



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 566**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98949106 .3**

96 Fecha de presentación : **20.10.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1025218**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2000**

54 Título: **Colecciones de polipéptidos de anticuerpos humanos.**

30 Prioridad: **20.10.1997 GB 9722131**
13.11.1997 US 65428 P
21.11.1997 US 66729 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2009

73 Titular/es: **Domantis Limited**
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB

72 Inventor/es: **Tomlinson, Ian y**
Winter, Greg

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 321 566 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

Colecciones de polipéptidos de anticuerpos humanos.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para seleccionar repertorios de polipéptidos usando ligandos genéricos y diana. En particular, la invención describe un procedimiento para seleccionar repertorios de polipéptidos de anticuerpos con ligando genérico para aislar subconjuntos funcionales de los mismos.

Introducción

10 El dominio de unión de antígenos de un anticuerpo comprende dos regiones distintas: un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio variable de la cadena ligera (V_L : que puede ser o V_{κ} o V_{λ}). El sitio de unión de antígenos en sí está formado por seis bucles de polipéptidos: tres del dominio V_H (H1, H2 y H3) y tres del dominio V_L (L1, L2 y L3). Un repertorio primario diverso de genes V que codifican los dominios V_H y V_L se produce mediante
15 la reordenación combinatoria de segmentos de genes. El gen V_H se produce por recombinación de tres segmentos de genes, V_H , D y J_H . En los seres humanos, hay aproximadamente 51 segmentos V_H funcionales (Cook y Tomlinson (1995) *Immunol Today*, 16: 237), 25 segmentos D funcionales (Corbett y cols. (1997) *J. Mol. Biol.* 268: 69) y 6 segmentos J_H funcionales (Ravetch y cols. (1981) *Cell*, 27: 583), dependiendo del haplotipo. El segmento V_H codifica la región de la cadena polipeptídica que forma el primer y segundo bucles de unión de antígenos del dominio V_H (H1 y H2), mientras que los segmentos V_H , D y J_H se combinan formando el tercer bucle de unión de antígenos del dominio V_H (H3). El gen V_L se produce por recombinación de sólo dos segmentos génicos, V_L y J_L . En los seres humanos, hay aproximadamente 40 segmentos V_{κ} funcionales (Schäble y Zachau (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*; 374: 1001), 31 segmentos V_L funcionales (Williams y cols. (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220; Kawasaki y cols. (1997) *Genome Res.*, 7: 250), 5 segmentos J_{κ} funcionales (Hieter y cols. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257: 1516) y 4 segmentos funcionales (Vasicek y Leder (1990) *J. Exp. Med.*, 172: 609), dependiendo del haplotipo. El segmento V_L codifica la región de la cadena polipeptídica que forma el primer y segundo bucles de unión de antígenos del dominio V_L (L1 y L2), mientras que los segmentos V_L y J_L se combinan formando el tercer bucle de unión de antígenos del dominio V_L (L3). Se cree que los anticuerpos que se seleccionan de este repertorio primario son lo suficientemente diversos como para unirse a casi todos los antígenos con una afinidad al menos moderada. Los anticuerpos de afinidad elevada se producen mediante
20 “maduración por afinidad” de los genes reordenados, en los que se generan mutaciones puntuales y son seleccionados por el sistema inmunitario basándose en la unión mejorada.

El análisis de las estructuras y secuencias de anticuerpos ha demostrado que cinco de los seis bucles de unión de antígenos (H1, H2, L1, L2, L3) poseen un número limitado de conformaciones de sus cadenas principales o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901; Chothia y cols. (1989) *Nature*, 342: 877). Las conformaciones de las cadenas principales vienen determinadas por (i) la longitud del bucle de unión de antígenos, y (ii) restos particulares, o tipos de resto, en ciertas posiciones clave del bucle de unión de antígenos y de la estructura del anticuerpo. El análisis de las longitudes de los bucles y los restos clave nos ha permitido predecir las conformaciones de las cadenas principales de H1, H2, L1, L2 y L3 que codifican la mayoría de las secuencias de anticuerpos humanos
40 (Chothia y cols. (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 799; Tomlinson y cols. (1995) *EMBO J.*, 14: 4628; Williams y cols. (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en cuanto a la secuencia, longitud y estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de las cadenas principales para longitudes cortas de los bucles que dependen de la longitud y presencia de restos, o tipos de restos particulares, en posiciones claves del bucle y la estructura de los anticuerpos (Martin y cols. (1996) *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shirai y cols. (1996) *FEBS Letters*, 399: 1).

Un análisis similar de la diversidad de las cadenas laterales en las secuencias de anticuerpos humanos ha permitido separar el patrón de la diversidad de las secuencias del repertorio primario del creado por hipermutación somática. Se encontró que los dos patrones son complementarios: la diversidad en el repertorio primario se enfoca en el centro del sitio de unión de antígenos, mientras que la hipermutación somática extiende su diversidad a regiones de la periferia que están muy conservadas en el repertorio primario (Tomlinson y cols. (1996) *J. Mol. Biol.*, 256: 813; Ignatovich y cols. (1997) *J. Mol. Biol.* 268: 69). Esta complementariedad parece haber evolucionado como estrategia eficaz para buscar el espacio de las secuencias, dado el limitado número de linfocitos B disponibles para ser seleccionados en un momento dado. Así, los anticuerpos se seleccionan primero del repertorio primario basándose en la diversidad en el centro del sitio de unión. Después se deja que la hipermutación somática optimice los restos de la periferia sin alterar las interacciones favorables establecidas durante la respuesta primaria.
55

El reciente advenimiento de la tecnología de presentación en fagos (Smith (1985) *Science*, 228: 1315; Scott y Smith (1990) *Science*, 249: 386; McCafferty y cols. (1990) *Nature*, 348: 552) ha permitido la *in vitro* selección de anticuerpos humanos contra un amplio abanico de antígenos de colecciones de “fuente única”. Estas colecciones de fagos y anticuerpos pueden agruparse en dos categorías: colecciones naturales que usan genes V reordenados recogidos en células (Marks y cols. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Vaughan y cols. *Biotech.*, 14: 309) o colecciones sintéticas por las que se “reordena” el gen V de la línea germinal *in vitro* (Hoogenboom & Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Nissim y cols. (1994) *EMBO J.*, 13: 692; Griffiths y cols. (1994) *EMBO J.*, 13: 3245; De Kruif y cols. (1995) *J. Mol. Biol.*, 248: 97) o donde se incorporan CDR sintéticas en un único gen V reordenado (Barbas y cols. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457). Aunque las colecciones sintéticas ayudan a superar los sesgos inherentes del repertorio natural que puede limitar el tamaño eficaz de las colecciones de fagos construidas a partir de genes V reordenados, requieren el uso de cebadores de PCR degenerados largos que con frecuencia introducen deleciones de pares de bases
60

ES 2 321 566 T3

en los genes V ensamblados. Este alto grado de aleatorización puede conllevar también la creación de anticuerpos que son incapaces de plegarse correctamente y por lo tanto también son no funcionales. Además, los anticuerpos que se seleccionan de estas colecciones pueden expresarse deficientemente y, en muchos casos, contendrán mutaciones estructurales que pueden afectar a la capacidad inmunógena de los anticuerpos cuando se usan para el tratamiento en seres humanos.

Recientemente, en una extensión de la estrategia de colección sintética, se ha sugerido (documento WO97/08320, Morphosys) que las estructuras de los anticuerpos puede preoptimizarse sintetizando un conjunto de “genes maestro” que tengan secuencias estructurales de consenso e incorporan sustituciones de aminoácidos que se ha demostrado que mejoran el plegamiento y la expresión. Después se incorpora diversidad a las CDR usando oligonucleótidos. Dado que es deseable producir anticuerpos humanos artificiales que no sean reconocidos como exógenos por el sistema inmunitario humano, el uso de regiones estructurales de consenso que, en la mayoría de los casos, no se corresponden con ninguna región estructural natural es una desventaja de esta estrategia. Además, dado que es probable que la diversidad de las CDR también tenga efecto sobre el plegamiento y/o expresión, es preferible optimizar el plegamiento y/o expresión (y eliminar cualesquiera cambios de marco o codones de terminación) una vez el gen V ha sido ensamblado completamente. Con este fin, sería deseable tener un sistema de selección que pudiera eliminar los miembros no funcionales o deficientemente plegados/expresados de la colección antes de realizar la selección con el antígeno diana.

La publicación Chemical Abstracts 128 (20), 1998, n.º 242750 describe el aislamiento de anticuerpos contra ADN polirreactivos usando una colección de péptidos aleatoria presentada en el bacteriófago M13. La publicación Chemical Abstracts 128(20), 1998, página 242750 describe el tamizado de colecciones combinatorias humanas que comprenden CDR3 como centro de la diversidad de la colección. Dicha colección se usó para la selección de Fabs contra derivados de organofosfonato. La publicación Immunotechnology 2 (1996), 169-179 se titula “Affinity improvement of single-antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding”. Este estudio se diseñó para evaluar cómo los cambios en los aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 alteraban la afinidad de dominios V_H de anticuerpo único presentados en una colección de presentación en fagos.

Un problema adicional con las colecciones de la técnica anterior es que, debido a que la conformación de las cadenas principales es heterogénea, es difícil conseguir modelos tridimensionales debido a que puede no disponerse de datos cristalográficos de alta resolución adecuados. Este es un problema particular para la región H3, en la que la mayoría de los anticuerpos derivados de colecciones de anticuerpos naturales o sintéticas tienen una longitud media o bucles largos y por lo tanto no pueden obtenerse los modelos.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una colección indiferenciada de polipéptidos de anticuerpos humanos, en la que todos los miembros funcionales comprenden un dominio V_H que comprende un bucle hipervariable que tiene la estructura canónica del bucle hipervariable H1 codificada por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana, en la que dicho bucle se diversifica cambiando dicho bucle en una o más posiciones que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33 y H35.

La invención proporciona un procedimiento por el que un repertorio de polipéptidos se preselecciona, de acuerdo con la funcionalidad según se determina por la capacidad de unirse al ligando genérico, y el subconjunto de polipéptidos obtenido como resultado de la preselección se emplea después para tandas de selección posteriores de acuerdo con la capacidad de unirse al ligando diana. Aunque, en una realización preferida, el repertorio se selecciona primero con el ligando genérico, será obvio para un experto en la técnica que el repertorio puede ponerse en contacto con los ligandos en orden inverso, es decir con el ligando diana antes que con el ligando genérico.

La invención permite a la persona experta en la técnica eliminar, de un repertorio de polipéptidos elegido, aquellos polipéptidos que son no funcionales, por ejemplo como resultado de la introducción de mutaciones de marco de lectura, codones de terminación, mutantes de plegamiento o mutantes de expresión que serían o son incapaces de unirse sustancialmente a ningún ligando diana. Dichos mutantes no funcionales se generan mediante los procedimientos de aleatorización y variación normales que se emplean en la construcción de repertorios de polipéptidos. Al mismo tiempo, la invención permite a la persona experta en la técnica enriquecer un repertorio de polipéptidos elegido para los polipéptidos que son funcionales, bien plegados y de alta expresión.

Preferiblemente, se obtienen dos o más subconjuntos de polipéptidos a partir de un repertorio mediante el procedimiento de la invención, por ejemplo, pretamizando el repertorio con dos o más ligandos genéricos, o poniendo en contacto el repertorio con el ligando genérico(s) en condiciones diferentes. De forma ventajosa, los subconjuntos de polipéptidos así obtenidos se combinan formando un repertorio de polipéptidos adicional, que puede tamizarse adicionalmente poniendo en contacto con ligandos diana y/o genéricos.

Preferiblemente, la colección de acuerdo con la invención comprende polipéptidos de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tales como polipéptidos de anticuerpos o polipéptidos de receptores de linfocitos T. De forma ventajosa, la colección puede comprender dominios de inmunoglobulinas individuales, tales como los dominios V_H o V_L de anticuerpos, o los dominios V_β o V_α de receptores de linfocitos T. En una realización preferida, por lo tanto, pueden pretamizarse los repertorios, por ejemplo, de polipéptidos V_H y V_L individualmente usando un ligando genérico y después combinarse para producir un repertorio funcional que comprende ambos polipéptidos V_H y V_L . Dicho repertorio puede tamizarse después con un ligando diana para aislar los polipéptidos que comprenden ambos dominios V_H y V_L y que tienen la especificidad de unión deseada.

ES 2 321 566 T3

En una realización ventajosa, el ligando genérico que se selecciona para usar con repertorios de inmunoglobulinas es un superantígeno. Los superantígenos son capaces de unirse a moléculas de inmunoglobulinas funcionales, o a subconjuntos de ellas que comprenden conformaciones particulares de las cadenas principales, independientemente de la especificidad por un ligando diana. De forma alternativa, los ligandos genéricos pueden seleccionarse a partir de cualquier ligando capaz de unirse a la estructura general de los polipéptidos que conforman cualquier repertorio dado, tal como los anticuerpos en sí, matrices de iones metálicos, compuestos orgánicos que incluyen proteínas o péptidos, y similares.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una colección en la que los miembros funcionales tienen sitios de unión tanto para ligandos genéricos como diana. Las colecciones pueden diseñarse específicamente con este fin, por ejemplo construyendo colecciones de anticuerpos que tienen una conformación de las cadenas principales que es reconocida por un superantígeno dado, o construyendo una colección en la que sustancialmente todos los miembros potencialmente funcionales poseen una estructura reconocible por un ligando de anticuerpo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para detectar, inmovilizar, purificar o inmunoprecipitar uno o más miembros de un repertorio de polipéptidos previamente seleccionado de acuerdo con la invención, que comprende la unión de los miembros al ligando genérico.

En un aspecto adicional la invención proporciona un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos indiferenciados, comprendiendo el procedimiento:

a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos constituidos por ácidos nucleicos que cada uno codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_H , en el que cada dominio V_H comprende la estructura canónica del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana,

b) introducir diversidad en los ácidos nucleicos comprendidos por dicha pluralidad proporcionando diversidad a uno o más restos aminoacídicos que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33 y H35 de una pluralidad de dichos dominios V_H ; y

c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de ácidos nucleicos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_H diversificados, teniendo los dominios V_H diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.

Todavía en un aspecto adicional la presente invención proporciona un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos, comprendiendo el procedimiento:

a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos constituidos por ácidos nucleicos que cada uno codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_L , en el que cada dominio V_L comprende la estructura canónica del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana,

b) introducir diversidad en los ácidos nucleicos comprendidos por dicha pluralidad proporcionando diversidad a uno o más restos aminoacídicos en una o más CDR de una pluralidad de dichos dominios V_L ; y

c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de ácidos nucleicos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_L diversificados, teniendo los dominios V_L diversificados la estructura canónica del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.

Todavía en un aspecto adicional la invención proporciona un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos indiferenciados, comprendiendo el procedimiento:

a) proporcionar una única secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_H , en el que el dominio V_H comprende la estructura canónica del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana,

b) amplificar e introducir diversidad en la secuencia de nucleótidos en uno o más restos aminoacídicos que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33 y H35, produciendo así una pluralidad de secuencias de nucleótidos diversas que codifican dominios V_H ; y

c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de secuencias de nucleótidos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_H diversificados, teniendo los dominios V_H diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.

En un aspecto adicional más la invención proporciona un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos indiferenciados, comprendiendo el procedimiento:

a) proporcionar una única secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_L , en el que el dominio V_L comprende las estructuras canónicas del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana,

5 b) amplificar e introducir diversidad en la secuencia de nucleótidos en uno o más restos aminoacídicos en una o más CDR de dicho dominio V_L ; produciendo así una pluralidad de secuencias de nucleótidos diversas que codifican dominios V_L ; y

10 c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de secuencias de nucleótidos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_L diversificados, teniendo los dominios V_L diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.

15 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Gráfica de barras que indica las posiciones en las regiones V_H y V_K del repertorio de anticuerpos humanos que muestran una extensa diversidad natural y forman contactos con los antígenos (véase Tomlinson y cols. (1996) J. Mol. Biol. 256: 813). La H3 y el final de L3 no se muestran en esta representación aunque también son muy diversas y forman contactos con los antígenos. Aunque la diversidad de las secuencias se ha caracterizado ampliamente en los genes lambda humanos (véase Ignatovich y cols. (1997) J. Mol. Biol. 268: 69) actualmente existen muy pocos datos sobre los contactos con los antígenos para estructuras lambda tridimensionales.

20 Figura 2: Secuencia del scFv que forma la base de una colección de acuerdo con la invención. Actualmente hay dos versiones de la colección: una colección “primaria” en la que se varían 18 y una colección “somática” en la que se varían 12 posiciones. Se indican las regiones de seis bucles H1, H2, H3, L1, L2 y L3. Regiones de CDR tal y como las define Kabat (Rabat y cols. (1991). Las secuencias de proteínas de interés inmunológico, U.S. Department of Health and Human Services) están subrayadas.

30 Figura 3: análisis de la funcionalidad en una colección de acuerdo con la invención antes y después de seleccionar con los ligandos genéricos Proteína A y Proteína L. Aquí, la Proteína L está recubriendo una placa de ELISA, los sobrenadantes con scFv se unen a ella y la detección de la unión a scFv es con Proteína A-HRP. Por lo tanto, sólo aquellos scFv con capacidad de unirse tanto a Proteína A y a Proteína L dan una señal en el ELISA.

35 Figura 4: Secuencias de clones que se seleccionan a partir de colecciones de acuerdo con la invención, después de tamizar con ubiquitina bovina, BIP de rata, histona bovina, MP-BSA, FITC-BSA, leptina humana, tiroglobulina humana, BSA, ovolisozima de gallina, IgG murina e IgG humana. Los subrayados en las secuencias indican las posiciones que se variaron en las colecciones respectivas.

40 Figura 5: 5a: Comparación de la concentración de scFv producida por las colecciones de DVT “primarias” seleccionadas y no seleccionadas en células huésped. 5b: Curva de patrones de ELISA determinada a partir de patrones conocidos.

45 Figura 6: Transferencia Western blot de fago a partir de colecciones de DVT “primarias” seleccionadas y no seleccionadas, sondadas con un anticuerpo contra pIII de fago para determinar el porcentaje de fagos que portan scFv.

Descripción detallada de la invención

50 Definiciones

Repertorio un repertorio es una población de diversas variantes, por ejemplo variantes de ácidos nucleicos que difieren en su secuencia de variantes de nucleótidos o polipéptido que difieren en la secuencia de aminoácidos. Una colección de acuerdo con la invención englobará un repertorio de polipéptidos o ácidos nucleicos. De acuerdo con la presente invención, un repertorio de polipéptidos se diseña para que posea un sitio de unión para un ligando genérico y un sitio de unión para un ligando diana. Los sitios de unión pueden superponerse, o estar localizados en la misma región de la molécula, pero sus especificidades diferirán.

60 *Organismo* Tal como se usa en el presente documento, el término “organismo” se refiere a todas las formas de vida celulares, tales como procariontes y eucariontes, así como entidades que contienen ácido nucleico no celulares, tales como bacteriófagos y virus.

65 *Funcional* Tal como se usa en el presente documento, el término “funcional” se refiere a un polipéptido que posee o la actividad biológica nativa de las proteínas producidas naturalmente de su tipo, o cualquier actividad específica que se desee, por ejemplo determinada por su capacidad de unirse a moléculas ligando, tal como se define a continuación. Los ejemplos de polipéptidos “funcionales” incluyen un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno a través de un sitio de unión de antígenos, una molécula receptora (por ejemplo a linfocitos T receptores) que se une a su ligando característico y una enzima que se une a su sustrato. Para que un polipéptido se clasifique como funcional de

acuerdo con la invención, se supone que primero debe estar procesado y plegado de forma adecuada de forma que mantenga su integridad estructural global, según se determina por su capacidad de unirse al ligando genérico, que también se define más adelante.

5 Para evitar dudas, la funcionalidad no es equivalente a la capacidad de unirse al ligando diana. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal contra CEA funcional no será capaz de unirse específicamente a ligandos diana tales como LPS bacteriano. Sin embargo, dado que es capaz de unirse a un ligando diana (es decir sería capaz de unirse a CEA si CEA fuera el ligando diana) se clasifica como molécula de anticuerpo “funcional” y puede seleccionarse porque se une a un ligando genérico, tal como se define más adelante. Habitualmente, las moléculas de anticuerpos no funcionales
10 serán incapaces de unirse a cualquier ligando diana.

Ligando genérico Un ligando genérico es un ligando que se une a una proporción sustancial de miembros funcionales de un repertorio dado. De ese modo, el mismo ligando genérico puede unirse a muchos miembros del repertorio independientemente de sus especificidades por ligandos diana (véase más adelante). En general, la presencia de sitios
15 de unión de ligandos genéricos funcionales indica que el miembro del repertorio se expresa y pliega de forma correcta. De ese modo, la unión del ligando genérico a su sitio de unión proporciona un procedimiento para preseleccionar polipéptidos funcionales de un repertorio de polipéptidos.

Ligando diana El ligando diana es un ligando por el que debe identificarse un miembro o miembros específicos del repertorio que se une a él. Cuando los miembros del repertorio son moléculas de anticuerpos, el ligando diana puede ser un antígeno y cuando los miembros del repertorio son enzimas, el ligando diana puede ser un sustrato. La unión al ligando diana depende tanto de que el miembro del repertorio sea funcional, como se describe anteriormente en
20 ligando genérico, y de la especificidad precisa del sitio de unión por el ligando diana.

Subconjunto El subconjunto es una parte del repertorio. En los términos de la presente invención, a menudo se da el caso de que sólo un subconjunto del repertorio es funcional y por lo tanto posee un sitio de unión de ligando genérico funcional. Además, también es posible que únicamente una fracción de los miembros funcionales de un repertorio (aunque todavía significativamente más de los que se unirían a un ligando diana dado) se unan al ligando genérico. Estos subconjuntos pueden seleccionarse de acuerdo con la invención.
25

Los subconjuntos de una colección pueden combinarse o mezclarse produciendo repertorios novedosos que se han preseleccionado de acuerdo con los criterios deseados. Los repertorios combinados o mezclados pueden ser mezclas simples de los miembros polipeptídicos preseleccionados por su unión al ligando genérico, o pueden manipularse para combinar dos subconjuntos de polipéptidos. Por ejemplo, los polipéptidos V_H y V_L pueden pretamizarse individualmente, y posteriormente combinarse a nivel genético en vectores únicos de tal forma que se expresen como dímeros V_H - V_L combinados, tales como scFv.
30
35

Colección El término colección o biblioteca, se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos. La colección está compuesta por miembros, que tienen una única secuencia de polipéptidos o ácidos nucleicos. En esta acepción, “colección” es sinónimo de “repertorio”. Las diferencias entre las secuencias de los miembros de la colección son responsables de la diversidad presente en la colección. La colección puede tener forma de una simple mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo células de bacterias, virus, animales o plantas y similares, transformadas con una colección de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene sólo un miembro de la colección. De forma ventajosa, los ácidos nucleicos se incorporan a vectores de expresión, para permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una colección puede tener forma de una población de organismos huésped, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un único miembro de la colección en forma de ácido nucleico que puede expresarse para que produzca su correspondiente miembro polipeptídico. Así, la población de organismos diana tiene potencial de codificar un gran repertorio de variantes polipeptídicas genéticamente diversas.
40
45
50

Superfamilia de inmunoglobulinas Esto se refiere a una familia de polipéptidos que mantienen la característica de plegamiento de las moléculas de inmunoglobulina (anticuerpo), que contienen dos láminas β y, habitualmente, un enlace disulfuro conservado. Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas están implicados en muchos aspectos de interacciones celulares y no celulares *in vivo*, que incluyen papeles muy extendidos en el sistema inmunitario (por ejemplo, anticuerpos, moléculas receptoras de los linfocitos T y similares), implicación en la adhesión celular (por ejemplo las moléculas ICAM) y señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tales como el receptor PDGF). La presente invención es aplicable a todas las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, dado que la variación en ellas se logra de formas similares. Preferiblemente, la presente invención se refiere a
55
60 inmunoglobulinas (anticuerpos).

Conformación de las cadenas principales La conformación de las cadenas principales se refiere a las señales del esqueleto de $C\alpha$ de una estructura en tres dimensiones. Cuando se consideran los bucles hipervariables individuales de los anticuerpos o se consideran las moléculas TCR, la conformación de las cadenas principales es sinónima de la estructura canónica. Tal como se describe en Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901 y Chothia y cols. (1989) *Nature*, 342: 877, los anticuerpos presentan un número limitado de estructuras canónicas para cinco de sus seis bucles hipervariables (H1, H2, L1, L2 y L3), a pesar de la considerable diversidad entre las cadenas laterales de los bucles mismos. La estructura canónica precisa que muestran depende de la longitud del bucle y de la identidad de ciertos
65

restos clave implicados en su empaquetamiento. El sexto bucle (*H3*) es mucho más diverso tanto en longitud como en secuencia y por lo tanto únicamente exhibe estructuras canónicas para ciertas longitudes cortas de los bucles (Martin y cols. (1996) *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shirai y cols (1996) *FEBS Letters*, 399: 1). En la presente invención, los seis bucles preferiblemente tendrán estructuras canónicas y por lo tanto, se conocerá la conformación de las cadenas principales para toda la molécula de anticuerpo.

Polipéptido de anticuerpo Los anticuerpos son inmunoglobulinas que son producidas por los linfocitos B y forman una parte central del sistema de defensa inmunitaria del huésped en los vertebrados. Un polipéptido de anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, es un polipéptido que o es un anticuerpo o es una parte de un anticuerpo, modificado o no modificado. De ese modo, el término polipéptido de anticuerpo incluye una cadena pesada, una cadena ligera, un dímero de cadena pesada-cadena ligera, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento F(ab')₂, o un fragmento Fv, que incluye un Fv monocatenario (scFv). Los procedimientos para la construcción de dichas moléculas de anticuerpo son notorias en la técnica.

Superantígeno Los superantígenos son antígenos, en su mayoría en forma de toxinas expresadas en bacteria, que interactúan con miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas fuera de los sitios de unión de ligandos convencionales para estas moléculas. Las enterotoxinas de los estafilococos interactúan con los receptores de los linfocitos T y tienen el efecto de estimular los linfocitos TCD4+. Los superantígenos para los anticuerpos incluyen las moléculas Proteína G que se une a la región constante de IgG (Bjorck y Kronvall (1984) *J. Immunol.* 133: 969; Reis y cols. (1984) *J. Immunol.*, 132: 3091), Proteína A que se une a la región constante de IgG y el dominio V_H (Forsgren y Sjoquist (1966) *J. Immunol.*, 97: 822) y Proteína L que se une al dominio V_L (Bjorck (1988) *J. Immunol.*, 140: 1994).

Realizaciones preferidas de la invención

La presente invención proporciona un sistema de selección que elimina, o reduce de forma significativa la proporción de miembros no funcionales o deficientemente plegados/expresados de una colección de polipéptidos a la vez que enriquece la colección en miembros funcionales, plegados y bien expresados antes de realizar una selección para determinar la especificidad contra un "ligando diana". Un repertorio de moléculas polipeptídicas se pone en contacto con un "ligando genérico", una proteína que tiene afinidad por una característica estructural común a todas las proteínas funcionales, por ejemplo completas y/o plegadas correctamente, de la clase relevante. Obsérvese que el término "ligando" se usa de forma amplia para hacer referencia a las moléculas que se usan en la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a cualquier entidad que se une o a la que se une un miembro de la colección de polipéptidos.

Un número significativo de proteínas defectuosas presentes en el repertorio inicial no pueden unirse al ligando genérico y por lo tanto se eliminan. Esta eliminación selectiva de los polipéptidos no funcionales de una colección produce una marcada reducción de su tamaño real, mientras que se mantiene su tamaño funcional, con un aumento correspondiente de su calidad. Los polipéptidos que se mantienen gracias a que se unen al ligando genérico constituyen un "primer conjunto seleccionado" o "subconjunto" del repertorio original. En consecuencia, este "subconjunto" está enriquecido en miembros funcionales, bien plegados y bien expresados del repertorio inicial.

Los polipéptidos del primer conjunto seleccionado o subconjunto posteriormente se ponen en contacto con al menos un "ligando diana", que se une a los polipéptidos con una especificidad funcional dada. Dichos ligandos diana incluyen, pero sin limitación, o la mitad de un par de receptor/ligando (por ejemplo una hormona u otra molécula de señalización celular, tal como un neurotransmisor, y su receptor cognado), o de un par de unión de moléculas de adhesión celular, un sustrato proteínico que se une por el sitio activo de una enzima, una proteína, péptido o compuesto orgánico pequeño contra el que debe dirigirse un anticuerpo particular o incluso un anticuerpo en sí. En consecuencia, el uso de una colección de ese tipo demanda menos trabajo y es más económica, en términos tanto de tiempo como de materiales, de lo que la de una colección convencional. Además, dado que comparado con un repertorio que no ha sido seleccionado con un ligando genérico, el primer conjunto seleccionado contendrá una proporción mucho mayor de moléculas que son capaces de unirse al ligando diana que de las que son incapaces de unirse al ligando diana, habrá una reducción significativa de ruido de fondo durante la selección con el "ligando diana".

Los esquemas de selección combinatoria también se contemplan de acuerdo con la invención. Pueden realizarse selecciones múltiples del mismo repertorio de polipéptidos inicial en paralelo o en serie usando diferentes ligandos genéricos y/o diana. De ese modo, el repertorio puede seleccionarse primero con un único ligando genérico y después posteriormente seleccionarse en paralelo usando diferentes ligandos diana. Los subconjuntos resultantes pueden usarse después por separado o combinados, en cuyo caso el subconjunto combinado tendrá un abanico de especificidades por ligandos diana pero una única especificidad por un ligando genérico. De forma alternativa, el repertorio puede seleccionarse primero con un único ligando diana y después posteriormente seleccionarse en paralelo usando diferentes ligandos genéricos. Los subconjuntos resultantes pueden usarse después por separado o combinados, en cuyo caso el subconjunto combinado tendrá un abanico de especificidades por ligandos genéricos pero una única especificidad por un ligando diana. También se contempla el uso de esquemas más elaborados. Por ejemplo, puede someterse el repertorio inicial a dos tandas de selección usando dos ligandos genéricos diferentes, seguido de selección con el ligando diana. Esto produce un subconjunto en el que todos los miembros se unen a ambos ligandos genéricos y al ligando diana. De forma alternativa, si la selección del repertorio inicial con los dos ligandos genéricos se realiza en paralelo y los subconjuntos combinados resultantes y después se selecciona con el ligando diana, el subconjunto resultante se une a al menos uno de los dos ligandos genéricos y al ligando diana. Los repertorios combinados o

mezclados pueden ser simples mezclas de los subconjuntos o pueden manipularse para combinar físicamente los subconjuntos. Por ejemplo, los polipéptidos V_H y V_L pueden seleccionarse individualmente en paralelo uniéndolos a dos ligandos genéricos diferentes, y posteriormente combinarse a nivel genético en vectores únicos de tal forma que se expresen como dímeros V_H - V_L combinados. Este repertorio después puede seleccionarse contra el ligando diana de tal forma que los miembros seleccionados sean capaces de unirse a ambos ligandos genéricos y al ligando diana.

La invención engloba colecciones de polipéptidos funcionales seleccionados o seleccionables mediante los procedimientos que se describen de forma amplia anteriormente, así como a colecciones de ácido nucleico que codifican moléculas polipeptídicas que pueden usarse en una selección realizada de acuerdo con estos procedimientos (preferiblemente, moléculas que comprenden un primer sitio de unión para un ligando diana y un segundo sitio de unión por un ligando genérico). Además, la invención proporciona procedimientos para detectar, inmovilizar, purificar o inmunoprecipitar uno o más miembros de un repertorio de polipéptidos funcionales seleccionados usando los ligandos genéricos o diana de acuerdo con la invención.

La invención puede aplicarse de forma particular al enriquecimiento de colecciones de moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Esto es particularmente cierto en lo que se refiere a la generación de poblaciones de anticuerpos y linfocitos T receptores que son funcionales y tienen una especificidad deseada, tal como se requiere para el uso en procedimientos de diagnóstico, terapéuticos o profilácticos. Con este fin, la invención proporciona colecciones de anticuerpos y receptores de linfocitos T en los que todos los miembros tienen tanto regiones estructurales naturales como bucles de conformación de las cadenas principales conocida, así como estrategias para la mutagénesis útil de la secuencia inicial y la posterior selección de variantes funcionales así generadas. Dichas colecciones de polipéptidos pueden comprender dominios V_H o V_β o, de forma alternativa, pueden comprender dominios V_L o V_α , o incluso ambos dominios V_H o V_β y V_L o V_α .

Hay una significativa necesidad en la técnica de colecciones de anticuerpos o de moléculas de receptores de linfocitos T. Por ejemplo, a pesar del progreso en la creación de colecciones de fago y anticuerpos de "fuente única", todavía sigue habiendo diversos problemas. Las colecciones naturales (Marks y cols. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Vaughan y cols. (1996) *Nature Biotech.*, 14: 309) que usan genes V reordenados recogidos de linfocitos B humanos presentan un gran sesgo debido a la selección positiva y negativa de los linfocitos B *in vivo*. Esto puede limitar el tamaño eficaz de las colecciones de fagos construidas a partir de genes V reordenados. Además, los clones derivados de colecciones naturales de forma invariable contienen mutaciones estructurales que pueden afectar a la capacidad inmunógena de los anticuerpos cuando se usan en el tratamiento de seres humanos. Las colecciones sintéticas (Hoogenboom & Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Barbas y cols. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 4457; Nissim y cols. (1994) *EMBO J.*, 13: 692; Griffiths y cols. (1994) *EMBO J.*, 13: 3245; De Kruif y cols. (1995) *J. Mol. Biol.*, 248: 97) pueden solventar el problema del sesgo, pero requieren el uso de cebadores de PCR degenerados largos que con frecuencia introducen deleciones de pares de bases en los genes V ensamblados. Este alto grado de aleatorización puede conllevar también la creación de anticuerpos que son incapaces de plegarse correctamente y por lo tanto también son no funcionales. En muchos casos es probable que estos miembros no funcionales superen en número a los miembros funcionales de una colección. Incluso aunque las regiones estructurales puedan optimizarse previamente en base al plegamiento y/o expresión (documento WO97/08320, Morphosys) sintetizando un conjunto de "genes maestros" con secuencias estructurales de consenso e incorporando sustituciones de aminoácidos que se ha demostrado que mejoran el plegamiento y la expresión, sigue existiendo el problema de la capacidad inmunógena dado que, en la mayoría de los casos, las secuencias de consenso no corresponden a ninguna región estructural natural. Además, dado que es probable que la diversidad de las CDR también tenga efecto sobre el plegamiento y/o expresión, es preferible optimizar el plegamiento y/o expresión (y eliminar cualesquiera cambios de marco o codones de terminación) una vez el gen V ha sido ensamblado completamente.

Un problema adicional con las colecciones existentes es que, debido a que la conformación de las cadenas principales es heterogénea, es difícil conseguir modelos tridimensionales debido a que puede no disponerse de datos cristalográficos de alta resolución adecuados. Este es un problema particular para la región H3, en la que la mayoría de los anticuerpos derivados de colecciones de anticuerpos naturales o sintéticas tienen una longitud media o bucles largos y por lo tanto no pueden obtenerse los modelos.

Otro problema con las colecciones existentes es que dependen de marcadores de epítomos (tal como los marcadores myc, FLAG o HIS) para la detección de fragmentos de anticuerpo expresados. Dado que estos habitualmente están situados en los extremos N o C del fragmento del anticuerpo tienen tendencia a la escisión proteolítica. Pueden usarse superantígenos, tales como Proteína A y Proteína L para detectar fragmentos de anticuerpo expresados por su unión a los dominios expresados en sí, pero dado que son específicos de familia de V_H y V_L , únicamente una proporción relativamente pequeña de los miembros de cualquier colección de anticuerpos existente se unirá a uno de estos reactivos y una proporción todavía más pequeña se unirá a ambos.

Con este fin, sería deseable tener un sistema de selección que pudiera eliminar, o al menos reducir la proporción de miembros de la colección no funcionales o mal plegados/expresados antes de realizar la selección contra el antígeno diana a la vez que enriquece la colección en miembros funcionales, plegados y bien expresados todos los cuales son capaces de unirse a ligandos genéricos tales como los superantígenos Proteína A y Proteína L. Además, sería ventajoso construir una colección de anticuerpos en la que todos los miembros tengan regiones estructurales naturales y tengan bucles con conformaciones de las cadenas principales conocidas.

La invención por consiguiente proporciona un procedimiento por el que puede seleccionarse un repertorio de polipéptidos para eliminar los miembros no funcionales. Esto provoca una marcada reducción del tamaño real de la colección (y un aumento correspondiente de la calidad de la colección) sin reducir el tamaño de la colección funcional. La invención también proporciona un procedimiento para crear nuevos repertorios de polipéptidos en el que todos los miembros funcionales son capaces de unirse a un ligando genérico dado. El mismo ligando genérico puede usarse para la posterior detección, inmovilización, purificación o inmunoprecipitación de uno o más miembros cualesquiera del repertorio.

Puede usarse cualquier repertorio de anticuerpos “indiferenciados” o “previamente expuestos” con la presente invención para enriquecerlo en miembros funcionales y/o para enriquecerlo en miembros que se unen a un ligando o ligandos genéricos dados. De hecho, dado que únicamente un pequeño porcentaje de todos los segmentos de V_H de la línea germinal se unen a Proteína A con afinidad elevada y únicamente un pequeño porcentaje de todos los segmentos de V_L de la línea germinal humana se unen a Proteína L con afinidad elevada, la preselección con estos superantígenos es muy ventajosa. De forma alternativa, la preselección mediante el marcador de epítopos permite eliminar las variantes no funcionales de las colecciones sintéticas. Las colecciones que pueden someterse a preselección incluyen, pero sin limitación, las colecciones compuestas por genes V reordenados *in vivo* del tipo que describen by Marks y cols. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581 y Vaughan y cols. (1996) Nature Biotech., 14: 309, colecciones sintéticas en las cuales los segmentos de genes V de la línea germinal son “reordenados” *in vitro* (Hoogenboom & Winter (1992) J. Mol. Biol., 227: 381; Nissim y cols. (1994) EMBO J., 13: 692; Griffiths y cols. (1994) EMBO J., 13: 3245; De Kruif y cols. (1995) J. Mol. Biol., 248: 97) o en las que se incorporan CDR sintéticas en un único gen V reordenado (Barbas y cols. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 4457) o en múltiples regiones maestras estructurales (documento WO97/08320, Morphosys).

Selección de polipéptidos de acuerdo con la invención

Una vez se ha generado un conjunto diverso de polipéptidos, se aplica la selección de acuerdo con la invención. Dos amplios procedimientos de selección se basan en el orden en el que se aplican los ligandos genéricos y diana; las variaciones combinatorias de estos esquemas implican el uso de múltiples ligandos genéricos y/o diana en una etapa dada de una selección. Cuando se usa un esquema combinatorio, el conjunto de de moléculas polipeptídicas puede ponerse en contacto, por ejemplo, con varios ligandos diana a la vez, o con cada uno individualmente, en serie; en este último caso, los conjuntos de polipéptidos seleccionados resultantes pueden mantenerse por separado o pueden agruparse. Estos esquemas de selección pueden resumirse de la forma siguiente:

a. Procedimiento de selección 1

Selección inicial de polipéptidos usando el ligando genérico

Para eliminar los miembros no funcionales de la colección, se selecciona un ligando genérico, de tal forma que el ligando genérico se una únicamente a las moléculas funcionales. Por ejemplo, el ligando genérico puede ser un ión metálico, un anticuerpo (en forma de un anticuerpo monoclonal o una mezcla de anticuerpos policlonales), la mitad de un complejo de enzima y ligando o material orgánico; obsérvese que los ligandos de cualquiera de estos tipos son además o de forma alternativa, de uso como ligandos diana de acuerdo con la invención. La producción de anticuerpos y la cromatografía por afinidad por metales se describen en detalle más adelante. De forma idal, estos ligandos se unen a un sitio (por ejemplo un sitio de unión de un marcador peptídico o un superantígeno) de los miembros de la colección que es de estructura o secuencia constantes, estructura que puede estar ausente o alterada en los miembros no funcionales. En el caso de las colecciones de anticuerpos, este procedimiento se usa para seleccionar de una colección únicamente aquellos miembros funcionales que tienen un sitio de unión para un superantígeno o anticuerpo monoclonal dados; dicha estrategia es útil para seleccionar polipéptidos funcionales de anticuerpos a partir de conjuntos naturales y sintéticos.

Los superantígenos Proteína A y/o Proteína L son de uso en la invención como ligandos genéricos para seleccionar repertorios de anticuerpos, dado que se unen a los dominios V_H y V_L (que pertenecen a ciertas familias de V_H y V_L) plegados correctamente, respectivamente, independientemente de la secuencia y estructura del sitio de unión por el ligando diana. Además, se usa Proteína A u otro superantígeno como Proteína G como ligandos genéricos para seleccionar el plegamiento y/o expresión mediante la unión de los dominios constantes de la cadena pesada de los anticuerpos. También pueden usarse anticuerpos contra κ y contra L para seleccionar dominios constantes de la cadena ligera. También pueden usarse pequeños miméticos orgánicos de anticuerpos o de otras proteínas de unión, tales como Proteína A (Li y cols. (1998) Nature Biotech., 16: 190).

Cuando se usa este procedimiento de selección, el ligando genérico, por su propia naturaleza, es capaz de unirse a todos los miembros funcionales del repertorio preseleccionado; por lo tanto, puede usarse este ligando genérico (o algún conjugado del mismo) para detectar, inmovilizar, purificar o inmunoprecipitar cualquier miembro o población de miembros del repertorio (ya sean seleccionados por su unión a un ligando diana dado o no, tal como se describe más adelante). La detección de proteínas mediante técnicas de inmunoensayo así como la inmunoprecipitación de polipéptidos miembros de un repertorio de la invención pueden realizarse mediante las técnicas que se describen a continuación con respecto al análisis de los ligandos de selección de anticuerpos de uso en la invención (véase “Anticuerpos para usar como ligandos en la selección de polipéptidos”). La inmovilización puede realizarse a través de la unión específica de un miembro polipeptídico de un repertorio o bien a un ligando genérico o a un ligando diana de

acuerdo con la invención que, a su vez, está enlazado a un soporte sólido o semisólido, tal como un filtro (por ejemplo de nitrocelulosa o nylon) o a un soporte cromatográfico (que incluye, pero sin limitación, un soporte de celulosa, polímero, resina o sílice); la unión covalente del polipéptido miembro al ligando genérico o diana puede realizarse usando cualquiera de un número de agentes de reticulación química conocidos por una persona de experiencia en la técnica. La inmovilización sobre un soporte para la cromatografía por afinidad por metales se describe más adelante (véase “Ligandos metálicos a usar en la selección de polipéptidos”). La purificación puede comprender cualquiera o una combinación de estas técnicas, en particular inmunoprecipitación y cromatografía por procedimientos notorios en la técnica.

Usando esta estrategia, la selección con ligandos genéricos múltiples puede realizarse o uno después del otro para crear un repertorio en el que todos los miembros se unen a dos o más ligandos genéricos, por separado en paralelo, de tal forma que después puedan combinarse los subconjuntos (en este caso, los miembros del repertorio preseleccionado se unirán al menos a uno de los ligandos genéricos) o por separado seguido de la incorporación en la misma cadena polipeptídica, mediante lo cual se usa una gran colección funcional en la que todos los miembros pueden tener capacidad de unirse a todos los ligandos genéricos durante la preselección. Por ejemplo, los subconjuntos pueden seleccionarse a partir de una o más colecciones usando diferentes ligandos genéricos que se unen a las cadenas pesadas y ligeras de moléculas de anticuerpos (véase más adelante) y después combinarse formando una colección cadenas pesadas y ligeras, en la que las cadenas pesadas y ligeras están o no asociadas covalentemente o están enlazadas covalentemente, por ejemplo, usando dominios V_H y V_L en un contexto de F_v monocatenario.

Selección con polipéptido secundario usando el ligando diana

Tras la etapa de selección con el ligando genérico, la colección se tamiza para identificar los miembros que se unen al ligando diana. Dado que está enriquecida en polipéptidos funcionales después de la selección con el ligando genérico, habrá una reducción ventajosa en la unión no específica (“ruido de fondo”) durante la selección con el ligando diana. Además, dado que la selección con el ligando genérico produce una marcada reducción en el tamaño real de la colección (y un aumento correspondiente en la calidad de la colección) sin reducir el tamaño de la colección funcional, un repertorio más pequeño debería provocar la misma diversidad de especificidades y afinidades por ligandos diana que el repertorio inicial (que contenía muchos miembros no funcionales y mal plegados/expresados).

Pueden usarse uno o más ligandos para seleccionar polipéptidos del primer conjunto de polipéptidos seleccionados generado usando el ligando genérico. En el caso en el que se usan dos o más ligandos diana para generar un número de diferentes subconjuntos, pueden combinarse dos o más de estos subconjuntos para formar un único subconjunto más complejo. Un único ligando genérico es capaz de unirse a todos los miembros del subconjunto combinado resultante; sin embargo, un ligando diana dado se une únicamente a un subconjunto de miembros de la colección.

b. Procedimiento de selección 2

Selección inicial de los miembros del repertorio con el ligando diana

Aquí, la selección usando el ligando diana se realiza antes de la selección usando el ligando genérico. Obviamente, puede obtenerse el mismo conjunto de polipéptidos o esquema, si se desea ese resultado. Usando esta estrategia, puede realizarse la selección con múltiples ligandos diana en paralelo o mezclando los ligandos diana para su selección. Si se realiza en paralelo, los subconjuntos resultantes puede combinarse, si fuera necesario.

Selección secundaria de polipéptidos usando el ligando genérico

La posterior selección del subconjunto que se une al ligando diana puede realizarse después usando uno o más ligandos genéricos. Aunque esta no es una selección en base a la función, dado que los miembros del repertorio que tienen capacidad de unirse al ligando diana son por definición funcionales, si permite aislar los subconjuntos que se unen a diferentes ligandos genéricos. De ese modo, la población de ligandos diana seleccionados puede seleccionarse mediante un ligando genérico o mediante dos o más ligandos genéricos. En este caso, pueden usarse los ligandos genéricos uno después de otro para crear un repertorio en el que todos los miembros se unen al ligando diana y a dos o más ligandos genéricos o por separado en paralelo, de tal forma que se crean subconjuntos diferentes (pero posiblemente con intersecciones) que se unen al ligando diana y a diferentes ligandos genéricos. Estos después pueden combinarse (en este caso, los miembros se unirán al menos a uno de los ligandos genéricos).

Selección de miembros de colecciones de polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas

Los miembros de los repertorios o colecciones seleccionados en la presente invención de forma ventajosa pertenecen a la superfamilia de moléculas de las inmunoglobulinas, en particular, polipéptidos de anticuerpos o polipéptidos de receptores de linfocitos T. Para los anticuerpos, se prevé que el procedimiento de acuerdo con esta invención puede aplicarse a cualquiera de las colecciones de anticuerpos existentes conocidas en la técnica (ya sean naturales o sintéticas) o a colecciones de anticuerpos diseñadas específicamente para ser preseleccionadas con los ligandos genéricos (véase más adelante).

*Construcción de colecciones de la invención**a. Selección de la conformación de la cadena principal*

5 Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas todos comparten un plegamiento similar para su cadena polipeptídica. Por ejemplo, aunque los anticuerpos son muy diversos en cuanto a su secuencia primaria, la comparación de las secuencias y las estructuras cristalográficas han revelado que, al contrario de lo que se esperaba, cinco de los seis bucles de unión de antígenos de los anticuerpos (H1, H2, L1, L2, L3) adoptan un número limitado de conformaciones de la cadena principal, o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) referencia anterior; Chothia y cols (1989) referencia anterior). El análisis de las longitudes de los bucles y los restos clave por lo tanto ha permitido la predicción de las conformaciones de las cadenas principales de H1, H2, L1, L2 y L3 que se encuentran en la mayoría de los anticuerpos humanos (Chothia y cols. (1992) referencia anterior; Tomlinson y cols. (1995) referencia anterior; Williams y cols. (1996) referencia anterior). Aunque la región H3 es mucho más diversa en cuanto a la secuencia, longitud y estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de la cadena principal para longitudes cortas de los bucles que dependen de la longitud y presencia de restos, o tipos de restos particulares, en posiciones claves del bucle y la estructura de los anticuerpos (Martin y cols. (1996) referencia anterior; Shirai y cols. (1996) referencia anterior).

20 De acuerdo con la presente invención, se diseñan polipéptidos de anticuerpos en los que se eligen ciertas longitudes de los bucles y restos clave para asegurarse de que se conoce la conformación de las cadenas principales de los miembros. De forma ventajosa, estas son conformaciones reales de las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se encuentran en la naturaleza, para minimizar las posibilidades de que no sean funcionales, tal como se describe anteriormente. Los segmentos de los genes V de la línea germinal sirven de estructura básica adecuada para construir colecciones de anticuerpos o de receptores de linfocitos T; también se usan otras secuencias. Pueden producirse variaciones con frecuencia baja, de tal forma que un pequeño número de miembros funcionales pueda poseer una conformación alterada en la cadena principal, que no afecta a su función.

30 La teoría de la estructura canónica también puede usarse en la invención para evaluar el número de diferentes conformaciones de cadenas principales codificadas por anticuerpos, para predecir la conformación de la cadena principal basándose en las secuencias de anticuerpos y para elegir restos para diversificación que no afecten a la estructura canónica. Actualmente se conoce que, en el dominio V_{κ} humano, el bucle L1 puede adoptar una de cuatro estructuras canónicas, el bucle L2 tiene una única estructura canónica y que el 90% de los dominios V_{κ} humanos adoptan una de cuatro o cinco estructuras canónicas para el bucle L3 (Tomlinson y cols. (1995) referencia anterior); así, solamente en el dominio V_{κ} , pueden combinarse diferentes estructuras canónicas para crear un intervalo de diferentes conformaciones de las cadenas principales. Dado que el dominio V_{λ} codifica una variedad diferente de estructuras canónicas para los bucles L1, L2 y L3 y que los dominios V_{κ} y V_{λ} pueden parearse con cualquier dominio V_H que puede codificar varias estructuras canónicas para los bucles H1 y H2, el número de combinaciones de estructuras canónicas que se observa para estos cinco bucles es muy grande. Esto implica que la generación de diversidad en la conformación de las cadenas principales puede ser esencial para la producción de un amplio abanico de especificidades de unión. Sin embargo, al construir una colección de anticuerpos basándose en una única conformación conocida de las cadenas principales se encontró, al contrario de lo que se esperaba, que no es necesaria una diversidad en la conformación de las cadenas principales para generar una diversidad suficiente para dirigirlos contra sustancialmente todos los antígenos. Es incluso más sorprendente, que la conformación única de las cadenas principales no tiene que ser una estructura de consenso, puede usarse una única conformación natural como base para toda una colección. De ese modo, en un aspecto preferido, la invención proporciona una colección en la que los miembros codifican una única conformación conocida de las cadenas principales. Debe entenderse, sin embargo, que pueden producirse variaciones ocasionales de tal forma que un pequeño número de miembros funcionales puedan poseer una conformación de las cadenas principales alternativa, que puede ser desconocida.

50 La única conformación de las cadenas principales que se elige preferiblemente es común entre las moléculas del tipo de superfamilia de las inmunoglobulinas en cuestión. Una conformación es habitual cuando se observa que la adopta un número significativo de moléculas naturales. Por consiguiente, en un aspecto preferido de la invención, la aparición natural de las diferentes conformaciones de las cadenas principales por cada bucle de unión de una molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas se conserva por separado y después se elige una molécula superfamilia de las inmunoglobulinas natural que posea la combinación de conformaciones de las cadenas principales deseada para los diferentes bucles. Si no hay ninguno disponible, puede elegirse el equivalente más próximo. Dado que una desventaja de las colecciones de polipéptidos de la familia de las inmunoglobulinas de la técnica anterior es que muchos miembros tienen regiones estructurales no naturales o contienen mutaciones estructurales (véase más arriba), en el caso de los anticuerpos o receptores de los linfocitos T, es preferible crear la combinación de conformaciones de las cadenas principales deseada para los diferentes bucles seleccionando segmentos de genes de la línea germinal que codifican las conformaciones de las cadenas principales deseadas. Es más preferible, que los segmentos de genes de la línea germinal seleccionados sean de expresión frecuente y lo más preferible que sean de los de expresión más frecuente.

65 En el diseño de las colecciones de anticuerpos, por lo tanto, puede considerarse por separado la incidencia de las diferentes conformaciones de las cadenas principales para cada uno de los seis bucles de unión de antígenos. Para H1, H2, L1, L2 y L3, se elige una conformación dada que es adoptada por entre el 20% y el 100% de los bucles de unión de antígenos de las moléculas naturales. Habitualmente, la incidencia que se observa es superior al 35% (es decir entre 35% y 100%) y, de forma ideal, superior al 50% o incluso superior al 65%. Dado que la gran mayoría de los bucles H3

ES 2 321 566 T3

no tienen estructuras canónicas, es preferible seleccionar una conformación de las cadenas principales que sea común entre los bucles que sí presentan estructuras canónicas. Por lo tanto, para cada uno de los bucles, se selecciona la conformación que se observa más habitualmente en el repertorio natural. En los anticuerpos humanos, las estructuras canónicas más populares (CS) para cada bucle son las siguientes: H1 - CS 1 (79% del repertorio expresado), H2 - CS 3 (46%), L1 - CS 2 de V_{κ} (39%), L2 - CS 1 (100%), L3 - CS 1 cd V_{κ} (36%) (el cálculo asume una proporción entre $\kappa:\lambda$ de 70:30, Hood y cols. (1967) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48: 133). Para los bucles H3 que tienen estructuras canónicas, lo más habitual para la longitud de CDR3 (Kabat y cols. (1991) Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Department of Health and Human Services) de siete restos con un puente salino entre el resto 94 y el resto 101. Existen al menos 16 secuencias de anticuerpos humanos en la colección de datos de EMBL con la longitud de H3 y los restos clave necesarios para formar esta conformación y al menos dos estructuras cristalográficas en el banco de datos de proteína que pueden usarse como base para modelar anticuerpos (2cgr y 1tet). Los segmentos génicos de la línea germinal que se expresan más frecuentemente de esta combinación de estructuras canónicas son el segmento 3-23 de V_H (DP-47), el segmento JH4b de J_H , el segmento O2/O12 V_{κ} (DPK9) y el segmento $J_{\kappa}1$ de J_{κ} . Estos segmentos pueden usarse por lo tanto combinados como base para construir una colección con la conformación única de las cadenas principales deseada.

De forma alternativa, en lugar de elegir la conformación única de las cadenas principales basándose en la aparición natural de las diferentes conformaciones de las cadenas principales para cada uno de los bucles de unión por separado, se usa la aparición natural de las combinaciones de conformaciones de las cadenas principales como base para elegir la conformación única de las cadenas principales. En el caso de los anticuerpos, por ejemplo, puede determinarse la aparición natural de combinaciones de estructuras canónicas para cualesquiera dos, tres, cuatro, cinco, o para los seis bucles de unión de antígenos. Aquí, es preferible que la conformación elegida sea la habitual en los anticuerpos naturales y lo más preferible es que se observe con la mayor frecuencia en el repertorio natural. Así, en los anticuerpos humanos, por ejemplo, cuando se consideran combinaciones naturales de los cinco bucles de unión de antígenos, H1, H2, L1, L2 y L3, se determina la combinación de estructura canónicas más frecuente y después se combinan con la conformación más habitual para el bucle H3, como base para elegir la conformación única de las cadenas principales.

b. Diversificación de la secuencia canónica

Habiendo seleccionado diversas conformaciones conocidas de las cadenas principales o, preferiblemente una única conformación de las cadenas principales conocida, la colección de la invención puede construirse variando el sitio de unión de la molécula para generar un repertorio con diversidad estructural y/o funcional. Esto quiere decir que se generan variantes de tal forma que posean una diversidad suficiente en su estructura y/o en su función tal que sean capaces de proporcionar una variedad de actividades. Por ejemplo, cuando los polipéptidos en cuestión son receptores de la superficie celular, pueden poseer una diversidad de especificidades de unión de ligandos diana.

La diversidad deseada se genera habitualmente variando la molécula seleccionada en una o más posiciones. Las posiciones a cambiar pueden elegirse aleatoriamente o preferiblemente se seleccionan. La variación puede lograrse después mediante aleatorización, durante la cual el aminoácido es sustituido por cualquier aminoácido o análogo del mismo, natural o sintético, produciendo un gran número de variantes o sustituyendo el aminoácido existente por uno o más de un subconjunto definido de aminoácidos, produciendo un número más limitado de variantes.

Se han reseñado diversos procedimientos para introducir dicha diversidad. Puede usarse PCR con tendencia a errores (Hawkins y cols. (1992) J. Mol. Biol., 226: 889), mutagénesis química (Deng y cols. (1994) J. Biol. Chem., 269: 9533) o cepas mutadoras bacterianas (Low y cols. (1996) J. Mol. Biol., 260: 359) para introducir mutaciones aleatorias en los genes que codifican la molécula. Los procedimientos para mutar las posiciones seleccionadas son también notorias en la técnica e incluyen el uso de oligonucleótidos u oligonucleótidos degenerados con emparejamientos erróneos, con o sin el uso de PCR. Por ejemplo, se han creado varias colecciones de anticuerpos sintéticos dirigiendo las mutaciones a los bucles de unión de los antígenos. La región H3 de un Fab humano que se une al toxoide del tétano se ha randomizado para crear un abanico de nuevas especificidades de unión (Barbas y cols. (1992) referencia anterior). Se han unido regiones H3 y L3 aleatorias o semialeatorias a segmentos del gen V germinal para producir grandes colecciones con regiones estructurales sin mutaciones (Hoogenboom y Winter (1992) referencia anterior; Nissim y cols. (1994) referencia anterior; Griffiths y cols. (1994) referencia anterior; De Kruijff y cols. (1995) referencia anterior). Dicha diversificación se ha extendido para que incluya algunos o todos los otros bucles de unión de antígenos (Cramer y cols. (1996) Nature Med., 2: 100; Riechmann y cols. (1995) BiolTechnology. 13: 475; Morphosys, WO97/08320, referencia anterior).

Dado que la randomización de los bucles tiene potencial para crear aproximadamente más de 10_{15} estructuras para cualquier H3 y un número de variantes igualmente grande para los otros cinco bucles, no es factible usar la actual tecnología de transformación o ni siquiera usando sistemas sin células para producir una colección que represente todas las combinaciones posibles. Por ejemplo, en una de las colecciones más grandes construidas hasta la fecha, se generaron $6 \times 10_{10}$ anticuerpos diferentes, que es únicamente una fracción de la potencial diversidad para una colección de este diseño (Griffiths y cols. (1994) referencia anterior).

Además de la eliminación de los miembros no funcionales y del uso de una única conformación de las cadenas principales conocida, la presente invención soluciona estas limitaciones diversificando únicamente los restos que están directamente implicados en la creación o modificación de la función deseada de la molécula. Para muchas moléculas, la función será unirse a un ligando diana y por lo tanto la diversidad debería concentrarse en el sitio de unión del ligando

diana, a la vez que se evita cambiar los restos que son cruciales para el empaquetamiento global de la molécula o para mantener la conformación elegida para las cadenas principales; por lo tanto, la invención proporciona una colección en la que las posiciones seleccionadas para ser modificadas pueden ser las que constituyen el sitio de unión para el ligando diana.

5

Diversificación de la secuencia canónica en lo que respecta a los anticuerpos

En el caso de una colección de anticuerpos, el sitio de unión para el ligando diana lo más a menudo es el sitio de unión de antígenos. De ese modo, en un aspecto muy preferido, la invención proporciona una colección de anticuerpos en la que únicamente se varían los restos del sitio de unión de antígenos. Estos restos son muy diversos en el repertorio de anticuerpos humanos y se sabe que forman contactos en los complejos de anticuerpo/antígeno de alta resolución. Por ejemplo, es sabido que en L2 las posiciones 50 y 53 son diversas en los anticuerpos naturales y se observa que contactan con el antígeno. Por el contrario, la estrategia convencional hubiera sido diversificar todos los restos de la región determinante de la complementariedad (CDR1) correspondiente tal como la definen Kabat y cols. (1991, referencia anterior), unos siete restos comparados con los dos que se diversifican en la colección de acuerdo con la invención. Esto representa una mejora significativa en lo que respecta a la diversidad funcional necesaria para crear una variedad de especificidades de unión de antígenos.

En la naturaleza, la diversidad de los anticuerpos se produce mediante dos procesos: recombinación somática de los segmentos V, D y J de la línea germinal para crear un repertorio primario indiferenciado (la denominada diversidad de la línea germinal y de unión) e hipermutación somática de los genes V reordenados resultantes. El análisis de las secuencias de anticuerpos humanos ha demostrado que la diversidad en el repertorio primario se enfoca en el centro del sitio de unión de antígenos, mientras que la hipermutación somática extiende su diversidad a regiones de la periferia del sitio de unión de antígenos que están muy conservadas en el repertorio primario (véase Tomlinson y cols. (1996) referencia anterior). Esta complementariedad probablemente ha evolucionado como una estrategia eficaz para buscar el espacio de las secuencias y, aunque aparentemente exclusiva para los anticuerpos, puede aplicarse fácilmente a otros repertorios de polipéptidos de acuerdo con la invención. De acuerdo con la invención, los restos que varían son un subconjunto de los que forman el sitio de unión para el ligando diana. Los diferentes subconjuntos (que incluyen los superpuestos) de restos del sitio de unión del ligando diana se diversifican en etapas diferentes durante la selección, si se desea.

En el caso de un repertorio de anticuerpos, el procedimiento de dos etapas de la invención es análogo a la maduración de anticuerpos del sistema inmunitario humano. Se crea un repertorio inicial "indiferenciado" en el que se diversifican algunos, pero no todos, los restos del sitio de unión de antígenos. Tal como se usa en el presente documento en este contexto, el término "indiferenciado" se refiere a moléculas de anticuerpo que no tienen un ligando diana predeterminado. Estas moléculas se parecen a las que codifican los genes de inmunoglobulinas de un individuo que no ha sufrido diversificación inmunitaria, que es el caso de los individuos fetales y recién nacidos, cuyos sistemas inmunitarios no han sido aún expuestos a una gran variedad de estímulos antigénicos. Después se selecciona este repertorio con una variedad de antígenos. Si fuera necesario, puede introducirse una mayor diversidad después fuera de la región diversificada en el repertorio inicial. Este repertorio maduro puede seleccionarse para determinar una función, especificidad o afinidad modificadas.

La invención proporciona dos repertorios de anticuerpos indiferenciados diferentes en los que se varían algunos o todos los restos del sitio de unión de antígenos. La colección "primaria" imita el repertorio natural primario, restringiéndose la diversidad a los restos del centro del sitio de unión de antígenos que son diversos en los segmentos de genes V de la línea germinal (diversidad de la línea germinal) o se diversifican durante el proceso de recombinación (diversidad de unión). Los restos que se diversifican incluyen, pero sin limitación, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 y L96. En la colección "somática", la diversidad está restringida a los restos que se diversifican durante el proceso de recombinación (diversidad de unión) o tienen muchas mutaciones somáticas). Los restos que se diversifican incluyen, pero sin limitación: H31, H33, H35, H95, H96, H97, H98, L30, L31, L32, L34 y L96. Se sabe que todos los restos enumerados anteriormente como adecuados para su diversificación en estas colecciones forman contactos en uno o más complejos de anticuerpo y antígeno. Dado que en ambas colecciones, no se varían todos los restos del sitio de unión de antígenos, se incorpora diversidad adicional durante la selección variando los demás restos, si así se desea. Para un experto en la técnica será obvio que puede usarse cualquier subconjunto de cualquiera de estos (o de restos adicionales que comprenden el sitio de unión de antígenos) para la diversificación inicial y/o posterior del sitio de unión de antígenos.

En la construcción de las colecciones de acuerdo con la invención, la diversificación de las posiciones elegidas se logra habitualmente a nivel de los ácidos nucleicos, alterando la secuencia codificante que especifica la secuencia del polipéptido de tal forma que pueda incorporarse un número de aminoácidos posibles (los 20 o un subconjunto de los mismos) en esa posición. Usando la nomenclatura IUPAC, el codón más versátil es NNK, que codifica todos los aminoácidos así como el codón de terminación TAG. Preferiblemente se usa el codón NNK para introducir la diversidad necesaria. También se usan otros codones que logran los mismos fines, que incluye el codón NNN, que logra la producción de los codones de terminación adicionales TGA y TAA.

Una característica de la diversidad de las cadenas laterales en el sitio de unión de antígenos de los anticuerpos humanos es un pronunciado sesgo que favorece ciertos restos aminoácidos. Si se suma la composición de los aminoácidos de las diez posiciones más diversas de cada una de las regiones V_H , V_K y V_L , más del 76% de la diversidad de

las cadenas laterales proviene de únicamente siete restos diferentes, que son, serina (24%), tirosina (14%), asparragina (11%), glicina (9%), alanina (7%), aspartato (6%) y treonina (6%). Este sesgo hacia los restos hidrófilos y los restos pequeños que puede proporcionar flexibilidad a las cadenas principales probablemente refleja la evolución de las superficies que tienen predisposición a unirse a un amplio abanico de antígenos y puede ayudar a explicar la necesaria promiscuidad de los anticuerpos del repertorio primario.

Dado que es preferible imitar esta distribución de aminoácidos, la invención proporciona una colección en la que la distribución de aminoácidos en las posiciones a variar imita la que se observa en el sitio de unión de antígenos de los anticuerpos. Dicho sesgo en la sustitución de los aminoácidos que permite la selección de ciertos polipéptidos (no sólo los polipéptidos de anticuerpos) contra una variedad de ligandos diana se aplica fácilmente a cualquier repertorio de polipéptidos de acuerdo con la invención. Existen diversos procedimientos para sesgar la distribución de aminoácidos en la posición a variar (que incluyen el uso de mutagénesis de trinucleótidos, documento WO97/08320, Morphosys, referencia anterior), de los cuales el procedimiento preferido, debido a la facilidad de su síntesis, es el uso de codones degenerados convencionales. Al comparar el perfil de los aminoácidos codificados por todas las combinaciones de los codones degenerados (con degeneración única, doble, triple y cuádruple en proporciones iguales en cada posición) con el uso de los aminoácidos naturales es posible calcular el codón más representativo. Los codones (AGT)(AGC)T, (AGT)(AGC)C y (AGT)(AGC)(CT) - que son, DVT, DVC y DVY, respectivamente usando la nomenclatura IUPAC - son los más similares al perfil de aminoácidos deseado: codifican 22% de serina y 11% de tirosina, asparragina, glicina, alanina, aspartato, treonina y cisteína. Preferiblemente, por lo tanto, las colecciones se construyen usando o el codón DVT, DVC o DVY en cada una de las posiciones diversificadas.

Tal como se indica anteriormente, los polipéptidos que forman las colecciones de anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv o scFv, o dominios V_H o V_L separados, cualquiera de los cuales está modificado o no modificado. De estos, se usan particularmente los fragmentos Fv monocatenarios, o scFvs. Los fragmentos ScFv, así como otros polipéptidos de anticuerpos; se generan de forma fiable mediante procedimientos de diseño de anticuerpos notorios en la técnica. El scFv se forma mediante la conexión de los genes V_H y V_L usando un oligonucleótido que codifica un péptido enlazador diseñado de forma apropiada, tal como (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ o péptido(s) enlazador(es) equivalente(s). Los puentes enlazadores del extremo C de la primera región de V y el extremo N de la segunda región de V, se ordenan de la forma V_H-enlazador-V_L o V_L-enlazador-V_H. En principio, el sitio de unión del scFv puede reproducir de forma fidedigna la especificidad del anticuerpo entero correspondiente y vice-versa. En la técnica son notorias técnicas similares para la construcción de fragmentos Fv, Fab y F(ab')₂, así como moléculas quiméricas de anticuerpos. Cuando se expresan los fragmentos Fv, deben tomarse precauciones para asegurar el correcto plegamiento y asociación de las cadenas. Para los fragmentos Fab y F(ab')₂, se combinan polipéptidos V_H y V_L con segmentos de regiones constantes, que pueden aislarse a partir de genes reordenados, genes de C de la línea germinal o que pueden sintetizarse a partir de datos de secuencias de anticuerpos al igual que para los segmentos de la región V. Una colección de acuerdo con la invención puede ser una colección de V_H o V_L. De ese modo, pueden construirse colecciones distintas que comprenden dominios V_H y V_L únicos y, opcionalmente, incluyen dominios C_H, o C_L, respectivamente, creando moléculas Dab.

40 c. Sistemas de vectores en colecciones de acuerdo con la invención

Las colecciones de acuerdo con la invención pueden usarse para el tamizado directo usando los ligandos genéricos y/o diana o usarse en un protocolo de selección que implique un paquete de presentación genética.

Los sistemas de expresión en bacteriófago lambda pueden tamizarse directamente en placas de bacteriófagos o en colonias de lisógenos, ambos tal como se ha descrito anteriormente (Huse y cols. (1989) Science, 246: 1275; Caton y Koprowski (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87; Mullinax y cols. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 8095; Persson y cols. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 2432) y son útiles en la invención. Aunque dichos sistemas de expresión pueden usarse para tamizar hasta 10⁶ miembros diferentes de una colección, no son realmente adecuados para tamizar números superiores (superiores a 10⁶ miembros). Otros sistemas de tamizado se fundamentan, por ejemplo, en la síntesis química directa de miembros de la colección. Un procedimiento temprano supone la síntesis de péptidos en un conjunto de agujas o bastones, tal como se describe en el documento WO84/03564. Un procedimiento similar que supone la síntesis de péptido sobre perlas, que forma una colección de péptidos en la que cada perla es un miembro individual de la colección, se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.631.211 y un procedimiento similar se describe en el documento WO92/00091. Una mejora significativa de los procedimientos con base de perlas implica marcar cada perla con un marcador identificador único, tal como un oligonucleótido, de forma que se facilite la identificación de la secuencia de aminoácidos de cada miembro de la colección. Estos procedimientos mejorados con base de perlas se describen en el documento WO93/06121.

Otro procedimiento de síntesis química supone la síntesis de chips de péptidos (o peptidomiméticos) sobre una superficie de forma que cada miembro diferente de la colección (por ejemplo, una secuencia de péptidos única) esté situado en una localización diferente, predefinida del chip. La identidad de cada miembro de la colección se determina por su situación espacial en el chip. Se determinan los puntos del chip en los que se producen las interacciones de unión entre una molécula predeterminada (por ejemplo, un receptor) y miembros reactivos de la colección, identificando así las secuencias de los miembros reactivos de la colección en base a su situación espacial. Estos procedimientos se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.143.854; los documentos WO90/15070 y WO92/10092; Fodor y cols. (1991) Science, 251: 767; Dower y Fodor (1991) Ann. Rep. Med. Chem., 26:271.

ES 2 321 566 T3

De uso particular en la construcción de las colecciones de la invención son los sistemas de presentación y selección, que permiten relacionar el ácido nucleico con el polipéptido que expresa. Tal como se usa en el presente documento, un sistema de presentación y selección es un sistema que permite seleccionar, por medios de presentación adecuados, los miembros individuales de la colección al unirse a los ligandos genéricos y/o diana.

5

Puede usarse cualquier sistema de presentación y selección junto con una colección de acuerdo con la invención. Los protocolos de selección para aislar los miembros deseados de colecciones grandes son conocidos en la técnica, según tipifican las técnicas de presentación en fagos. Dichos sistemas, en los que se presentan diversas secuencias peptídicas sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos (Scott y Smith (1990) referencia anterior), han demostrado ser útiles para crear colecciones de fragmentos de anticuerpos (y las secuencias de nucleótidos que los codifican) para la selección y amplificación *in vitro* de fragmentos de anticuerpos específicos que se unen a antígenos diana. Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones V_H y V_L se relacionan con los fragmentos de genes que codifican señales líder que las dirigen al espacio periplasmático en *E. coli* y como resultado, los fragmentos de anticuerpos resultantes se presentan sobre la superficie del bacteriófago, habitualmente en forma de fusiones a proteínas de la cubierta de los bacteriófagos (por ejemplo, pIII o pVIII). De forma alternativa, los fragmentos de anticuerpos se presentan externamente en cápsidas de fagos lambda (phagebodies). Una ventaja de los sistemas de presentación en fagos es que, debido a que son sistemas biológicos, los miembros seleccionados de la colección pueden amplificarse simplemente cultivando el fago que contiene el miembro seleccionado de la colección en células bacterianas. Además, dado que la secuencia de nucleótidos que codifican el miembro de la colección de polipéptidos está contenido en un vector fago o fagémido, la secuenciación, expresión y posterior manipulación genética son relativamente simples.

20

Los procedimientos para la construcción de colecciones de presentación de anticuerpos en bacteriófago y las colecciones de expresión de fagos lambda son notorias en la técnica (McCafferty y cols. (1990) referencia anterior; Kang y cols. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 4363; Clackson y cols. (1991) Nature, 352: 624; Lowman y cols. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Burton y cols. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 10134; Hoogenboom y cols. (1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133; Chang y cols. (1991) J. Immunol., 147: 3610; Breitling y cols. (1991) gen, 104: 147; Marks y cols. (1991) referencia anterior; Barbas y cols. (1992) referencia anterior; Hawkins y Winter (1992) J. Immunol., 22: 867; Marks y cols., 1992, J. Biol. Chem., 267: 16007; Lerner y cols. (1992) Science, 258: 1313, que se incorpora al presente documento por referencia).

30

Una estrategia particularmente ventajosa ha sido el uso de colecciones de scFv y fagos (Huston y cols., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883; Chaudhary y cols. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 1066-1070; McCafferty y cols. (1990) referencia anterior; Clackson y cols. (1991) referencia anterior; Marks y cols. (1991) referencia anterior; Chiswell y cols. (1992) Trends Biotech., 10: 80; Marks y cols. (1992) referencia anterior). Se han descrito diversas realizaciones de colecciones de scFv presentadas en proteínas de la cubierta de bacteriófagos. También se conocen mejoras de las estrategias de presentación en fagos, por ejemplo tal como se describe en los documentos WO96/06213 y WO92/01047 (Medical Research Council y cols.) y WO97/08320 (Morphosys, referencia anterior), que se incorporan al presente documento por referencia.

35

Otros sistemas para generar colecciones de polipéptidos o nucleótidos suponen el uso de maquinaria enzimática sin células para la síntesis *in vitro* de los miembros de la colección. En un procedimiento, se seleccionan moléculas de ARN mediante tandas de selección alternativas con un ligando diana y amplificación por PCR (Tuerk y Gold (1990) Science, 249: 505; Ellington y Szostak (1990) Nature, 346: 818). Puede usarse una técnica similar para identificar secuencias de ADN que se unen a un factor de transcripción humano predeterminado (Thiesen and Bach (1990) Nucleic Acids Res., 18: 3203; Beaudry y Joyce (1992) Science, 257: 635; documentos WO92/05258 y WO92/14843). De forma similar, puede usarse la traducción *in vitro* para sintetizar polipéptidos como procedimiento para generar colecciones grandes. Estos procedimientos, que generalmente comprenden complejos de polisomas establecidos, se describen de forma general en los documentos WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058, y WO92/02536. Los sistemas de presentación alternativos que no se basan en fagos, tal como los que se describen en los documentos WO95/22625 y WO95/11922 (Affymax) usan los polisomas para presentar los polipéptidos para su selección. Estos y todos los documentos anteriores también se incorporan al presente documento por referencia.

50

En un aspecto adicional la invención proporciona un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos indiferenciados, comprendiendo el procedimiento:

55

a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos constituidos por ácidos nucleicos que cada uno codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_H , en el que cada dominio V_H comprende la estructura canónica del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana,

60

b) introducir diversidad en los ácidos nucleicos comprendidos por dicha pluralidad proporcionando diversidad a uno o más restos aminoacídicos que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33 y H35 de una pluralidad de dichos dominios V_H ; y

65

c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de ácidos nucleicos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_H diversificados, teniendo los dominios V_H diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.

ES 2 321 566 T3

Todavía en un aspecto adicional la presente invención proporciona un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos, comprendiendo el procedimiento:

5 a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos constituidos por ácidos nucleicos que cada uno codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_L , en el que cada dominio V_L comprende la estructura canónica del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana,

10 b) introducir diversidad en los ácidos nucleicos comprendidos por dicha pluralidad proporcionando diversidad a uno o más restos aminoacídicos en una o más CDR de una pluralidad de dichos dominios V_L ; y

15 c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de ácidos nucleicos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_L diversificados, teniendo los dominios V_L diversificados la estructura canónica del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.

Todavía en un aspecto adicional la invención proporciona un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos indiferenciados, comprendiendo el procedimiento:

20 a) proporcionar una única secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_H , en el que el dominio V_H comprende la estructura canónica del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana,

25 b) amplificar e introducir diversidad en la secuencia de nucleótidos en uno o más restos aminoacídicos que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33 y H35, produciendo así una pluralidad de secuencias de nucleótidos diversas que codifican dominios V_H ; y

30 c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de secuencias de nucleótidos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_H diversificados, teniendo los dominios V_H diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.

En un aspecto adicional más la invención proporciona un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos indiferenciados, comprendiendo el procedimiento:

35 a) proporcionar una única secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_L , en el que el dominio V_L comprende las estructuras canónicas del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana,

40 b) amplificar e introducir diversidad en la secuencia de nucleótidos en uno o más restos aminoacídicos en una o más CDR de dicho dominio V_L ; produciendo así una pluralidad de secuencias de nucleótidos diversas que codifican dominios V_L ; y

45 c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de secuencias de nucleótidos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_L diversificados, teniendo los dominios V_L diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.

Preferiblemente, las etapas a-c se llevan a cabo usando un sistema de presentación en fagos.

50 Dado que la invención proporciona una colección de polipéptidos que tienen sitios de unión tanto para ligandos genéricos como diana, el procedimiento de selección anterior puede aplicarse a una selección usando o el ligando genérico o el ligando diana. De ese modo, puede seleccionarse la colección inicial usando el ligando genérico y después el ligando diana o usando el ligando diana y después los ligandos genéricos. La invención también proporciona selecciones múltiples usando diferentes ligandos genéricos o en paralelo o en serie antes o después de la selección con el ligando diana.

55 Preferiblemente, el procedimiento de acuerdo con la invención además comprende las etapas de someter los polipéptido(s) seleccionados a variación adicional (tal como se describe en el presente documento) y repetir las etapas a) a d).

60 Dado que el ligando genérico, por su propia naturaleza, es capaz de unirse a todos los miembros de la colección seleccionados usando el ligando genérico, el procedimiento de acuerdo con la invención además comprende el uso del ligando genérico (o algún conjugado del mismo) para detectar, inmovilizar, purificar o inmunoprecipitar cualquier miembro o población de miembros funcionales de la colección (ya sean seleccionados por la unión al ligando diana o no).

65 Dado que la invención proporciona una colección en la que los miembros tienen una conformación de las cadenas principales conocida, el procedimiento de acuerdo con la invención además comprende la producción de un modelo

estructural tridimensional de cualquier miembro de la colección funcional (ya sea seleccionado por la unión al ligando diana o no). Preferiblemente, la construcción de dicho modelo supone modelado por homología y/o sustitución molecular. Puede crearse un modelo preliminar de la conformación de las cadenas principales comparando la secuencia de polipéptidos con la secuencia de una estructura tridimensional conocida, mediante predicción de las estructuras secundarias o tamizando las colecciones estructurales. También puede usarse un programa de ordenador para predecir la estructura secundaria del polipéptido. Para predecir las conformaciones de las cadenas laterales en las posiciones variadas, puede emplearse una colección de rotámeros de las cadenas laterales.

En general, las moléculas de ácido nucleico y las construcciones de vectores necesarias para realizar la presente invención están disponibles en la técnica y pueden construirse y manipularse como se describe en los manuales de laboratorio estándar, tales como Sambrook y cols. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, USA.

La manipulación de ácidos nucleicos en la presente invención habitualmente se realiza en vectores recombinantes. Tal como se usa en el presente documento, vector se refiere a un elemento separado que se usa para introducir ADN heterólogo en células para la su expresión y/o replicación. Los procedimientos por los que se selecciona o construye y, posteriormente, el uso de dichos vectores son notorios para una persona de experiencia moderada en la técnica. Hay numerosos vectores disponibles para el público, que incluye plásmidos bacterianos, bacteriófagos, cromosomas artificiales y vectores episómicos. Dichos vectores pueden usarse para la clonación y mutagénesis simples; de forma alternativa, tal como es habitual con los vectores en los que se portan los miembros de los repertorios (o pre-repertos) de la invención, se emplea un vector de expresión génica. Un vector de uso de acuerdo con la invención puede seleccionarse para que acomode una secuencia que codifique polipéptidos de un tamaño deseado, habitualmente de 0,25 kilobases (kb) a 40 kb de longitud. Una célula huésped adecuada se transforma con el vector después de las manipulaciones de clonación *in vitro*. Cada vector contiene diversos componentes funcionales, que generalmente incluyen un sitio de clonación (o "polienlazador"), un origen de replicación y al menos un gen marcador seleccionable. Si un vector dado es un vector de expresión, adicionalmente posee uno o más de los siguientes: elemento potenciador, promotor, secuencias de terminación de la transcripción y de señal, cada uno localizado en el entorno del sitio de clonación, de tal forma que estén operablemente ligados al gen que codifica un miembro de un repertorio de polipéptidos de acuerdo con la invención.

Tanto los vectores de clonación como de expresión generalmente contienen secuencias de ácido nucleico que permiten al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Habitualmente, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son notorias para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen plasmídico de 2 micrómetros es adecuado para levaduras, y diversos orígenes víricos (por ejemplo SV40, adenovirus) son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, no es necesario un origen de replicación para los vectores de expresión mamíferos, a no ser que se usen en células de mamífero que tengan capacidad de replicar niveles elevados de ADN, tal como células COS.

De forma ventajosa, un vector de clonación o de expresión puede contener un gen de selección también denominado marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o multiplicación de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección por lo tanto no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan deficiencias auxotrópicas o proporcionan nutrientes críticos no disponibles en el medio de cultivo.

Dado que la replicación de vectores de acuerdo con la presente invención de la forma más conveniente se realiza en *E. coli*, se usa un marcador seleccionable en *E. coli*, por ejemplo, el gen de β -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Este puede obtenerse en plásmidos de *E. coli*, tales como pBR322 o un plásmido pUC tal como pUC18 o pUC19.

Los vectores de expresión habitualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está ligado operablemente a la secuencia codificante de interés. Dicho promotor puede ser inducible o constitutivo. El término "ligado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están relacionados de tal forma que les permite funcionar del modo que se pretende. Una secuencia de control "ligada operablemente" a una secuencia codificante está ligada de tal forma que se logra la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Los promotores adecuados para usar con huéspedes procariotas incluyen, por ejemplo, los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Los promotores para usar en sistemas bacterianos también contendrán generalmente una secuencia Shine-Dalgarno ligada operablemente a la secuencia codificante.

En la colección de acuerdo con la presente invención, los vectores preferidos son vectores de expresión que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos que corresponde a un miembro de una colección de polipéptidos. Así, la selección con ligandos genéricos y/o diana puede realizarse mediante propagación separada y expresión de

un único clon que expresa el miembro de la colección de polipéptidos o usando cualquier sistema de presentación y selección. Como se describe anteriormente, el sistema de presentación con selección preferido es la presentación en bacteriofagos. Así, pueden usarse vectores de fago o fagémidos. Los vectores preferidos son los vectores de fagémido que tienen un origen de replicación de *E. coli*. (para replicación bicatenaria) y también un origen de replicación de fagos (para la producción de ADN monocatenario). La manipulación y expresión de dichos vectores es notoria en la técnica (Hoogenboom y Winter (1992) referencia anterior; Nissim y cols. (1994) referencia anterior). En resumen, el vector contiene un gen de β -lactamasa para conferir selectividad a los fagémidos y un promotor las aguas arriba del un casete de expresión que está constituido por (del extremo N al C) una secuencia líder pelB (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplasmático), un sitio de clonación múltiple (para clonar la versión nucleotídica del miembro de la colección), opcionalmente, uno o más marcadores peptídicos (para la detección), opcionalmente, uno o más codones de terminación TAG y la proteína de fago pIII. Así, usando diversas cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* con la adición de glucosa, iso-propil tio- β -D-galactosida (IPTG) o un fago cooperador, tal como VCS M1, el vector puede replicarse en forma de un plásmido sin expresión, produciendo grandes cantidades del miembro de la colección de polipéptidos sólo fago producto, algunos de los cuales contienen al menos una copia de la fusión de polipéptido-pIII en su superficie.

La construcción de vectores de acuerdo con la invención emplea técnicas de ligado convencionales. Los vectores o fragmentos de ADN aislados se escinden, se hacen a medida y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar el vector requerido. Si se desea, puede realizar un análisis para confirmar que están presentes las secuencias correctas en el vector construido de la forma conocida. Los procedimientos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcritos *in vitro*, introducir el ADN en las células huésped, y realizar los análisis para evaluar la expresión y función son conocidos por los expertos en la técnica. Se detecta la presencia de una secuencia génica en una muestra, o se cuantifica su amplificación y/o expresión por procedimientos convencionales, tales como análisis por transferencia Southern o Northern, Western, transferencia en puntos de ADN, ARN o proteína, hibridación *in situ*, inmunocitoquímica o análisis de las secuencias de las moléculas de ácidos nucleicos o proteínas. Los expertos en la técnica fácilmente se imaginarán cómo pueden modificarse estos procedimientos, si se desea.

Mutagénesis usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez se ha elegido un sistema de vector y se han clonado una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de interés en el vector de la colección, se puede generar diversidad en las moléculas clonadas realizando la mutagénesis antes de la expresión; de forma alternativa, las proteínas codificadas pueden expresarse y seleccionarse, como se describe anteriormente, antes de realizar la mutagénesis y las tandas adicionales de selección. Tal como se ha indicado anteriormente, la mutagénesis de las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos estructuralmente optimizados se realiza mediante procedimientos moleculares estándar. Particularmente útil es la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, (Mullis y Faloona (1987) *Methods Enzymol.*, 155: 335, que se incorpora al presente documento por referencia). La PCR, que usa ciclos múltiples de replicación ADN catalizados por una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable para amplificar la secuencia diana de interés, es notoria en la técnica.

Los cebadores de oligonucleótidos útiles de acuerdo con la invención son moléculas de ADN o RNA monocatenarias que se hibridan con una sonda de ácido nucleico para cebar la síntesis enzimática de una segunda hebra de ácido nucleico. El cebador es complementario a una porción de una molécula diana presente en un conjunto de moléculas de ácido nucleico que se usa en la preparación de conjuntos de chips de la invención. Se contempla que dicha molécula se prepara mediante procedimientos de síntesis, o químicos o enzimáticos. De forma alternativa, dicha molécula o un fragmento de la misma es natural, y se aísla de su fuente natural o se compra de un proveedor comercial. Los cebadores oligonucleotídicos mutagénicos tienen de 15 a 100 nucleótidos de longitud, de forma ideal de 20 a 40 nucleótidos, aunque son útiles oligonucleótidos de diferente longitud.

Habitualmente, se produce una hibridación selectiva cuando dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente complementarias (al menos aproximadamente 65% de complementariedad en un tramo de al menos 14 a 25 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de complementariedad). Véase Kanehisa (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 203, que se incorpora al presente documento por referencia. Como resultado, se espera que se tolere un cierto grado de emparejamientos erróneos en el sitio de cebado. Dichos emparejamientos erróneos pueden ser pequeños, tal como un mononucleótido, dinucleótido o trinucleótido. De forma alternativa, puede comprender bucles de nucleótidos, que los presentes inventores definen como regiones en las que los emparejamientos erróneos engloban una serie ininterrumpida de cuatro o más nucleótidos.

Globalmente, cinco factores influyen sobre la eficacia y selectividad de la hibridación de un cebador a una segunda molécula de ácido nucleico. Estos factores, que son (i) longitud del cebador, (ii) la secuencia de nucleótidos y/o composición, (iii) temperatura de hibridación, (iv) composición del tampón y (v) el potencial de impedimento estérico en la región a la que debe hibridarse el cebador, son consideraciones importantes cuando no se diseñan secuencias cebadoras aleatorias.

Existe una correlación positiva entre la longitud del cebador y tanto la eficacia como la exactitud con la que un cebador se hibrida con una secuencia diana; las secuencias más largas tienen una temperatura de fusión mayor (T_M) que las más cortas, y tienen una menor probabilidad de repetirse en una secuencia diana dada, minimizando así la hibridación promiscua. Las secuencias de los cebadores con un alto contenido en G-C o que comprenden secuencias palindrómicas tienden a autohibridarse, al igual que sus supuestos sitios diana, dado que en solución se favorece la

cinética de hibridación unimolecular, en lugar de bimolecular; al mismo tiempo, es importante diseñar un cebador que contenga un número suficiente de parejas de nucleótidos G-C que se unan a la secuencia con fuerza, dado que cada uno de dichos pares está enlazado mediante tres enlaces de hidrógeno, en lugar de los dos que se encuentran cuando se emparejan las bases A y T. La temperatura de hibridación varía de forma inversa a la eficacia de hibridación del cebador, al igual que la concentración de disolventes orgánicos, por ejemplo formamida, que pueden incluirse en una mezcla de hibridación, mientras que el aumento de la concentración salina facilita la unión. En condiciones de hibridación restrictivas, las sondas más largas se hibridan de forma más eficaz que las más cortas, que son suficientes en condiciones más permisivas. Las condiciones de hibridación restrictivas habitualmente incluyen concentraciones salinas inferior a aproximadamente 1 M, más habitualmente menos de aproximadamente 500 mM y preferiblemente menos de aproximadamente 200 mM. Las temperaturas de hibridación varían desde 0°C a más de 22°C, más de aproximadamente 30°C, y (lo más a menudo) por encima de aproximadamente 37°C. Los fragmentos más largos pueden necesitar una temperatura de hibridación mayor para la hibridación específica. Dado que varios factores afectan a la restricción de la hibridación, la combinación de los parámetros es más importante que la medida absoluta de una cualquiera por sí sola.

Los cebadores se diseñan teniendo en mente estas consideraciones. Aunque un experto en la técnica puede hacer estimaciones de los méritos relativos de numerosas secuencias mentalmente, se han diseñado programas de ordenador para ayudar a evaluar estos diversos parámetros y la optimización de las secuencias de cebadores. Los ejemplos de dichos programas son "PrimerSelect" del paquete de programas DNASTar™ (DNASTar, Inc.; Madison, WI) y OLIGO 4.0 (National Biosciences, Inc.). Una vez diseñados, se preparan los oligonucleótidos adecuados mediante un procedimiento adecuado, por ejemplo el procedimiento de fosforamidita que describen Beaucage y Carruthers (1981) Tetrahedron Lett., 22: 1859) o el procedimiento de triésteres de acuerdo con Matteucci y Caruthers (1981) J. Am. Chem. Soc., 103: 3185, ambos de los cuales se incorporan al presente documento por referencia, o por otros procedimientos químicos usando o un sintetizador de oligonucleótidos automático comercial o tecnología VLSIPS™.

La PCR se realiza usando ADN sonda (al menos 1 µg; de forma más útil, 1-1000 ng) y al menos 25 pmol de cebadores oligonucleotídicos; puede ser ventajoso usar una cantidad mayor de cebador cuando el conjunto de cebadores es muy heterogéneo, ya que cada secuencia es representada únicamente por una pequeña fracción de las moléculas del conjunto, y las cantidades se vuelven limitantes en los posteriores ciclos de amplificación. Una mezcla de reacción típica incluye: 2Pl de ADN, 25 pmol de oligonucleótido cebador, 2,5 µl de 10X tampón de PCR 1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0,4 µl de dNTP 1,25 PM, 0,15 µl (o 2,5 unidades) de ADN polimerasa Taq (Perkin Elmer, Foster City, CA) y agua desionizada hasta un volumen total de 25 µl. Se cubre de aceite mineral y la PCR se realiza usando un ciclador térmico programable.

La longitud y temperatura de cada etapa de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajusta de acuerdo con los requisitos de restricción a utilizar. La temperatura de hibridación y el tiempo se determinan tanto por la eficacia con la que se espera que un cebador se hibride a una sonda y el grado de emparejamientos erróneos que deben tolerarse; obviamente, cuando se amplifican de forma simultánea las moléculas de ácido nucleico y se mutan, son necesarios emparejamientos erróneos, al menos en la primera tanda de síntesis. Cuando se intenta amplificar una población de moléculas usando un conjunto mixto de cebadores mutagénicos, la pérdida, en condiciones de hibridación restrictivas (temperatura elevada), de productos potencialmente mutantes que únicamente se producirían a bajas temperaturas de fusión se sopesa con la hibridación promiscua de los cebadores a secuencias distintas del sitio diana. La capacidad de optimizar la restricción de las condiciones de hibridación del cebador está fácilmente dentro del conocimiento de una persona de experiencia moderada en la técnica. Se usa una temperatura de hibridación de entre 30°C y 72°C. La desnaturalización inicial de las moléculas sonda normalmente se produce a entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguido de 20-40 ciclos que consisten en desnaturalización (94-99°C durante 15 segundos a 1 minuto), hibridación (la temperatura se determina tal como se describe anteriormente; 1-2 minutos), y extensión (72°C durante 1-5 minutos, dependiendo de la longitud del producto amplificado). La extensión final es generalmente durante 4 minutos a 72°C, y puede seguirse de una etapa indefinida (0-24 horas) a 4°C.

Análisis estructural de miembros del repertorio

Dado que la invención proporciona un repertorio de polipéptidos de conformación de las cadenas principales conocida, fácilmente se genera un modelo estructural tridimensional de cualquier miembro del repertorio. Habitualmente, la construcción de dicho modelo supone modelado por homología y/o sustitución molecular. Se crea un modelo preliminar de la conformación de las cadenas principales comparando la secuencia de polipéptidos con una secuencia similar de estructura tridimensional conocida, mediante predicción de las estructuras secundarias o tamizando las colecciones estructurales. Hay paquetes de programas de ordenador para la construcción de modelos moleculares y son útiles para predecir las estructuras secundarias de los polipéptidos. Para predecir las conformaciones de las cadenas laterales en las posiciones variadas, puede emplearse una colección de rotámeros de las cadenas laterales.

Anticuerpos para usar como as ligandos en la selección de polipéptidos

Un ligando genérico o diana a usar en la selección de los polipéptidos de acuerdo con la presente invención puede ser, en sí, un anticuerpo. Esto es particularmente cierto para los ligandos genéricos, que se unen a características estructurales que están sustancialmente conservadas en los polipéptidos funcionales a seleccionar para su inclusión en los repertorios de la invención. Si un anticuerpo apropiado no está disponible públicamente, puede producirse mediante metodología de presentación en fagos (véase más arriba) o de la forma siguiente:

ES 2 321 566 T3

Pueden usarse o proteínas recombinantes o las que se derivan de fuentes naturales para generar anticuerpos usando técnicas estándar, notorias para los expertos en el campo. Por ejemplo, se administra la proteína (o “inmunógeno”) para exponer a un mamífero tal como un mono, cabra, conejo o ratón. Los anticuerpos resultantes pueden recogerse en forma de suero policlonal, o pueden immortalizarse las células que producen anticuerpos del animal (por ejemplo por fusión con una pareja de fusión inmortalizante produciendo un hibridoma), células que después producen anticuerpos monoclonales.

a. Anticuerpos policlonales

La proteína antigénica se usa o sola o conjugada con un vehículo convencional para aumentar su capacidad inmunógena, y se forma un antisuero contra el conjugado de péptido y vehículo en un animal, como se describe anteriormente. El acoplamiento de un péptido a una proteína portadora y las inmunizaciones pueden realizarse como se describe (Dymecki y cols. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267: 4815). El suero se valora contra el antígeno proteínico mediante ELISA o de forma alternativa mediante transferencia en puntos o manchas (Boersma y Van Leeuwen (1994) *J. Neurosci. Methods*, 51: 317). Se demuestra que el suero reacciona potentemente con los péptidos apropiados mediante ELISA, por ejemplo, siguiendo los procedimientos de Green y cols. (1982) *Cell*, 28: 477.

b. Anticuerpos monoclonales

Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales son notorias, y los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando cualquier antígeno candidato, preferiblemente unido a un vehículo, tal como describen Arnheiter y cols. (1981) *Nature*, 294, 278. Los anticuerpos monoclonales se obtienen habitualmente de cultivos tisulares de hibridomas o de fluido de ascitis obtenido de animales en los que se introdujo el tejido del hibridoma. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales pueden describirse como que han sido “formados” contra una proteína o han sido “inducidos” por ella.

Después de ser formados, los anticuerpos monoclonales se analizan para determinar su función y especificidad mediante cualquiera de un número de medios. También pueden usarse procedimientos similares para analizar los anticuerpos recombinantes producidos por la presentación en fagos u otras tecnologías de selección *in vitro*. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales (o suero policlonal) también pueden tamizarse para determinar la unión de los anticuerpos al inmunógeno. Las pruebas inmunológicas particularmente preferidas incluyen inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencia e inmunoprecipitación (véase Voller, (1978) *Diagnostic Horizons*. 2: 1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller y cols. (1978) *J. Clin. Pathol.*, 31: 507; patente de Estados Unidos reespedita N.º 31.006; Patente del Reino Unido 2.019.408; Butler (1981) *Methods Enzymol.*, 73: 482; Maggio, E. (ed.), (1980) *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL) o radioinmunoensayos (RIA) (Weintraub, B., *Principles of radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, marzo de 1986, páginas 1-5, 46-49 y 68-78), todos para detectar la unión del anticuerpo al inmunógeno contra el que se formó. Para un experto en la técnica será obvio que o bien la molécula de anticuerpo o el inmunógeno deben estar marcados para facilitar dicha detección. Las técnicas para marcar las moléculas de anticuerpos son notorias para los expertos en la técnica (véase Harlour y Lane (1989) *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, páginas 1-726).

De forma alternativa, pueden usarse otras técnicas para detectar la unión al inmunógeno, confirmando así la integridad del anticuerpo que va a servir o bien como antígeno genérico o como antígeno diana de acuerdo con la invención. Estas incluyen procedimientos cromatográficos tales como SDS PAGE, enfoque isoeléctrico, transferencia Western, HPLC y electroforesis capilar.

Los “anticuerpos” se definen en el presente documento como construcciones que usan la región de unión (variable) de dichos anticuerpos, y otras modificaciones de los anticuerpos. De ese modo, un anticuerpo de utilidad en la invención puede comprender anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpos, agregados polifuncionales de anticuerpos, o en general cualquier sustancia que comprenda uno o más sitios de unión específicos de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser fragmentos tales como fragmentos F_v, Fab y F(ab')₂ o cualquier derivado de los mismo, tal como fragmentos F_v monocatenarios. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser no recombinantes, recombinantes o humanizados. El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgM, etc. Además, pueden usarse agregados, polímeros, derivados y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado.

La invención se describe adicionalmente, con fines ilustrativos, en los siguientes ejemplos.

Iones metálicos como ligandos para la selección de polipéptidos

Tal como se ha indicado anteriormente, pueden usarse ligandos distintos de los anticuerpos en la selección de polipéptidos de acuerdo con la invención. Una de dichas categorías de ligando es la de los iones metálicos. Por ejemplo, se puede querer preseleccionar un repertorio para determinar la presencia de un marcador funcional de histidina (HIS) usando una matriz Ni-NTA. La cromatografía por afinidad por metales (IMAC; Hubert y Porath (1980) *J. Chromatography*, 98: 247) se aprovecha de las propiedades de unión a metales de los restos aminoácidos de histidina y cisteína, así como de otros que pueden unirse a metales, sobre las superficies expuestas de numerosas proteínas. Emplea una resina, habitualmente agarosa, que comprende un quelante metálico bidentado (por ejemplo ácido iminodiacético, IDA, un grupo ácido dicarboxílico) que está complejado con iones metálicos; para generar una resina que porte iones

ES 2 321 566 T3

metálicos de acuerdo con la invención, se mezcla agarosa/IDA con una sal metálica (por ejemplo, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), de la que el IDA forma quelatos con los cationes divalentes. Una preparación de agarosa/IDA disponible en el mercado es "CHELATING SEPHAROSE 6B" (Farmacia Fine Chemicals; Piscataway, NJ). Los iones metálicos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, los cationes divalentes Ni_{2+} , Cu_{2+} , Zn_{2+} y Co_{2+} . Se prepara un conjunto de moléculas polipeptídicas en un tampón de unión que está constituido esencialmente por sal (habitualmente, NaCl o KCl) a una concentración de 0,1- a 1,0M y un ligando débil (tal como Tris o amoniaco), que tiene, este último, afinidad por los iones metálicos de la resina, pero a un grado menor que un polipéptido a seleccionar de acuerdo con la invención. Las concentraciones útiles del ligando débil varían desde 0,01- a 0,1M en el tampón de unión.

El conjunto de polipéptidos se pone en contacto con la resina en condiciones que permiten unirse a los polipéptidos que tienen dominios de unión a metales (véase más adelante); después se eliminan las impurezas por lavado, los polipéptidos seleccionados se eluyen con un tampón en el que hay presente un ligando débil en una concentración mayor que en el tampón de unión, específicamente a una concentración suficiente para que el ligando débil desplace a los polipéptidos seleccionados, a pesar de su menor afinidad de unión por los iones metálicos. Las concentraciones útiles del ligando débil en el tampón de elución son de 10 a 50 veces mayores que en el tampón de unión, habitualmente de 0,1 a 0,3 M; obsérvese que la concentración de sal en el tampón de elución es igual a la del tampón de unión. De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, los iones metálicos de la resina habitualmente funcionan como ligando genérico; sin embargo, se contempla que también pueden usarse como ligando diana.

La IMAC se realiza usando un aparato de cromatografía estándar (columnas, a través de las cuales el tampón es arrastrado por la gravedad, por vacío o por presión); de forma alternativa, se emplea un procedimiento de lotes grandes, en el que la resina que porta metales se mezcla, en forma de suspensión, con el conjunto de polipéptidos del que deben seleccionarse los miembros de un repertorio de la invención.

Se ha descrito la purificación parcial de proteína T4 en suero por IMAC (Staples y cols., patente de Estados Unidos n.º 5.169.936); sin embargo, el amplio espectro de proteínas que comprenden dominios de unión a metales expuestos en la superficie también engloba otras proteínas T4 solubles, proteínas serosas humanas (por ejemplo IgG, haptoglobina, hemopexina, Gc-globulina, Clq, C3, C4), desmoplasmina humana, lectina de *Dolichos biflorus*, Tyr(P) fosfatasa inhibidas por cinc, fenolasa, isoenzimas de carboxypeptidasa, superóxido dismutasa de Cu,Zn (que incluyen las de seres humanos y todos los otros eucariotas), nucleósido difosfatasa, interferón leucocitario, lactoferrina, glucoproteína α_2 -SH plasmática humana, macroglobulina β_2 , antitripsina α_1 , activador de plasminógeno, polipéptidos gastrointestinales, pepsina, albúmina serosa humana y bovina, proteínas granulocíticas de los granulocitos, lisozimas, proteínas distintas de histonas, fibrinógeno humano, transferrina serosa humana, linfotoxina humana, calmodulina, proteína A, avidina, mioglobinas, somatomedinas, hormona del crecimiento humana, factores de crecimiento transformantes, factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido natriurético auricular α humano, cardiodilatina y otros. Además, usando IMAC pueden purificarse secuencias del dominio extracelular de proteínas unidas a la membrana. Obsérvese que pueden producirse los repertorios que comprenden cualquiera de las proteínas o variantes que se unen a metales anteriores de acuerdo con los procedimientos de la invención.

Tras la elución, los polipéptidos seleccionados se eliminan del tampón de unión de metales y se introducen en un tampón apropiado para su siguiente uso. Si se han usado los iones metálicos para generar un primer conjunto de polipéptidos seleccionados de acuerdo con la invención, las moléculas de ese conjunto se introducen en un tampón que se optimiza por su unión al segundo ligando a utilizar en la selección de los miembros del repertorio de polipéptidos funcional. Si en vez de eso, el metal se usa en la segunda etapa de selección, los polipéptidos del repertorio se transfieren a un tampón adecuado o al almacén (por ejemplo un tampón de glicina al 0,5%) o el uso para el que se pretenden. Dichos tampones incluyen, pero sin limitación: agua, disolventes orgánicos, mezclas de agua y disolventes orgánicos miscibles en agua, tapones salinos fisiológicos y tampones de unión de proteína/ácido nucleico o proteína/proteína. De forma alternativa, las moléculas polipeptídicas pueden deshidratarse (es decir mediante liofilización) o inmovilizarse sobre un sólido o semisólido, tal como una membrana de filtración de nitrocelulosa o nylon o una matriz de gel (es decir de agarosa o poliacrilamida) o reticularse a una resina de cromatografía.

Las moléculas de polipéptido pueden eliminarse del tampón de elución mediante cualquiera de un número de procedimientos conocidos en la técnica. El fluido polipeptídico puede dializarse con agua u otra solución elegida; si los polipéptidos van a liofilizarse, se usa agua a la que se han añadido inhibidores de proteasas (por ejemplo pepstatina, aprotinina, leupeptina, u otros). De forma alternativa, la muestra puede someterse a precipitación con sulfato de amonio, que es notorio en la técnica, antes de la resuspensión en el medio elegido.

Uso de polipéptidos seleccionados de acuerdo con la invención

Los polipéptidos seleccionados de acuerdo con el procedimiento de la presente invención pueden emplearse sustancialmente en cualquier procedimiento que suponga la unión entre ligando y polipéptido, que incluye aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, aplicaciones de ensayo y reactivo *in vitro*, y similares. Por ejemplo, en el caso de los anticuerpos, pueden usarse moléculas de anticuerpos en técnicas de ensayo con base de anticuerpos, tales como técnicas de ELISA, de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Tal como se ha aludido anteriormente, las moléculas seleccionadas de acuerdo con la invención pueden usarse en procedimientos de diagnóstico, profilácticos y terapéuticos. Por ejemplo, pueden ensayarse variantes enzimáticas

generadas y seleccionadas mediante estos procedimientos para determinar la actividad, *in vitro* o *in vivo* usando técnicas notorias en la técnica, por las que se incuban con moléculas de sustrato candidatas y se analiza la conversión de sustrato en producto. Los receptores de la superficie celular o las moléculas de adhesión pueden expresarse en células cultivadas que después se analizan para determinar su capacidad de responder a estímulos bioquímicos o para 5 determinar su afinidad a otros tipos celulares que expresan moléculas en la superficie celular a las que sería de esperar que se unieran las moléculas de adhesión no diversificadas, respectivamente. Los polipéptidos de anticuerpos seleccionados de acuerdo con la invención se usan en diagnóstico mediante análisis por Western y en la detección de proteínas in sito mediante procedimientos inmunohistoquímicos estándar; para usar en estas aplicaciones, los anticuerpos de un repertorio seleccionado pueden marcarse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Además, dichos polipéptidos de anticuerpos pueden usarse de forma preparativa en procedimientos de cromatografía por afinidad, cuando 10 están complejados sobre un soporte cromatográfico, tal como una resina. Todas dichas técnicas son notorias para una persona de experiencia en la técnica.

Los usos terapéuticos y profilácticos de las proteínas preparadas de acuerdo con la invención implican la administración de polipéptidos seleccionados de acuerdo con la invención a un receptor mamífero, tal como un ser humano. De uso particular en este aspecto son anticuerpos, otros receptores (que incluyen, pero sin limitación receptores de linfocitos T) y en el caso en el que se haya usado un anticuerpo o receptor como ligando genérico o diana, proteínas que se unen a ellos. 15

Se prefieren los anticuerpos o proteínas que se unen a ellos sustancialmente puros de una homogeneidad de al menos 90 a 95% para la administración a un mamífero, y se prefiere más una homogeneidad del 98 a 99% o más para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o a homogeneidad, según se desee, los polipéptidos seleccionados pueden usarse en diagnóstico o terapia (que incluye de forma extracorpórea) o para desarrollar y realizar procedimientos de ensayos, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) *Immunological Methods*, Volúmenes I y II, Academic Press, NY). 20

Los anticuerpos seleccionados o proteínas de unión de los mismos de la presente invención habitualmente encontrarán uso en la prevención, supresión o tratamiento de estados de inflamación, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica, y trastornos autoinmunitarios (que incluyen, pero sin limitación, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y miastenia grave). 30

En la presente solicitud de patente, el término “prevención” implica la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. “Supresión” se refiere a la administración de la composición después de un evento inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. “Tratamiento” implica la administración de la composición protectora después de que los síntomas de la enfermedad se hayan manifestado. 35

Hay disponibles sistemas de modelos animales que pueden usarse para tamizar la eficacia de los anticuerpos o proteínas de unión de los mismos en la protección o tratamiento de la enfermedad. Los procedimientos para analizar el lupus eritematoso sistémico (SLE) en los ratones susceptible son conocidos en la técnica (Knight y cols. (1978) *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten y cols. (1978) *New Eng. J. Med.*, 299: 515). La miastenia grave (MG) se analiza en ratones SJL/J hembra induciendo la enfermedad con proteína AchR soluble de otra especie (Lindstrom y cols. (1988) *Adv. Immunol.*, 42: 233). La artritis se induce en una cepa de ratones susceptible mediante inyección de colágeno de tipo II (Stuart y cols. (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). Se ha descrito un modelo por el que se induce la artritis adyuvante en ratas susceptibles mediante inyección de la proteína de choque término de micobacterias (Van Eden y cols. (1988) *Nature*, 331: 171). La tiroiditis se induce en ratones mediante la administración de tiroglobulina tal como se ha descrito (Maron y cols. (1980) *J. Exp. Med.*, 152: 1115). La diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) se produce de forma natural o puede inducirse en ciertas cepas de ratones tal como las descritas por Kanasawa y cols. (1984) *Diabetologia*, 27: 113. EAE en ratones y ratas sirve de modelo de MS en los seres humanos. En este modelo, la enfermedad desmielinizante se induce mediante la administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986) *Textbook of Immunopathology*, Mischer y cols., ed., Grune y Stratton, Nueva York, páginas 179-213; McFarlin y cols. (1973) *Science*, 179: 478; y Satoh y cols. (1987) *J. Immunol.*, 138: 179). 40 45 50

También pueden usarse los anticuerpos seleccionados, receptores (que incluyen, pero sin limitación receptores de linfocitos T) o las proteínas de unión de los mismos de la presente invención combinados con otros anticuerpos, de forma particular anticuerpos monoclonales (MAb) reactivos con otros marcadores de las células humanas responsables de la enfermedad. Por ejemplo, los marcadores de linfocitos T adecuados pueden incluir los agrupados en los denominados “Clústeres de diferenciación”, como los se han denominado en The First International Leukocyte Differentiation Workshop (Bernhard y cols. (1984) *Leukocyte Typing*, Springer Verlag, NY). 55 60

En general, los presentes anticuerpos seleccionados, receptores o proteínas de unión se utilizarán en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Habitualmente, estos vehículos incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones, acuosas o de alcohol/agua, que cualquiera incluye medio salino y/o tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y solución de lactato de Ringer. Los adyuvantes fisiológicamente adecuados, si fuera necesario para mantener un complejo de polipéptidos en suspensión, pueden elegirse a partir de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los de base de dextrosa de Ringer. También puede haber presentes conservantes y otros aditivos, tales como 65

antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición).

Los polipéptidos seleccionados de la presente invención pueden usarse como composiciones que se administran por separado o junto con otros agentes. Estos pueden incluir diversos fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diversos agentes citotóxicos u otros junto con los anticuerpos seleccionados, receptores o proteínas de unión de los mismos de la presente invención, o incluso combinaciones de polipéptidos seleccionados de acuerdo con la presente invención que tienen diferentes especificidades, tales como polipéptidos seleccionados usando diferentes ligandos diana, hayan sido combinados o no antes de la administración.

La vía de administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de las conocidas comúnmente por las personas de experiencia ordinaria en la técnica. Para la terapia, que incluye sin limitación inmunoterapia, los anticuerpos seleccionados, receptores o proteínas de unión de los mismos de la invención pueden administrarse a cualquier paciente de acuerdo con técnicas estándar. La administración puede ser por cualquier modo apropiado, que incluye vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, por vía pulmonar, o también, de forma apropiada por infusión directa con un catéter. La dosis y frecuencia de administración dependerá de la edad, sexo y estado del paciente, de la administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros a tomar en cuenta por el clínico.

Los polipéptidos seleccionados de esta invención pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de su uso. Se ha demostrado que esta técnica es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Los expertos en la técnica apreciarán que la liofilización y la reconstitución pueden provocar grados variables de pérdida de la actividad de los anticuerpo (por ejemplo con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos de IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos de IgG) y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse al alza para compensar.

Las composiciones que contienen los presentes polipéptidos seleccionados o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para lograr una inhibición, supresión modulación, muerte, o algún otro parámetro cuantificable al menos parcial de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades necesarias para lograr esta dosis dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del sistema inmunitario del propio paciente, pero generalmente variará de 0,005 a 5,0 mg de anticuerpo seleccionado, receptor (por ejemplo un receptor de linfocito T) o proteína de unión del mismo por kilogramo de peso corporal, siendo más habitual el uso de dosis de 0,05 a 2.0 mg/kg/dosis. Para las aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes polipéptidos seleccionados o cócteles de los mismos también pueden administrarse en dosis similares o ligeramente menores.

Una composición que contiene un polipéptido seleccionado de acuerdo con la presente invención puede utilizarse en entornos profilácticos y terapéuticos para ayudar a la alteración, inactivación, muerte o eliminación de una población de células diana seleccionada en un mamífero. Además, los repertorios de polipéptidos seleccionados que se describen en el presente documento pueden usarse de forma extracorpórea o *in vitro* selectivamente para matar, mermar o eliminar de otro modo de forma eficaz una población de células diana de una colección de células heterogénea. La sangre de un mamífero puede combinarse de forma extracorpórea con los anticuerpos seleccionados, receptores de la superficie celular o proteínas de unión de los mismos mediante lo cual las células no deseadas se exterminan o se eliminan por otros medios de la sangre para devolverlas al mamífero de acuerdo con técnicas estándar.

La invención se describe adicionalmente, con fines ilustrativos, en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Diseño de la colección de anticuerpos

A. Conformación de las cadenas principales

Para cinco de los seis bucles de unión de antígenos de los anticuerpos humanos (L1, L2, L3, H1 y H2) hay un número limitado de conformaciones de las cadenas principales, o estructuras canónicas ((Chothia y cols. (1992) J. Mol. Biol., 227: 799; Tomlinson y cols. (1995) EMBO J., 14: 4628; Williams y cols. (1996) J. Mol. Biol., 264: 220). Se usa la conformación más popular de las cadenas principales para cada uno de estos bucles proporcionando una única conformación de las cadenas principales conocida de acuerdo con la invención. Estas son: H1 - CS 1 (79% del repertorio expresado), H2 - CS 3 (46%), L1 - CS 2 de L1 - CS 2 de V_{κ} (39%), L2 - CS 1 (100%), L3 - CS 1 cd V_{κ} (36%). El bucle H3 forma un número limitado de conformaciones de las cadenas principales para longitudes de los bucles cortas (Martin y cols. (1996) J. Mol. Biol., 263: 800; Shirai y cols. (1996) FEBS Letters, 399: 1). De ese modo, cuando el H3 tiene una longitud de CDR3 (según definen Kabat y cols. (1991). Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Department of Health and Human Services) de siete restos y tiene un resto lisina o arginina en la posición H94 y un resto aspartato en la posición H101, se forma un puente salino entre estos dos restos y en la mayoría de los casos es probable que se de una única conformación de las cadenas principales. Existen al menos

ES 2 321 566 T3

16 secuencias de anticuerpos humanos en la colección de datos de EMBL con la longitud de H3 y los restos clave necesarios para formar esta conformación y al menos dos estructuras cristalográficas en el banco de datos de proteína que pueden usarse como base para modelar anticuerpos (2cgr y 1tet).

5 En este caso, los segmentos de genes de la línea germinal expresados con mayor frecuencia que codifican las longitudes de los bucles deseadas y restos clave para producir las combinaciones de estructuras canónicas requeridas son el segmento 3-23 de V_H (DP-47), el segmento de JH JH4b, el segmento de V_K 02/012 (DPK9) y el segmento de J_K J_K1 . Estos segmentos pueden usarse por lo tanto combinados como base para construir una colección con la conformación única de las cadenas principales deseada. El segmento V_K 02/O12 (DPK9) es miembro de la familia de V_K1 y por lo tanto se unirá al superantígeno Proteína L. El segmento V_H 3-23 (DP-47) a miembro de la familia de V_H3 y por lo tanto debería unirse al superantígeno Proteína A, que después puede usarse como ligando genérico.

B. Selección de posiciones para su variación

15 El análisis de las secuencias V_H y V_K humanas indica que las posiciones más diversas del repertorio maduro son las que forman el mayor número de contactos con los antígenos (véase Tomlinson y cols., (1996) J. Mol. Biol., 256: 813; Figura 1). Estas posiciones forman el sitio de unión de antígenos funcional y son por lo tanto seleccionadas para diversificación de las cadenas laterales (Figura 2). H54 es un resto clave y apunta hacia afuera del sitio de unión de antígenos de la estructura canónica 3 de H2 elegida (la diversidad que se observa en esta posición se debe a las estructuras canónicas 1, 2 y 4 en las que H54 apunta al sitio de unión). En este caso se diversifica H55 (que apunta hacia el sitio de unión). La diversidad en estas posiciones se crea o mediante diversidad de la línea germinal o de uniones en el repertorio primario o por hipermutación somática (Tomlinson y cols., (1996) J. Mol. Biol., 256: 813; Figura 1). Por lo tanto se variaron dos subconjuntos diferentes de restos en el sitio de unión de antígenos para crear dos formatos de colección diferentes. En la colección "primaria", los restos seleccionados para su variación son de H2, H3, L2 y L3 (la diversidad en estos bucles se debe principalmente a la diversidad de la línea germinal o de las uniones). Las posiciones que se varían en esta colección son: H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 y L96 (18 restos en total, Figura 2). En la colección "somática", los restos seleccionados para su variación son de H1, H3, L1 y el final de L3 (la diversidad aquí se debe principalmente a la hipermutación somática o diversidad de las uniones). Las posiciones que se varían en esta colección son: H31, H33, H35, H95, H96, H97, H98, L30, L31, L32, L34 y L96 (12 restos en total, Figura 2).

C. Selección de uso de aminoácidos en las posiciones a variar

35 La diversidad de las cadenas laterales se introduce en las colecciones "primaria" y "somática" mediante incorporación o del codón NNK (que codifica los 20 aminoácidos, que incluyen los codones de terminación TAG, pero no los codones de terminación TGA y TAA) o el codón DVT (que codifica 22% de serina y 11% de tirosina, asparragina, glicina, alanina, aspartato, treonina y cisteína y usando degeneración única, doble, triple y cuádruple en proporciones iguales en cada posición, imitan muy bien la distribución de los restos aminoacídicos para los sitios de unión de antígenos de los anticuerpos humanos naturales).

40 Ejemplo 2

Construcción de colecciones y selección con los ligandos genéricos

45 Las colecciones "primaria" y "somática" se ensamblaron por PCR usando los oligonucleótidos que se enumeran en la Tabla 1 y los segmentos de genes V de la línea germinal DPK9 (Cox y cols. (1994) Eur. J. Immunol., 24: 827) y DP-47 (Tomlinson y cols. (1992) J. Mol. Biol., 227: 7768). En resumen, se realizó una primera tanda de amplificación usando pares de cebadores (inversos) 5' junto con NNK o cebadores (directos) 3' de DVT junto con el correspondiente segmento del gen V de la línea germinal como sonda (véase la Tabla 1). Esto produce ocho fragmentos de ADN separados para cada una de las colecciones NNK y DVT. Después se realizó una segunda tanda de amplificación usando los cebadores (inversos) 5' y los cebadores (directos) 3' que se muestran en la Tabla 1 junto con dos de los fragmentos purificados de la primera tanda de amplificación. Esto produce cuatro fragmentos distintos para cada una de las colecciones NNK y DVT (un fragmento de V_H "primaria", 5A; un fragmento de V_K "primaria" 6A; un fragmento de V_H "somática", 5B; y un fragmento de V_K "somática", 6B).

55 Cada uno de estos fragmentos se cortó y después se ligó en pCLEANVH (para los fragmentos de V_H) o pCLEANVK (para los fragmentos de V_K) que contienen dominios V_H y V_K falsos, respectivamente en una de pHEN1 que no contiene ningún codón TAG ni marcadores peptídicos (Hoogenboom & Winter (1992) J. Mol. Biol., 227: 381). Las ligaciones después se electroporaron en la cepa de *E. coli*. no supresora HB2151. Se produjeron fagos de cada una de estas colecciones y se seleccionaron por separado usando inmunotubos recubiertos con 10 μ g/ml de los ligandos genéricos Proteína A y Proteína L para las colecciones de V_H y V_K , respectivamente. Después se preparó ADN de *E. coli*. infectado con fagos seleccionados y se cortó de forma que los insertos de V_K falsos se reemplazaron por las colecciones de V correspondientes. La electroporación de estas colecciones produce los siguientes tamaños de las colecciones de insertos: $9,21 \times 10^8$ (NNK "primaria"), $5,57 \times 10^8$ (DVT "primaria"), $1,00 \times 10^9$ (NNK "somática") y $2,38 \times 10^8$ (DVT "somática"). Como control para la preselección, se crearon cuatro colecciones adicionales pero sin seleccionar con los ligandos genéricos Proteína A y Proteína L: los tamaños de las colección de insertos para estas colecciones eran de $1,29 \times 10^9$ (NNK "primaria"), $2,40 \times 10^8$ (DVT "primaria"), $1,16 \times 10^9$ (NNK "somática") y $2,17 \times 10^8$ (DVT "somática").

ES 2 321 566 T3

Para verificar el éxito de la etapa de preselección, se clonó ADN de las colecciones NNK “primaria” seleccionadas y no seleccionadas en un vector de expresión de base pUC y se electroporaron en clones HB2151 96 se escogieron aleatoriamente de cada colección reclonada y se indujeron para la expresión de fragmentos ScFv solubles. La producción de scFv funcionales se ensaya mediante ELISA usando Proteína L para capturar el scFv y después conjugado de Proteína A-HRP para detectar la unión. Únicamente los scFv que expresan los dominios V_H y V_L funcionales (sin cambios de marco, codones de terminación, mutaciones de plegamiento o expresión) producirán una señal usando este ensayo. El número de anticuerpos funcionales en cada colección (señales ELISA por encima del nivel de ruido de fondo) era del 5% con la colección de NNK “primaria” no seleccionada y 75% con la versión seleccionada de la misma (Figura 3). La secuenciación de los clones que daban negativo en el ensayo confirmó la presencia de cambios de marco, codones de terminación, mutaciones por PCR en restos críticos de la región estructural y aminoácidos en el sitio de unión de antígenos que deben evitar el plegamiento y/o expresión.

Ejemplo 3

15 *Selección de colecciones contra ligandos diana*

Las colecciones NNK “primaria” y “somática” (sin preselección) se seleccionaron por separado usando cinco antígenos (ubiquitina bovina, BIP de rata, histona de rata, NIP-BSA y ovalisozima de gallina) que recubrían inmunotubos a diversas concentraciones. Después de 2-4 tandas de selección, se obtuvieron anticuerpos muy específicos contra todos los antígenos excepto la ovalisozima de gallina. Los clones se seleccionaron aleatoriamente para su secuenciación demostrando una variedad de anticuerpos contra cada antígeno (Figura 4).

En la segunda fase, se mezclaron fagos de las colecciones NNK y DVT preseleccionadas 1:1 creando una única colección “primaria” y una única colección “somática”. Estas colecciones después se seleccionaron por separado usando siete antígenos (FITC-BSA, leptina humana, tiroglobulina humana, BSA, ovalisozima de gallina, IgG murina e IgG humana) que recubrían inmunotubos a diversas concentraciones. Después de 2-4 tandas de selección, se obtuvieron anticuerpos muy específicos contra todos los antígenos incluida la ovalisozima de gallina que no produjo positivos en la anterior fase de selección usando la colecciones que no habían sido preseleccionadas usando el ligando genérico. Los clones se seleccionaron aleatoriamente para su secuenciación demostrando una variedad de anticuerpos diferentes contra cada antígeno (Figura 4).

Ejemplo 4

35 *Efecto de la preselección sobre la expresión de scFv y sobre la producción de fagos que portan scFv*

Para verificar adicionalmente el resultado de la preselección, se clona ADN las colecciones DVT “primaria” no seleccionadas y preseleccionadas en un vector de expresión con base de pUC y se electroporaron en HB2151, proporcionando 10^5 clones en ambos casos. Se escogen 96 clones de forma aleatoria de cada colección reclonada y se induce la expresión de fragmentos ScFv solubles. Se vuelve a ensayar la producción de scFv funcionales usando Proteína L para capturar el scFv seguido del uso de Proteína A-HRP para detectar el scFv unido. El porcentaje de anticuerpos funcionales de cada colección es de 35,4% (no seleccionadas) y 84,4% (preseleccionadas) lo que indica un aumento de 2,4 veces del número de miembros funcionales como resultado de la preselección con Proteína A y Proteína L (el aumento es menos pronunciado que con la colección NNK equivalente dado que el codón DVT no codifica el codón de terminación TAG. En la colección NNK no seleccionada, la presencia de un codón de terminación TAG en una cepa no supresora tal como HB2151 provocará terminación y por lo tanto evitará la expresión de scFv funcionales. La preselección de la colección NNK elimina los clones que contienen codones de terminación TAG produciendo una colección en la que una elevada proporción de miembros expresan scFv soluble).

Para evaluar el efecto de la preselección de la colección DVT “primaria” sobre la expresión total de scFv, se inducen las colecciones no seleccionadas y preseleccionadas reclonadas (que contenían cada una 10^5 clones en un vector de expresión con base de pUC) para la expresión policlonal de fragmentos ScFv. Después se determina la concentración de scFv expresados en el sobrenadante incubando diluciones de dos veces (columnas 1 -12 de la Figura 5a) de los sobrenadantes sobre una placa ELISA recubierta con Proteína L, seguida de la detección con Proteína A-HRP. Se ensayan ScFv de concentración conocida en paralelo para cuantificar los niveles de expresión de scFv en las colecciones DVT no seleccionadas y preseleccionadas. Estos se usan para representar una curva de patrones (Figura 5b) y a partir de esto se calculan los niveles de expresión de las colecciones DVT “primarias” no seleccionadas y preseleccionadas a 12,9 $\mu\text{g/ml}$ y 67,1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente es decir un aumento de 5,2 veces en la expresión debido a la preselección con Proteína A y Proteína L.

Para evaluar la cantidad de fago que portan scFv, se cultivan las colecciones DVT “primarias” no seleccionadas y preseleccionadas y se producen fagos policlonales. Se procesan volúmenes iguales de fagos de las dos colecciones en condiciones desnaturizantes en un gel Bis-Tris NuPAGE al 4-12% con tampón de procesamiento MES. El gel resultante se somete a transferencia Western, se sonda usando un anticuerpo contra pIII y se expone a una película de rayos X (Figura 6). La banda inferior en cada caso corresponde a una proteína pIII sola, mientras que la banda superior contiene la proteína de fusión pIII-scFv. La cuantificación de las intensidades de las bandas usando el paquete de programas NIH image indica que la preselección produce un aumento de 11,8 veces de la cantidad de proteína de fusión presente en el fago. De hecho, el 43% de la pIII total en el fago preseleccionado existe en forma de fusión de pIII-scFv, lo que sugiere que la mayoría de las partículas de fagos tendrán al menos un scFv presentado en la superficie.

ES 2 321 566 T3

Por lo tanto, no sólo la preselección usando ligandos genéricos permite el enriquecimiento de miembros funcionales de un repertorio sino que también produce una selección preferencial de los miembros que están bien expresados y (si fuera necesario) pueden provocar un gran nivel de presentación en la superficie de fagos sin ser escindidos por las proteasas bacterianas.

5

TABLA 1

Cebadores de PCR para el ensamblaje de colecciones de anticuerpos “primarias” y “somáticas”

10

1ª tanda de amplificación

Sonda

1A DP-41 5' cebador (inverso) GAGGTCCAGCTGTTGGAGT

15

DVT 3' cebador (directo)

GCCCTTCACGGAGTCTCCGTAMRRTGMNMRACCMNMMNNAATMNNTGAGACCCACT
CCAGCCC

20

NNK 3' cebador (directo)

TABHTGACACCCACTCCACCCCGCCCTTCACGGACTCTGCGTAABHTGTABHABHACCABHA
BHAA

2A DP-47 5' cebador (inverso) DVT 3'CGCAGACTCCGTGAAGGGC

25

cebador (directo)

TCCCTGGCCCCAGTAGTCAAAMNNHNNMHNMMNNTTTCGCACAGTAATATACGG

NNK 3' cebador (directo)

TCCGTGGCCCCAGTAGTCAAAABHABHABHABHTTTCGCACAGTAATATACGG

30

3A DPK9 5' cebador (inverso) GACATCCAGATGACCCAGTC

DVT 3' cebador (directo)

ATGGGACCCCACTTTGCAAMNNGGATGCMNNATAGATCAGGAGCTTAGGGG

NNK 3' cebador (directo)

ATGGGACCCCACTTTGCAAABHGGATGCABHATAGATCAGGAGCTTAGCCG

35

4A DPK9 5' cebador (inverso) ' TTGCAAAGTGGGGTCCCAT

DVT 3' cebador (directo)

CTTGGTCCCTTGCCGAACGTMNNAGGMNMMNMMNMMNCTGTTGACAGTAGTAAGTTGC

40

NNK 3' cebador (directo)

CTTGGTCCCTTGCCGAACGTABNAGGABHABHABHABHCTGTTGACAGTAGTAAGTTGC

1B DP-47 5' cebador (inverso) GAGGTGCAGCTGTTGGAGTC

DVT 3' cebador (directo)

45

CTGGAGCCTCGCGGACCCAMNNCATNNMATAMNNGCTAAAGGTGAATCCAGAG

NNK 3' cebador (directo)

CTGGAGCCTGGCGGACCCAABHCATABHATAABHGCTAAAGGTGAATCCAGAG

2B DP-47 5' cebador (inverso) TGGGTCCGCCAGGCTCCAG

50

DVT 3' cebador (directo)

TCCCTGGCCCCAGTAGTCAAAMNNMMNMMNMMNNTTTCGTAATATACGG

NNK 3' cebador (directo)

TCCCTGGCCCCAGTAGTCAAAABHABHABHABHTTTCGCACAGTAATATACGG

55

3B DPK9 5' cebador (inverso) GACATCCAGATGACCCAGTC

DVT 3' cebador (directo)

CTGGTTTCTGCTGATACCAMNNTAAMNNMMNMMNNAATGCTCTGACTTGCCCGG

60

NNK 3' cebador (directo)

CTGGTTTCTGCTGATACCAABHTAAABHABHABHAATGCTCTGACTTGCCCGG

4B DPK9 5' cebador (inverso) TGGTATCAGCAGAAACCAGGG

DVT 3' cebador (directo)

65

CTTGGTCCCTTGCCGAACGTMNNAGGGGTAAGTCTGTTGACAGTACTAAGTTGC

NNK 3' cebador (directo)

CTTGGTCCCTTGCCGAACGTABHAGGGGTAAGTCTGTTGACAGTAGTAAGTTGC

ES 2 321 566 T3

2ª tanda de amplificación

Sonda

5A 1A/2A 5' cebador (inverso)
5 GTCCTCGCAACTCCC GCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTC
3' cebador (directo)
GAACCGCCTCCACCGCTCGAGACGGTCACCAGGGTCCCTGGCCCCAGTAGCTCAAA
10 6A 3A/4A 5' cebador (inverso)
ACCGGTGGAGGGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCGACGGACATCCAG
ATGACCCAGTC
3' cebador (directo)
15 GAGTCATTCTCGACTTGCGCCGCCCGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAACG
5B 1B/2B 5' cebador (inverso)
GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGAAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTC
3' cebador (directo)
20 GAACCGCCTCCACCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTCCCTGGCGAACCGCCCAGTAGTCA
AATCAM
6B 3B/4B 5' cebador (inverso)
25 AGCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGTGGCGGGTCGACGGACATCCAGAT
GACCCAGTC
3' cebador (directo)
30 GAGTCATTCTCGACTTGCGCCGCCCGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAACG
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Una colección indiferenciada de polipéptidos de anticuerpos humanos, en la que todos los miembros funcionales comprenden un dominio V_H que comprende un bucle hipervariable que tiene la estructura canónica del bucle hipervariable H1 codificada por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana, en la que dicho bucle se diversifica cambiando dicho bucle en una o más posiciones que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33 y H35.
2. Una colección indiferenciada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho bucle está cambiado en cada una de las posiciones H31, H33 y H35.
3. La colección de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 en la que los dominios V_H además comprenden un bucle hipervariable que tiene la estructura canónica del bucle hipervariable H2 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.
4. Una colección de polipéptidos de anticuerpos, en la que los miembros funcionales comprenden un dominio V_L , comprendiendo dicho dominio un bucle hipervariable que tiene la estructura canónica del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana, en la que uno o más de dichos bucles hipervariables se diversifica cambiando uno o más de dichos bucles hipervariables en una o más posiciones durante lo cual el aminoácido residente es reemplazado por un aminoácido diferente.
5. La colección de la reivindicación 4 en la que los dominios V_L además comprenden un bucle hipervariable que tiene la estructura canónica del bucle hipervariable L2 codificada por el segmento DPK9 del gen V_H de la línea germinal humana.
6. La colección de la reivindicación 4, en la que dicho bucle hipervariable se diversifica cambiando dicho bucle en una o más posiciones que se seleccionan a partir del grupo constituido por L30, L31, L32 y L34.
7. La colección de la reivindicación 5, en la que dicho bucle se diversifica cambiando dicho bucle en una o más posiciones que se seleccionan a partir del grupo constituido por L50 y L53.
8. La colección de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichos polipéptidos de anticuerpos comprenden la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1-113 de la Fig 2.
9. La colección de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que dichos polipéptidos de anticuerpos comprenden la secuencia de aminoácidos de las posiciones 130-237 de la Fig 2.
10. La colección de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 u 8, en la que dichos polipéptidos de anticuerpos además comprenden una secuencia de polipéptidos de V_L .
11. La colección de la reivindicación 10, en la que dicha secuencia de polipéptidos de V_L es una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 5 a 8 ó 10.
12. La colección de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 ó 9, en la que dichos polipéptidos de anticuerpos además comprenden una secuencia de polipéptidos de V_H .
13. La colección de la reivindicación 12, en la que dicha secuencia de polipéptidos de V_H es una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4 ó 9.
14. La colección de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, 6, 10 u 11 en la que los miembros de dicha colección se unen al ligando genérico Proteína A.
15. La colección de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, 9, 10 u 11 en la que los miembros de dicha colección se unen al ligando genérico Proteína L.
16. La colección de cualquier reivindicación precedente en la que dichos polipéptidos de anticuerpos son polipéptidos scFv o Fab.
17. La colección de cualquier reivindicación precedente, en la que dichos bucles se diversifican a través del uso de un codón NNK, un codón DVT o un codón DVY.
18. Un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos indiferenciados, comprendiendo el procedimiento:
- a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos constituidos por ácidos nucleicos que cada uno codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_H , en el que cada dominio V_H comprende la estructura canónica del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana,

ES 2 321 566 T3

b) introducir diversidad en los ácidos nucleicos comprendidos por dicha pluralidad proporcionando diversidad a uno o más restos aminoacídicos que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33 y H35 de una pluralidad de dichos dominios V_H ; y

5 c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de ácidos nucleicos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_H diversificados, teniendo los dominios V_H diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.

10 19. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, que además comprende la etapa:

(d) seleccionar la colección contra un ligando diana contra el que no se han seleccionado los polipéptidos de los anticuerpos de la etapa (a).

15 20. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18 o con la reivindicación 19, en el que cada dominio V_H además comprende un bucle H2 que tiene la estructura canónica del bucle H2 del segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.

20 21. Un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos, comprendiendo el procedimiento:

a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos constituidos por ácidos nucleicos que cada uno codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_L , en el que cada dominio V_L comprende la estructura canónica del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana,

25 b) introducir diversidad en los ácidos nucleicos comprendidos por dicha pluralidad proporcionando diversidad a uno o más restos aminoacídicos en una o más CDR de una pluralidad de dichos dominios V_L ; y

30 c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de ácidos nucleicos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_L diversificados, teniendo los dominios V_L diversificados la estructura canónica del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.

22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la colección de V_L es indiferenciada.

35 23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18 o con la reivindicación 19, en el que cada dominio V_L además comprende un bucle L2 que tiene la estructura canónica del bucle L2 del segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.

40 24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, en el que en la etapa (a), dicha pluralidad de ácidos nucleicos son idénticos.

25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, en el que en la etapa (a), dicha pluralidad de ácidos nucleicos codifican dominios variables idénticos.

45 26. Un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos indiferenciados, comprendiendo el procedimiento:

50 a) proporcionar una única secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_H , en el que el dominio V_H comprende la estructura canónica del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana,

55 b) amplificar e introducir diversidad en la secuencia de nucleótidos en uno o más restos aminoacídicos que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33 y H35, produciendo así una pluralidad de secuencias de nucleótidos diversas que codifican dominios V_H ; y

60 c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de secuencias de nucleótidos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_H diversificados, teniendo los dominios V_H diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable H1 codificado por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.

27. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, en el que cada dominio V_H además comprende un bucle H2 que tiene la estructura canónica del bucle H2 del segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.

65 28. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26 o con la reivindicación 27, en el que la única secuencia de nucleótidos de la etapa (a) codifica el segmento DP-47 de la línea germinal humana.

29. Un procedimiento de preparar una colección de polipéptidos de anticuerpos, comprendiendo el procedimiento:

ES 2 321 566 T3

- a) proporcionar una única secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de anticuerpo que comprende un dominio V_L , en el que el dominio V_L comprende las estructuras canónicas del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana,
- 5 b) amplificar e introducir diversidad en la secuencia de nucleótidos en uno o más restos aminoacídicos en una o más CDR de dicho dominio V_L ; produciendo así una pluralidad de secuencias de nucleótidos diversas que codifican dominios V_L ; y
- c) expresar los polipéptidos codificados por dicha pluralidad de secuencias de nucleótidos, mediante lo cual se produce una colección de polipéptidos de anticuerpos que comprenden dominios V_L diversificados, teniendo los dominios V_L diversificados las estructuras canónicas del bucle hipervariable L1 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.
- 10
30. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, en el que cada dominio V_L además comprende un bucle L2 que tiene la estructura canónica del bucle L2 del segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.
- 15
31. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29 o con la reivindicación 30, en el que la colección de V_L es indiferenciada.
- 20
32. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 31, en el que dicha diversidad se introduce a través del uso de un codón NNK, un codón DVT o un codón DVY.
33. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 32, en el que dicha diversidad se introduce en posiciones seleccionadas de dicha pluralidad de dominios variables.
- 25
34. El procedimiento de la reivindicación 33 en el que dicha diversidad se introduce en uno o más de los restos aminoacídicos que se seleccionan a partir del grupo constituido por H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H95, H96, H97 y H98 codificados por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana; o del grupo constituido por L30, L31, L32, L34, L50 y L53 codificado por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.
- 30
35. El procedimiento de la reivindicación 34 en el que dicha diversidad se introduce en cada uno de los restos aminoacídicos H31, H33 y H35 codificados por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana.
- 35
36. El procedimiento de la reivindicación 34 en el que dicha diversidad se introduce en cada uno de los restos aminoacídicos H31, H33', H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H95, H96, H97 y H98 codificados por el segmento DP-47 del gen V_H de la línea germinal humana; o del grupo constituido por L30, L31, L32, L34, L50 y L53 codificados por el segmento DPK9 del gen V_L de la línea germinal humana.
- 40
37. El uso de una colección indiferenciada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la selección de una molécula de anticuerpo contra un ligando diana, en el que la colección indiferenciada comprende moléculas de anticuerpos que no tienen especificidad por un ligando diana predeterminado.
- 45
38. El uso de una colección indiferenciada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la selección de una molécula de anticuerpo contra un ligando diana, en el que las moléculas de anticuerpos comprendidos por la colección no han sido preseleccionadas con el ligando diana.

50

55

60

65

Figura 1

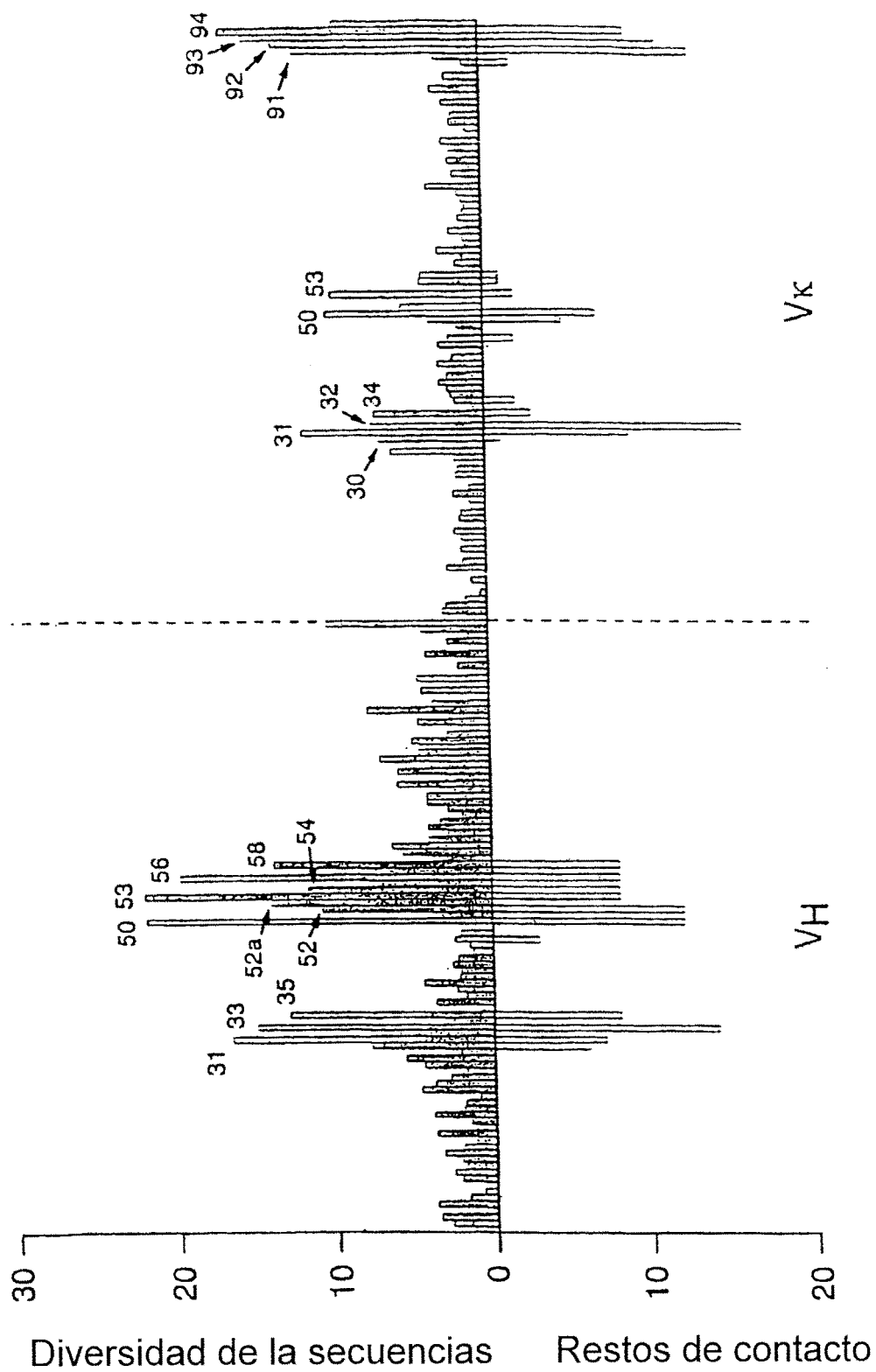


Figura 2

113 H19 H20 H30
 E V Q L L E S G C L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

114 H19 H20 H30
 S Y A M S W V R Q A P G K G L E H V S A I S C S G G S T Y Y
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

115 H19 H20 H30
 A D S V K G R F Y I S R D N S K H I L Y L G H H S L I R A E D
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

116 H19 H20 H30
 T A V Y Y C A K S Y G A F D Y K G Q T G V T V S S G G G
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

117 H19 H20 H30
 S G G G G S G G S T D I G M Y Q S P S S L S A S V G G R
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

118 H19 H20 H30
 Y T I Y C R A S Q S I S S Y L M W Y Q D K P G K A F K L L I
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

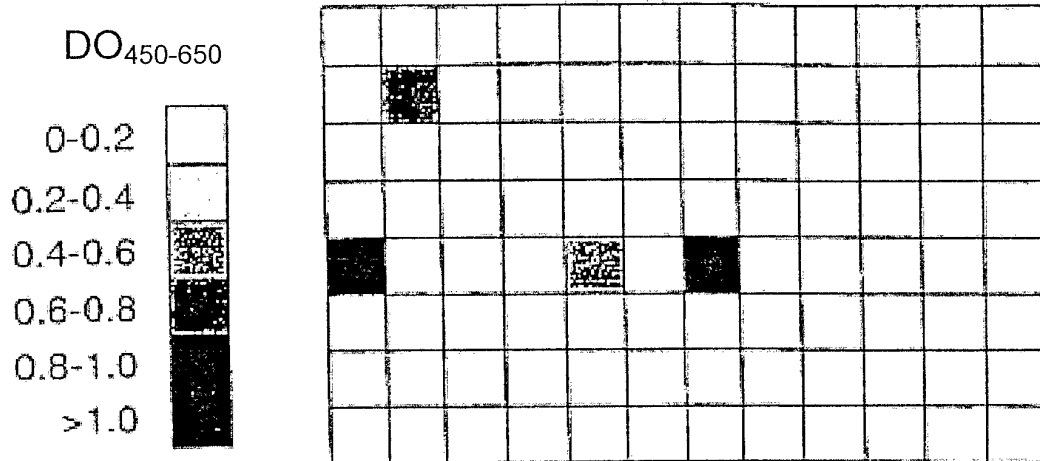
119 H19 H20 H30
 Y A A S S L Q S G V P S R F B G S G S G T D F T L T I S S L
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

120 H19 H20 H30
 Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S Y P N T F G G Q T K V E I K R
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

121 H19 H20 H30
 CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAT CAA CAG ATT TCC AGT ACT OCT GAT
 GAG GAG CAG CTG TTG GAