtgc-3' (SEC  
ID N° 56)

35

40 cllhpy: 5'-tgacaacgtc aggggtgctgc tgaggc-31 (SEC ID N° 57)

40

45 clrhpy: 5'-tcagaacgtt gnnsnnsnns nnstacqaqa  
aacacaaagt c-3' (SEC ID N° 58)

45

50 clrhpy3: 5'-tcagaacgtt gnnsnnsnns nnsnnsnnsn  
nstacgagaa acacaaagtc-3' (SEC ID N° 59)

50

55 clrhpy5: 5'-tcagaacgtt gnnsrmsnns nnsnnsnnsn  
nstacgagaa aaagtc-3' (SEC ID N° 60)

55

60 clrnot: 5'-catcgoggcc gcctotcccc tgttgaagct c3' (SEC  
ID N° 61)

60

Mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN se controla que los numerosos clones seleccionados de la biblioteca (dominios CL mutados clonados en el vector fagémido pHEN1) contengan el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas correctamente insertadas. Para las siguientes etapas de preparación del fago, se siguen protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transforma en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, se rescatan partículas fago de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Después. Las partículas de fago se precipitan a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disuelven en agua y se utilizan para la selección por ciclos de adsorción-desorción o, de forma alternativa, se pueden almacenar a menos 80°C.

65

## ES 2 321 861 T3

### Ejemplo 12

#### *Biblioteca CH1*

5 La inspección visual de la estructura cristalina de un fragmento Fab (se usa la estructura del Fab del anticuerpo monoclonal humano 3D6: RSCB Protein Data Bank Entry 1DFB.PDB) y el análisis asistido por ordenador (se utiliza Protein Explorer para este propósito) de la estructura secundaria y terciaria de esta proteína permite identificar residuos ubicados en regiones del bucle que conectan las hebras beta del patrón del dominio CH1. Estos residuos comprenden los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 y los aminoácidos 106 a 117 (numeración de acuerdo con el sistema de numeración IMGT).

Más específicamente, los residuos 12-19 y 93-100 se aleatorizan dentro del dominio CH1 humano (SEC ID N° 54, 55). La aleatorización se logra mediante amplificación PCR de las secuencias de codificación con cebadores PCR en que las posiciones de los codones relevantes se codifican por la secuencia de nucleótidos 5'-NNS-3', que codifica potencialmente todos los 20 aminoácidos, evitando 2 de los 3 codones. El inserto de la biblioteca se amplifica mediante dos reacciones PCR separadas y los dos fragmentos PCR se ligan en conjunto mediante un sitio de restricción BstEII que aparece de forma natural en el dominio CH1. Los cebadores proporcionan además los sitios de restricción de endonucleasa NcoI y NotI respectivamente para la clonación en el vector de expresión del fago pHEN. La cisteína C-terminal del dominio CH1 no se incluye para la expresión del fago pero puede agregarse posteriormente cuando se utiliza un clon CH1 modificado, por ejemplo, para la construcción de un fragmento Fab.

Se usa como plantilla para la amplificación PCR un plásmido como pRcCMV-3D6HC, que contiene como inserto la cadena pesada completa del anticuerpo monoclonal humano.

25 A continuación se muestra (SEC. ID N° 54, 55) la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del producto final de los PCRs y ligaciones, clonada en el sitio NcoI de pHEN1, que lleva a la unión de una secuencia líder pelB con el extremo N de la construcción:

```
30      +3 M K Y   L P T A A A   G L L L L A A
      1 ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTOOCGGC

35              NcoI
      +3   Q P A M A A S T K G P S V F P L
      51 CCAGCCGGCC ATGGCCGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG

      +3   A P S S   A L G C L
      45 101 CACCCTCCTC CNNSNNSNNS NNSNNSNNSN NSNNSGCCCT GGGCTGCCTG

50
      +3   V K D Y F P E   P V T V S W   N S G A
      151 GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGDA ACTCAGGCGC

55
      +3   L T S       G V H       T F P A V L Q   S S G
      201 CCTGACCAGC GGCGTGACA CCTTCCCGGC TGTCCTACAG TCCTCAGGAC

              BstEII
      +3   L Y S L   S S V   V T V   P
      65 251 TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCNNSNNSNN SNNSNNSNNS
```

## ES 2 321 861 T3

+3 T Y I C N V N H K P S N T K V D  
301 NNSACCTACA TCTGCAACGT GAATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA

5

NotI

+3 K K V E P K S A A A  
351 CAAGAAAGTT GAGCCCAAAT CTGCGGCCGC A

10

### 15 *Lista de cebadores para la biblioteca CH1*

CH1LNCO: 5'-acctccatgg cgcctccac caagggccca  
20 tggctctcc cctggcacc ctctccnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsn  
sgccctgggc tgctg gtc-3' (SEC ID N° 62)

25

CH1LBST: 5'-ggcacggtca ccacgtgct gag-3' (SEC ID N° 63)  
CHIRBST: 5'-agcgtggtga ccgtgccnn snnsnnsnns nnsnnsnnsa  
30 cctacatctg caacgtgaat c-3' (SEC ID N° 64)

35

CHIRNOT: 5'-catagcggcc gcagatttg gctcaacttt cttgtc-  
3' (SEC ID N° 65)

40

Mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN se controla que los numerosos clones seleccionados de la biblioteca (dominios CH1 mutados clonados en el vector fagémido pHEN1) contengan el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas correctamente insertadas. Para las siguientes etapas de preparación del fago, se siguen protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transforma en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, se rescatan partículas fago de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Después, Las partículas de fago se precipitan a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disuelven en agua y se utilizan para la selección por ciclos de adsorción-desorción o, de forma alternativa, se pueden almacenar a menos 80°C.

45

### Ejemplo 13

50

*Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca del fago-CH1 en lisozima de huevo de gallina (HEL)*

55

Se realizan 3 rondas de selección de ciclos de adsorción-desorción con la biblioteca fago-CH1 (ver ejemplo 12). Placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) se revisten con lisozima de huevo de gallina, añadiendo 200 µl de la siguiente solución por pocillo: PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml HEL

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

60

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200 µl por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

65

Después, se permite que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccione con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100 µl de suspensión de fago y 100 µl de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

## ES 2 321 861 T3

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 5 x 300  $\mu$ l de PBS.

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 10 x 300  $\mu$ l de PBS.

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 20 x 300  $\mu$ l de PBS.

La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200  $\mu$ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60  $\mu$ l de Base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, y se incubaron a 30°C durante la noche.

### *Clonación de clones seleccionados de mutantes CH1 seleccionados frente a lisozima para expresión soluble*

El ADN fagémido del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica dominios CH1 mutados se amplifica por lotes por PCR y se clona NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación y se desarrollaron a 30°C grados en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200  $\mu$ l de medio 2xYT con ampicilina, se desarrollaron durante la noche a 30°C y se indujeron por adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células se recolectaron por centrifugación y se trataron con 100  $\mu$ l de tampón borato Na, pH 8,0, a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. 50  $\mu$ l de los extractos periplásmicos se emplearon en ELISA.

Los clones que dan señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivan en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describen anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aíslan en 1/20 del volumen de cultivo como se describió anteriormente y ensayan con ELISA (como se describe a continuación) para confirmación.

### *ELISA de mutantes CH1 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina*

Revestimiento: placa de micro titulación (NUNC, Maxisorp), 100  $\mu$ l por pocillo, 100  $\mu$ g de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS, 1 h a 37°C

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a TA

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Enlace de extracto periplásmico: 50  $\mu$ l de extracto periplásmico 50  $\mu$ l de BSA-PBS al 2%, a temperatura ambiente durante la noche

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100  $\mu$ l por pocillo

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón\*HRP(SIGMA),1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100  $\mu$ l por pocillo

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Detección: 3 mg/ml OPD en tampón citrato/fosfato Na, pH 4,5, 0,4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%

Parada: 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

Los clones se interpretan como positivos cuando su señal ELISA es al menos tres veces la de la señal de fondo.

## ES 2 321 861 T3

### Ejemplo 14

#### *Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca fago-CL en lisozima de huevo de gallina (HEL)*

5 Se realizan 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción con la biblioteca de fago-CL (ver ejemplo 11).

Se revisten placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) con lisozima de huevo de gallina, añadiendo 200  $\mu$ l de la solución siguiente por pocillo: PBS, con las concentraciones siguientes de lisozima de huevo de gallina:

10 Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml HEL

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

15 La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200  $\mu$ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

20 Después, se permite que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccione con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100  $\mu$ l de suspensión de fago y 100  $\mu$ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

25 Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 5 x 300  $\mu$ l de PBS.

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 10 x 300  $\mu$ l de PBS.

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300  $\mu$ l de T-PBS, 20 x 300  $\mu$ l de PBS.

30 La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200  $\mu$ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60  $\mu$ l de Base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, y se incubaron a 35 30°C durante la noche.

#### *Clonación de clones seleccionados de mutantes CL seleccionados frente a lisozima para expresión soluble*

40 El ADN fagémido del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica dominios CL mutados se amplifica por lotes por PCR y se clona NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación y se desarrollaron a 30°C grados en medio TYE con glucosa al 45 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200  $\mu$ l de medio 2xYT con ampicilina, se desarrollaron durante la noche a 30°C y se indujeron por adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células se recolectaron por centrifugación y se trataron con 100  $\mu$ l de tampón borato Na, pH 8,0, a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. 50  $\mu$ l de los extractos periplásmicos se emplearon en ELISA.

50 Los clones que dan señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivan en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describen anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aíslan en 1/20 del volumen de cultivo como se describió anteriormente y ensayan con ELISA (como se describe a continuación) para confirmación.

55

#### *ELISA de mutantes CL seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina*

60 Revestimiento: placa de micro titulación (NUNC, Maxisorp), 100  $\mu$ l por pocillo, 100  $\mu$ g de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS, 1 h a 37°C

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a TA

65 Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

## ES 2 321 861 T3

Enlace de extracto periplásmico: 50  $\mu$ l de extracto periplásmico 50  $\mu$ l de BSA-PBS al 2%, a temperatura ambiente durante la noche

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100  $\mu$ l por pocillo

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón\*HRP(SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100  $\mu$ l por pocillo

Lavado: 3 x 200  $\mu$ l de PBS

Detección: 3 mg/ml OPD en tampón citrato/fosfato Na, pH 4,5, 0,4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%

Parada: 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

Los clones se interpretan como positivos cuando su señal ELISA es al menos tres veces la de la señal de fondo.

### Ejemplo 15

*La construcción de un dominio inmunoglobulina que se aleatoriza en ambos lados (dominio CH3 biespecífico de diseño)*

Este ejemplo describe un dominio de inmunoglobulina de diseño con dos especificidades de enlace.

El diseño de este dominio de inmunoglobulina de diseño comprende la siguiente estrategia:

\* se usa como punto de partida un dominio CH3 de diseño, clon C24 (ver ejemplo 10), derivado de la biblioteca CH3+5 que se une específicamente a lisozima

\* los residuos que se tienen que aleatorizar se identificaron en este dominio CH3 modificado, conectando hebras  $\beta$  del pliegue de la inmunoglobulina y disponiéndose en el lado opuesto del dominio comparado con los residuos que se mutaron al generar el clon C24.

\* se diseñaron los cebadores PCR que permiten la aleatorización de estos residuos y la síntesis de este dominio de inmunoglobulina de diseño en un procedimiento similar al descrito anteriormente para las bibliotecas CH3, CH3+3 y la CH3+5.

Se ligaron 4 productos PCR que contienen posiciones aleatorizadas y se amplificaron insertos de longitud completa por PCR. Posteriormente, se clonaron en pHEN-1 mediante sitios NcoI-NotI y transformaron en células TG-1 de *E. coli* para construir una biblioteca de aproximadamente 10<sup>8</sup> colonias. Se secuenciaron 20 colonias seleccionadas aleatoriamente y se encontró que las posiciones aleatorizadas mutaron independientemente. Tampoco se observó la secuencia "salvaje" (C24). La biblioteca del fago se generó siguiendo protocolos estándar, y se logró un título de fago de 6,32 x 10<sup>10</sup> TU/ml.

A fin de probar la biespecificidad, se eligió eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) como segundo antígeno, mientras que se espera que la construcción retenga su especificidad diseñada originalmente para la lisozima de huevo de gallina. El fago reactivo a rhEPO se seleccionó en 4 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción. A fin de conservar la población de clones C24 que después de la mutagénesis todavía se unen a lisozima de huevo de gallina, la primera ronda de selección en rhEPO fue seguida de una ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción de la población fago en lisozima de huevo de gallina (1 mg/ml en PBS). 200  $\mu$ l de rhEPO se revistieron en los 5 pocillos de la placa de micro titulación (Maxisorp, Nunc) en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, en concentraciones decrecientes en rondas sucesivas de selección por ciclos de adsorción-desorción (ver tabla siguiente). Después de bloquear con M-PBS al 2%, se permitió la unión del fago en el agente de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 h. Después de 20 lavados con T-PBS y 20 con PBS, se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,2, y se neutralizó con Tris 2M. El fago eluido se utilizó inmediatamente para infectar TG-1 de crecimiento exponencial. Las células infectadas se seleccionaron en medio que contiene ampicilina. Las partículas de fago se rescataron de sobrenadantes de cultivo hasta superinfección con fago auxiliar M13-KO7, se concentraron con PEG y se utilizaron en otra ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción. Los números de entrada y salida de fago se determinaron como comunidades de transformación de *E. coli* después de cada ronda de selección por ciclos adsorción-desorción (Tabla 8).

## ES 2 321 861 T3

TABLA 8

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Antígeno	Entrada de fago (TU/ml)	Salida de fago (TU/ml)
1	rhEPO, 500 µg/ml	$6,32 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^5$
2	Lisozima, 1 mg/ml	$6,16 \times 10^{15}$	$4,35 \times 10^{10}$
3	rhEPO, 100 µg/ml	$6,07 \times 10^{15}$	$6,78 \times 10^{10}$
4	rhEPO, 100 µg/ml	$8,42 \times 10^{15}$	$3,0 \times 10^{11}$
5	rhEPO, 50 µg/ml	$5,12 \times 10^{15}$	$4,28 \times 10^{10}$

La colonias resultantes se desprendieron de las placas, se cultivaron en 2xYT con ampicilina y su ADN plasmídico se aisló con un midi-prep. Los insertos se amplificaron con PCR y después se subclonaron en el vector pNOTBAD y se transformaron en una cepa E104 de *E. coli*. Se cultivaron 4x72 colonias en 200 µl de 2xYT con ampicilina y se indujeron con L-arabinosa al 0,1% al día siguiente. Tras 24 h de expresión a 16°C, se rompieron con 200 µl de tampón borato Na, pH 8,0 durante 6 h a 4°C y se usó extracto periplásmico en ELISA.

Para ELISA, se revistieron placas Maxisorp con lisozima de huevo de gallina en PBS (20 µg/ml) o rhEPO en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, respectivamente, durante 1 h a 37°C. Tras el bloqueo con BSA-PBS al 1%, se dejó que el extracto periplásmicos se uniera en el mismo agente de bloqueo durante la noche. El enlace se reveló con un anticuerpo anti-His-(4) y un anticuerpo IgG cabra anti-ratón, conjugado con HRP (para la detección de lisozima de huevo de gallina) o AP (para la detección de rhEPO). El color de la reacción de la conversión OPD (HRP) se leyó a 492/620 nm después de pararse con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25 M y la conversación pNPP (AP) se leyó a 405/620 nm. 14 clones con valores prometedores de absorbancia se seleccionaron para expresión a escala de 20 ml. Después de 24 h de inducción de arabinosa a 16°C, las células se recogieron y se rompieron durante la noche en 1 ml de tampón borato Na a 4°C, y el lisado se empleó para ELISA. El ELISA se realizó como antes, en 4 paralelos, y se usaron pocillos sin extracto periplásmico y sin antígenos como controles negativos. Los resultados (Tabla 9) se obtuvieron con clones de acuerdo con SEC ID N° 42, 43.

TABLA 9

antígeno	Absorbancia de enlace	Sin extracto periplásmico	Sin antígeno
Lisozima	A <sub>492/620nm</sub>	0,299	0,110
rhEPO	A <sub>405/620nm</sub>	0,258	0,095

### Ejemplo 16

*Los dominios CH3 de diseño proporcionan biespecificidad en un formato tipo Fab*

En la construcción empleada en este ejemplo, tanto la cadena VL como la cadena VH de un anticuerpo se fusionan en un dominio CH3 de diseño.

## ES 2 321 861 T3

La región VL y VH del anticuerpo monoclonal humano 3D6. (He XM, et Pro Natl Acad Sci USA. 1992 89:7154-8.; Kohl J. *et al.* Ann N Y Acad Sci. 1991 646:106-14.; Felgenlauer M, *et al.* Nucleic Acids Res. 1990 18:4927), que reconocen un epítipo en gp41 de HIV-1 se utilizaron como socio de fusión para el clon C24 del dominio CH3 diseñado que se une específicamente a lisozima de huevo de gallina.

A fin de promover la formación del dímero VL-CH3/VH-CH3 mediante un enlace disulfuro, se añadieron los residuos Ser-Cys al extremo C de las secuencia C24.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivamente de las dos cadenas 3D6VL-C24 y 3D6VH-C24 se indican en SEC ID N° 47, 46 y SEC ID N° 45, 44, respectivamente.

Se diseñaron cebadores que permiten la amplificación de las regiones de codificación, introduciendo al mismo tiempo sitios de restricción (mutaciones silenciosas) que se emplearon para reunir las regiones de codificación. Para la expresión de los genes, se escogió el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Se clonaron construcciones en vectores de expresión apropiados de *Pichia pastoris*: 3D6VL-C24 se clonó en pPIC9K (nombre final: pPIC9K3LC) y 3D6VH-C24 (nombre final: pPICZ3HC) se clonó en pPICZalphaA. La construcción pPICZ3HC se linearizó con Bgl II, se transformó en *Pichia pastoris* GS115 y los transformantes se seleccionaron en medio sólido que contiene zeocina. Uno de los transformantes se usó posteriormente como célula huésped para la construcción linearizada pPIC9K3LC. Después se seleccionaron dobles transformantes en medio RDB.

Los clones se inocularon en 30 ml de medio YPG y se desarrollaron hasta  $OD_{600}=10$ , y después se indujeron por adición de metanol al 1% en medio BMMY. La inducción se continuó durante 36 horas a 16°C. Se retiraron los sobrenadantes por centrifugación y después se concentraron aproximadamente 10 veces. La presencia de la proteína recombinante se confirmó por transferencia Western con un anticuerpo anti-His (4) y se estimó una concentración de aproximadamente 50-100  $\mu\text{g/l}$  de cultivo inicial.

Las primeras pruebas funcionales se realizaron con sobrenadante 10x concentrado. Primero, los pocillos de las placas Maxisorp se revistieron con 20  $\mu\text{g/ml}$  de lisozima de huevo de gallina en PBS o 20  $\mu\text{g/ml}$  de epítipo del anticuerpo 3D6 en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, respectivamente, durante 1 h a 37°C. El epítipo 3D6 se utilizó en forma de una proteína de fusión GST producida por recombinación. Después de bloquear con BSA-PBS al 1%, se dejó que los sobrenadantes concentrados se unieran durante la noche en el mismo agente bloqueante. El enlace se reveló con un anticuerpo anti-His(4) y anticuerpo cabra anti-ratón, conjugado con HRP, y se visualizó como reacción de color resultante de la conversión OPD a 492/620 nm (Tabla 10).

TABLA 10

antígeno	Señal ELISA (A <sub>492/620</sub> )	Fondo (sin antígeno)	Fondo (sin sobrenadante)
Lisozima	0,198	0,003	0,043
Epítipo 3D6	0,061	0,001	0,007

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de preparación de una biblioteca que comprende una inmunoglobulina que tiene una región bucle estructural modificada, en donde la inmunoglobulina modificada se une a un epítipo de un antígeno y la región bucle estructural sin modificar no se une significativamente a dicho epítipo, el cual método comprende los pasos de:
- 10 - provisión de un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende por lo menos una región bucle estructural,
  - modificación de por lo menos un radical nucleótido de dicha región bucle estructural mediante un método de mutagénesis,
  - 15 - preparación de una biblioteca de inmunoglobulinas modificadas, y
  - determinación dentro de dicha biblioteca de un número de inmunoglobulinas que se unen a dicho epítipo.
- 20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde más de uno de los bucles estructurales están modificados para proporcionar un nuevo sitio de unión a dicho epítipo.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha modificación tiene como resultado mutaciones en por lo menos 6 posiciones de aminoácido en por lo menos una región bucle estructural.
- 25 4. Biblioteca que se obtiene mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Biblioteca de acuerdo con la reivindicación 4, la cual comprende por lo menos 10 diferentes inmunoglobulinas modificadas.
- 30 6. Biblioteca de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, la cual comprende por lo menos 10 diferentes inmunoglobulinas modificadas, que se unen a dicho epítipo.
7. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, **caracterizada** porque, la inmunoglobulina comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera de una inmunoglobulina o una parte de la misma.
- 35 8. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizada** porque, la región bucle estructural modificada es un dominio constante cualquiera y/o por lo menos un dominio variable de una inmunoglobulina.
- 40 9. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde dicha inmunoglobulina comprende por lo menos un dominio individual, una parte del mismo, incluyendo un minidominio que consta de dos cadenas beta y un dominio de inmunoglobulina conectado mediante un bucle estructural, un dominio individual variable o una cadena individual Fv.
- 45 10. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, **caracterizada** porque, la región bucle estructural modificada es de un dominio constante de inmunoglobulina, seleccionado del grupo formado por CH1, CH2, CH3, CH4, CL.
- 50 11. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 al 10, **caracterizada** porque, la inmunoglobulina contiene un dominio de inmunoglobulina constante, seleccionado del grupo formado por CH1, CH2, CH3, CH4, CL, y combinaciones de los mismos, incluyendo un fragmento Fab, un fragmento Fc, ó la inmunoglobulina de longitud completa.
- 55 12. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, **caracterizada** porque, la región bucle estructural modificada es una cualquiera de Ig-kappa ó Ig-lambda.
13. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en donde la inmunoglobulina contiene un dominio variable con una región bucle estructural modificada.
- 60 14. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en donde dicha inmunoglobulina modificada se une por lo menos a un FcRn, ó a moléculas efectoras.
15. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, la cual es una biblioteca de proteínas de inmunoglobulinas.
- 65 16. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15, en donde dicha biblioteca se muestra sobre la superficie de un anfitrión.

## ES 2 321 861 T3

17. Biblioteca de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicho anfitrión, se selecciona del grupo formado por células de mamíferos, células bacterianas, células de insectos o células de levaduras.

5 18. Biblioteca de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 17, en donde dicha biblioteca se muestra mediante fagos o virus.

19. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 18, la cual es una biblioteca de ácidos nucleicos de inmunoglobulinas.

10 20. Biblioteca de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 19, en donde dicha biblioteca se muestra mediante fagémidos.

15 21. Biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 20, en donde dicha biblioteca se muestra mediante tecnologías de presentación *in vitro*.

22. Método para unir específicamente y/o detectar una molécula, el cual método comprende el paso de puesta en contacto de una biblioteca de inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 21, con una muestra de ensayo que contiene dicha molécula.

20 23. Método de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende además el paso de detección de la potencial formación de un complejo de inmunoglobulina específica/molécula.

25 24. Método para el aislamiento específico de una inmunoglobulina modificada que se une a una molécula, el cual método comprende los pasos de:

(a) puesta en contacto de una biblioteca de inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 21, con una muestra que contiene dicha molécula, y

30 (b) separación del complejo inmunoglobulina modificada específica/molécula, formado.

25 25. Método de acuerdo con la reivindicación 24, el cual comprende además, el paso de aislamiento de la inmunoglobulina modificada de dicho complejo.

35 26. Kit de socios de unión, el cual contiene:

(a) una biblioteca de inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 21, y

40 (b) una molécula de unión que contiene un epítipo de un antígeno.

27. Empleo de una molécula de unión de un kit, de acuerdo con la reivindicación 26, para seleccionar una inmunoglobulina modificada a partir de una biblioteca, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 21.

45

50

55

60

65

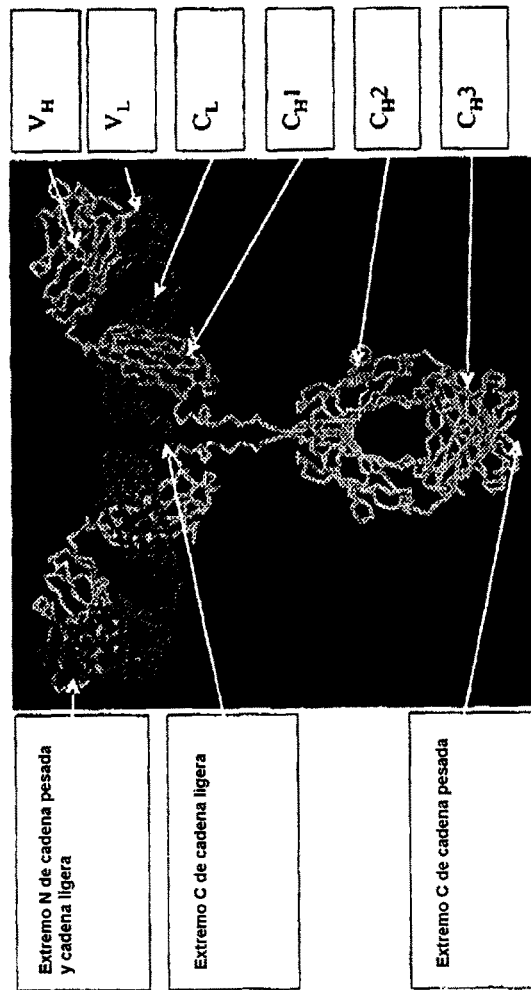


Fig. 1a

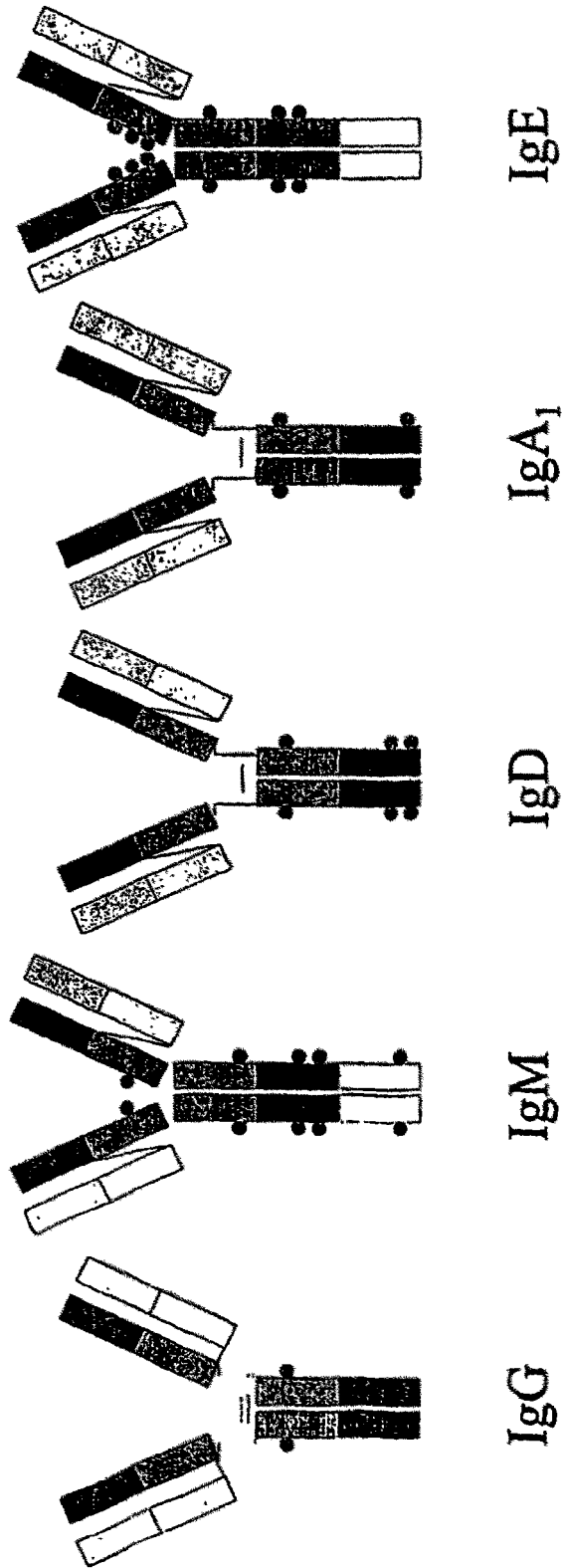


Fig. 1b

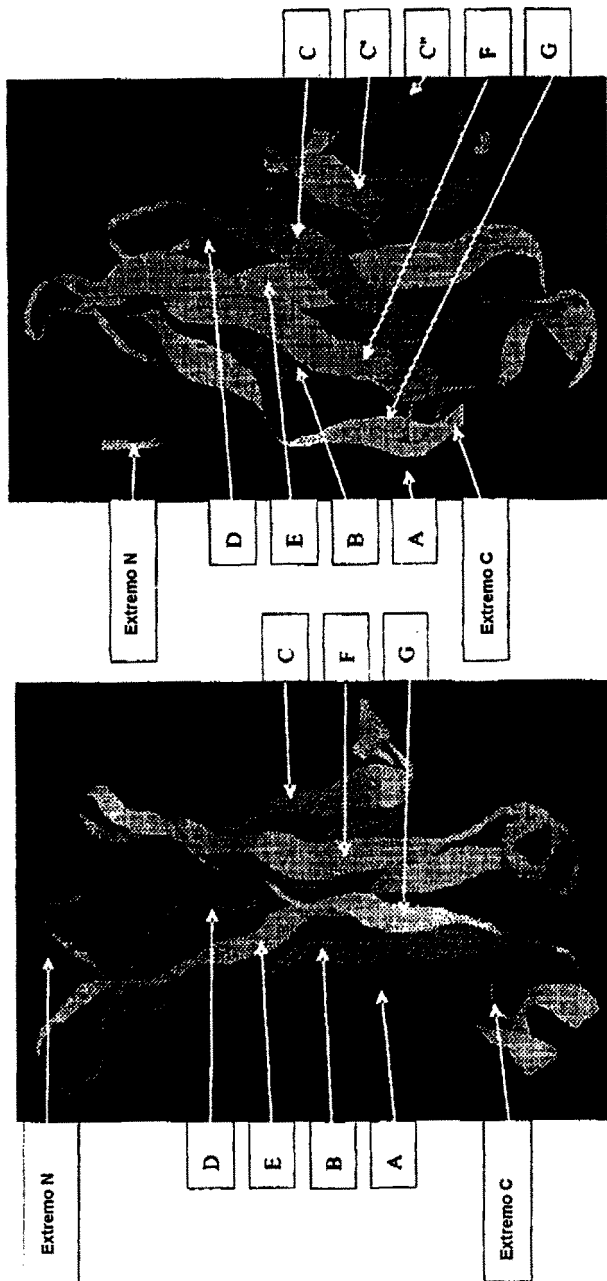


Fig. 2

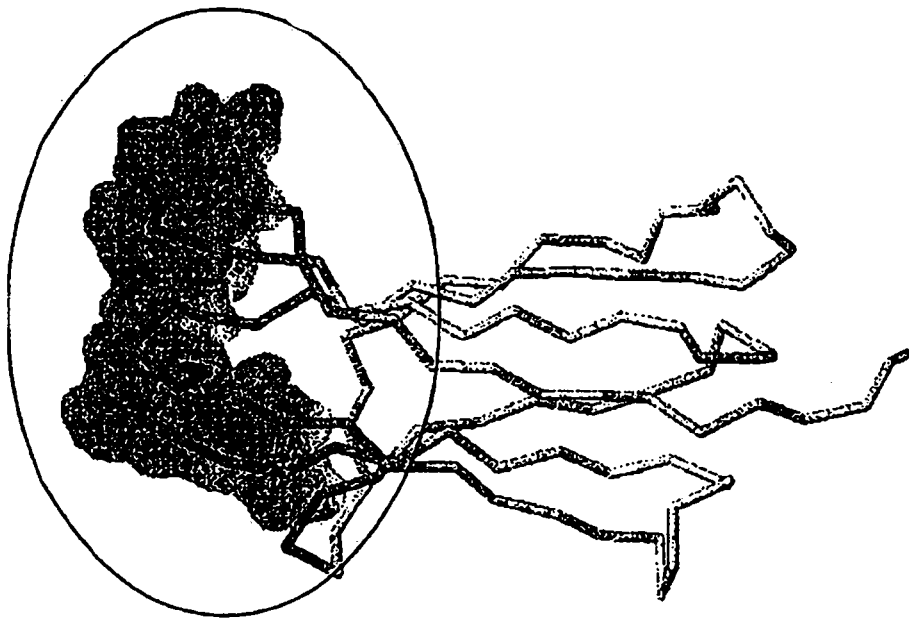


Fig. 3

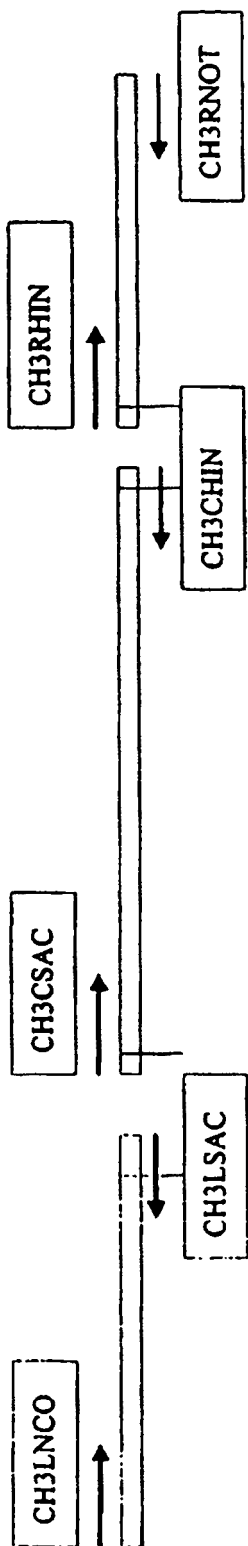


Fig. 4

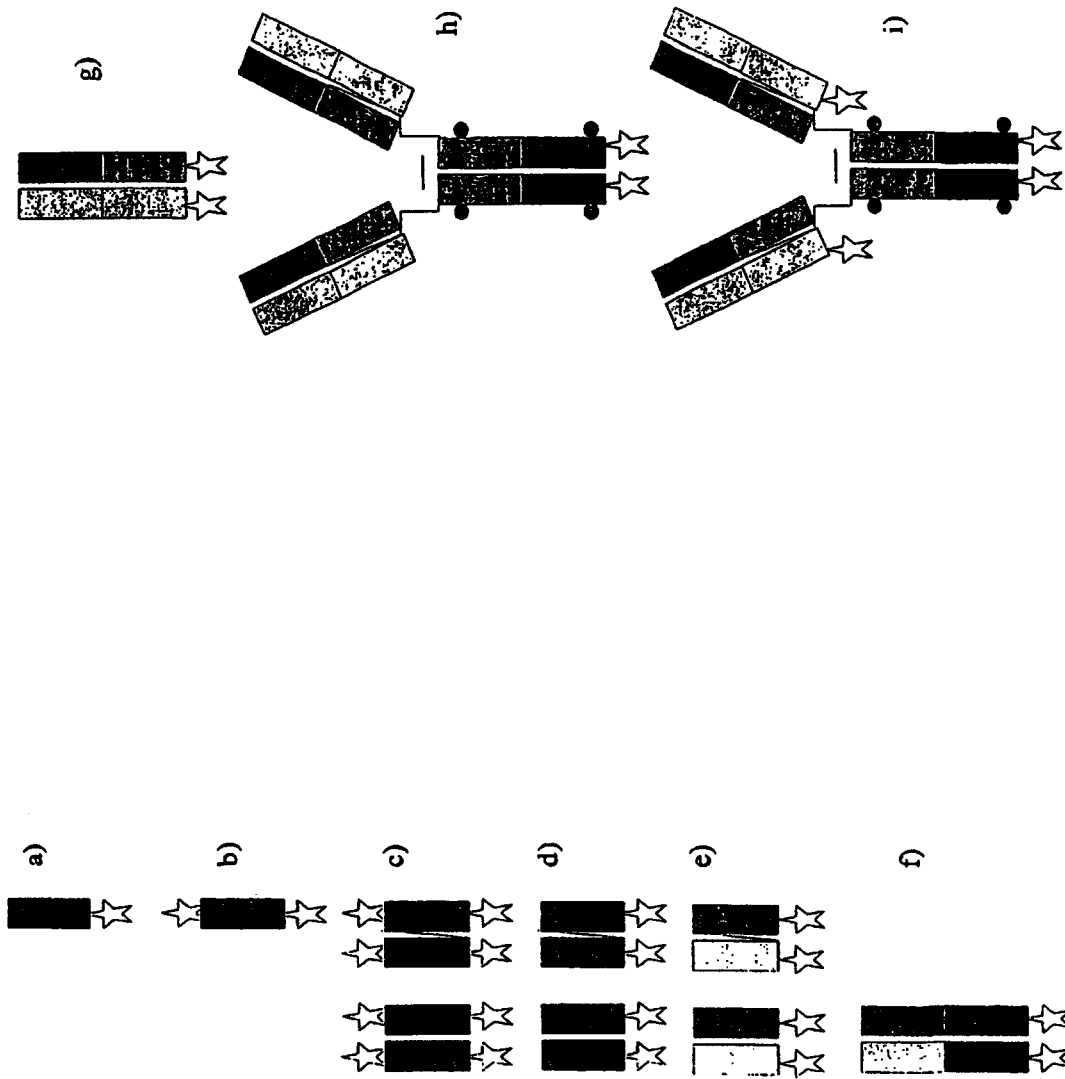


Fig. 5

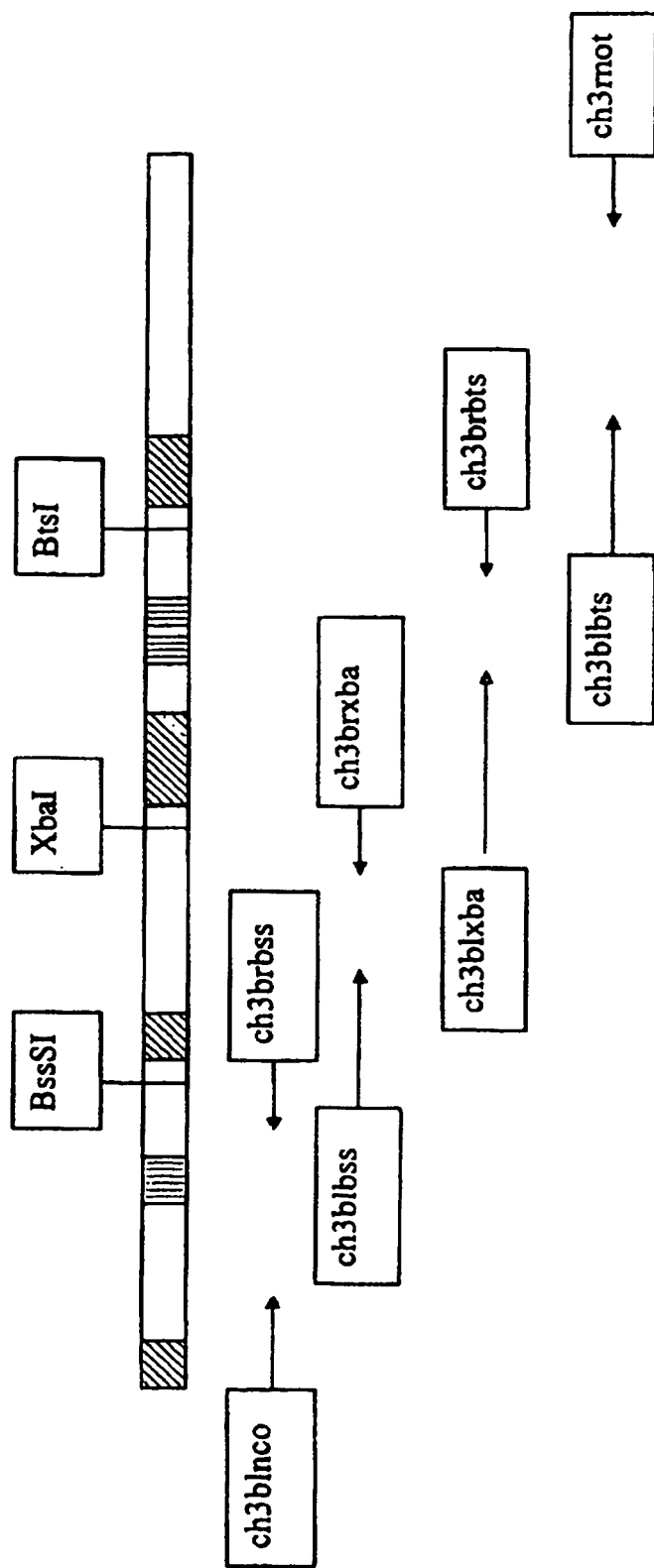


Fig. 6

```

+3   R E P Q V Y T L P P S R D E L           Q V S L T C L V K G F
1   NNSCGAGAAC CACAGGTGA CACCCTGCC CCATCCCGT ACAGCTC NN SNNNSCAA GTCAGCCTGA CCTGCCCTCGT GAAGGCTTC NNSNNSNNSN
   NNSGCTCTTG GTGTCCACAT GTGGACGGG GGTAGGGCAC TGCTCGAGNN SNNNSNGTT CAGTCGGACT GGACGGAGCA CTTTCCGAAG NNSNNSNNSN

+3   I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G           S F
101 NSATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTTCIAGA CTCCCGACGGC NNSNNSNNSN NNNSTCCTT
   NSTAGCGGCA CCTCACCCCTC TCGTTACCCG TCGGCCCTCTT GTTGATGTTT TGGTGGGAG GCAAAGATCT GAGGCTGCCG NNSNNSNNSN NSNNSAGGAA

+3   F L Y S K L T V           R W           G N V F S C S V M           L H N H Y T
201 CTTCTCTAC AGCAAGCTTA CCGTGNNSNN SNN SAGGTGG NNSNNSGGGA ACGTCTCTC ATGCAGTGTG ATGNNSNNSN NSCTGCACAA CCACTACACA
   GAAGGAGATG TCGTTCCGAT GGCACNNSNN SNNSTCCACC NNSNNSCCCT TCGAGAAGAG TAGTCCACAC TACNNSNNSN NSGACCTGTT GGTGATGTCT

+3   Q K S L S L S P G K A A A
301 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA GGGCCGCA
   GTCTTCTCGG AGAGGGACAG AGGCCCATTT CGCCGGCGT

```

Fig. 7

## ES 2 321 861 T3

Fig 8.

SEC ID N° 1: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del anticuerpo loqo.pdb

```
1 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
31 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DG
61 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
91 HNHYTQKSLSLSPGKAAA
```

SEC ID N° 2: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de diseño del Ejemplo 1

```
1 CCATGGCCCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGGAT GAGCTCNNSN
NSNNSCAGGT
71 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCBAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG
CAATGGGCAG
141 CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCITCCTC
TACAGCAAGC
211 TTACCGTGNN SNNSNSAGG TGGNNSNSG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
AGGCTCTGCA
281 CAACCACTAC ACACAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAAGCGGCCG CA
```

SEC ID N° 3: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de diseño del Ejemplo 1

```
1 MAPREPVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
61 DGSFFLYSKLTVXXXRWXXGNV FSCSVMHE
91 ALHNHHTQKSLSLSPGKAAA
```

SEC ID N° 4: Cebador PCR de CH3LNCO

```
ctgccatgg cccccgaga accacaggtg tac
```

SEC ID N° 5: Cebador PCR de CH3LSAC

```
agtcgagctc gtcacgggat gggggcaggg
```

SEC ID N° 6: Cebador PCR de CH3CSAC

ES 2 321 861 T3

**gtacgagctc nnsnnsnsc aagtcagcct gacclgctg g**

SEC ID N° 7: Cebador PCR de CH3RHIN

**tgccaagctt gctgtagagg aagaaggagc cg**

SEC ID N° 8: Cebador PCR de CH3RHIN

**tgccaagctt accgtgnnsn nsnnsaggtg gnnsnsggg aacgtctct catgctccg**

SEC ID N° 9: Cebador PCR de CH3RNOT

**agttgcgcc gcttaccgg gagacagga gag**

SEC ID N° 10: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3+3 de diseño

**1 MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK  
31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS  
61 DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXRWXXGNVFSQSV  
91 MHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA**

SEC ID N° 11: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3+3 de diseño

**1 ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgtag gagctcnnsn  
61 nsnnscaagt cagcctgacc tgctgtca aaggctcta tccagcgac atgcccgtgg  
121 agtgggagag caalgggcag ccgagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact  
181 ccgacggctc cttctcctc tacagcaagc ttaccgtggn snsnnsnns nsnnsaggt  
241 gnnsnsgg gaacgtctc tcatgctccg tgatgatga ggctctgcac aaccactaca  
301 cacagaagag cctctccctg tctccggta aagcggccgc a**

SEC ID N° 12: Cebador PCR CH3RHIN3

**1 tgccaagctt accgtgnnsn nsnnsnnsn snnsaggtgg nsnnsggga acgtctctc  
61 atgctccg**

## ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 13: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3+5 de diseño

**1 MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK**  
**31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS**  
**61 DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXXRWXXGNVFSC**  
**91 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA**

SEC ID N° 14: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3+5 de diseño

**1 ccatggcccc cggagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgtag gagctcnnsn**  
**61 nsnnscaagi cagcctgacc tgccctgtca aaggcttca kccagcgcac atcgccgtgg**  
**121 agtgggagag caatgggcag cggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact**  
**181 cggacggctc ctctctctc tacagcaagc ttaccgtggn snsnnsnns nsnnsnnsn**  
**241 nsaggtggnn snnsgggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc**  
**301 actacacaca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaagc ggccgca**

SEC ID N° 15: Cebador PCR CH3RHIN5

**1 tgccaagctt accgtgnnsn nsnnsnnsn snsnnsnns aggtgggnnsn nsgggaacgt**  
**61 ctctcatgc tccg**

SEC ID N° 16: Secuencia de aminoácidos del clon D07 anti-EpCAM

**PREPQVYTLPPSRDEL****GW****QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS****DGSFFLYSKL**  
**TV****PKRWCVS****VRW****PP****GNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEC ID N° 17: Secuencia de nucleótidos del clon D07 anti-EpCAM

**CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGGCTGGCCGCAAGTCA**  
**GCCTAACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG**  
**GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT**  
**ACAGCAAGCTTACCGTGCCCAAGCGGTGGTGCCTGAGCGTCAGGTGGCCCCCGGGAACGTCTT**  
**CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC**  
**CGGGTAAA**

## ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 18: Secuencia de aminoácidos del clon C67 anti-EpCAM

**PREPQVYTLPPSRDELSVSVQVSPCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL  
TVIPFCRMSFRWVWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEC ID N° 19: Secuencia de nucleótidos del clon C67 anti-EpCAM

**CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTCGGTGTCGCAAGTCA  
GCCCCGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCAGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGATCCCCTTCTGCAGGATGAGCCCCAGGTGGTGGATCGGGAACGTCTTC  
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC  
GGGTAAA**

SEC ID N° 20: Secuencia de aminoácidos del clon D64C3 anti-fluoresceína

**PREPQVYTLPPSRDELEALQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
VRRNRWVWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEC ID N° 21: Secuencia de nucleótidos del clon D64C3 anti-fluoresceína

**CCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGAGGCGCTGCAAGTCA  
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGCGGGCAACAGGTGGTCTGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA**

SEC ID N° 22: Secuencia de aminoácidos del clon A68 anti-lisozima

**PREPQVYTLPPSRDELSVSVQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL  
TVKSRATRRWVWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKNLSLSPGK**

ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 23: Secuencia de nucleótidos del clon A68 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCCAGGGGAGCCAAGTCA  
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGAAGTCGCGCGCCACCCGGAGGTGGGTGGTGGGGAACGTCTTTTCTTG  
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAACCTCTCCCTGTCTCCGGGTA  
AA

SEC ID N° 24: Secuencia de aminoácidos del clon B23 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELAIGQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL  
VRSTRDNRWLVGNVFSVMSHEALHNHYTQKLSLSLSPG

SEC ID N° 25: Secuencia de nucleótidos del clon B23 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGCGATCGGCCAAGTCA  
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGCCTCGACGAGGGACAACAGGTGGCTGGTGGGGAACGTCTTCTCATG  
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA  
AA

SEC ID N° 26: Secuencia de aminoácidos del clon B40 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELSGAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL  
TWFRQEGGMRFVAGNVFSVMSHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 27: Secuencia de nucleótidos del clon B40 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCAGCGGGGCGCAAGTCA  
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGTGGTTCAGGCAGGAGGGCGGCATGAGGTGGTTCGCGGGGAACGTCTT  
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC  
CGGGTAAA

SEC ID N° 28: Secuencia de aminoácidos del clon C24 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYGKL  
TVPPRLKGWPRWGWGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 29: Secuencia de nucleótidos del clon C24 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCA  
GCCCGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
ACGGCAAGCTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCT  
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC  
CGGGTAAA

SEC ID N° 30: Secuencia de aminoácidos del clon D46 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELAYQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
VVAGRWTCGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 31: Secuencia de nucleótidos del clon D46 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCCTGGCGTACCAAGTCA  
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGGTGGCCGGCAGGTGGACGTGCGGGAACGTCTTCTCATGCTCCCGTGAT  
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 32: Secuencia de aminoácidos del clon D56 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELQVPQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL  
TVLKVYQARRWEVGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 26: Secuencia de nucleótidos del clon D56 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTGCGTCCCGCAAGTCA  
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCT  
  
ACAGCAAGCTTACCGTGGTGTCAAGGTCGTGCAGGCGCGCAGGTGGGAGGTGGGGAACGTCTT  
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC  
CGGGTAAA

SEC ID N° 34: Secuencia de aminoácidos del clon A23 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELQIAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL  
VLGRRWTLGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 34: Secuencia de nucleótidos del clon A23 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGACGAGCTCGGCATCGCGCAAGTCA  
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGTGGGCCGCGAGGTGGACCCTGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 36: Secuencia de aminoácidos del clon A23 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELGLAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLT  
VLGRRWLGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 37: Secuencia de nucleótidos del clon A23 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGGCATCGCGCAAGTCA  
GCTTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGTGGGCCGCGAGGTGGACCCTGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 38: Secuencia de aminoácidos del clon D2 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELLPCQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLT  
VECPRWLGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 39: Secuencia de nucleótidos del clon D2 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTTGCCCTGCCAAGTCAG  
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG  
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCCTCTA  
CAGCAAGCTTACCGTGTCTGCCCCAGGTGGCTGGGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC  
ATGAGGC1CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 40: Secuencia de aminoácidos del clon D68 anti-TLR9

**PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
VPCMRWYGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEC ID N° 41: Secuencia de nucleótidos del clon D68 anti-TLR9

**CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA  
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
ACAGCAAGCTTACCGTGCCCTGCATGAGGTGGTGGGGCGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA**

SEC ID N° 42: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 biespecífico, mutado en ambos lados, que se une a lisozima y a eritropoyetina, clon D72

**RREPQVYTLPPSRDELVLGQVSLACLVKGFVRLIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGRQLADSF  
LYSKLTVPRRLKGWPRWGWGNVFSCSVMFLALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEC ID N° 43: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 biespecífico, mutado en ambos lados, que se une a lisozima y a eritropoyetina, clon D72

**CGGCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCA  
GCCTGGCCTGCCTCGTGAAAGGCTTCGTGGTCCGGTTGATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG  
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTTCTAGACTCCGACGGCCGGCAGTTGGCG  
GACTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTTACCGTGCCCCCGGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGG  
GCTGGGGGAACGTCTTCTCATGCAGTGTGATGTTCTGGCGCTGCACAACCACTACACACAGAAG  
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA**

## ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 44: Secuencia de aminoácidos de la construcción tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y el clon C24 anti-lisozima (3D6-VH-C24)

**EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDSSTSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMALYYCVKGRDYYDSGGYFTVAFDIWGQGTMTVSSASTKGPQVYTLPPSRDELVGLQVSPSTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYGKLTVPPRLKGWPRWGWGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEC ID N° 45: Secuencia de nucleótidos de la construcción tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y el clon C24 anti-lisozima (3D6-VH-C24)

**GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTAATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATAAGTTGGGATAGTAGTAGTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAA GGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGCTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACATGGCCTTATATTACTGTGTAAGGAGCAGAGATTACTATGATAGTGGTGGTTATTTCACGGTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTGGGGCAAGTCAGCCCGCCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAGTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACGGCAAGCTTACCGTGCCCCCGCGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA**  
AA

## ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 46: Secuencia de aminoácidos de la construcción tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y el clon C24 anti-lisozima (3D6-VL-C24)

DIQMTQSPSTLSASVGDQVITICRASQSSIRWLAWYQKPKGKVPKLLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGT  
EFTLTISSLQPDFATYYCQQYNSYSFSGPGTKVDIKRTVAEPQVYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYGKLVPPRLKGWPRWGWNVFCFSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 47: Secuencia de aminoácidos de la construcción tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y el clon C24 anti-lisozima (3D6-VL-C24)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT  
TGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCC  
TAAGCTCCTGATCTATAAGGCATCTAGTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGG  
ATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTGCAACTTATTACTG  
CCAACAGTATAATAGTTATTCTTTGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGA  
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCAGCCCGACC  
TGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
AGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACGGCAAG  
CTTACCGTGCCCCCGGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGCTTCTCATGCT  
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA

SEC ID N° 48: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca CL

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXASVCLLN  
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLYXXXYE  
101 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGAAA

SEC ID N° 49: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CL

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC  
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT  
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT  
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT

ES 2 321 861 T3

201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA  
251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSNSTACGAG  
301 AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC  
351 CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGGCGGCCGCA

SEC ID N° 50: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca  
CL+3

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVCLLN  
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLLXXXXXX  
101 XYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEAA

SEC ID N° 51: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca  
CL+3

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCGGC  
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT  
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT  
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCT  
201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA  
251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSNNSNNS  
301 NNSTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
351 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGGCGGCCGCA

SEC ID N° 52: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca  
CL+5

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVCLLN  
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLLXXXXXX  
101 XXXYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEAA

ES 2 321 861 T3

SEC ID N° 53: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CL+5

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC  
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT  
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT  
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT  
  
201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA  
251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGTTGNNNSNNSNNSNNSNNS  
301 NNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS  
351 GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGCGGCCG  
401 CA

SEC ID N° 54: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca CH

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAASTKGPSVFPLAPSSXXXXXXXXXALGCL  
51 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPXXXXXX  
101 XTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSAAA

SEC ID N° 55: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CH

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC  
51 CCAGCCGGCCATGGCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG  
101 CACCCTCCTCCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSGCCCTGGGCTGCCTG  
151 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGGCGC  
201 CCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC  
251 TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCNNSNNSNNSNNSNNSNNS  
301 NNSACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA  
351 CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGCGGCCGCA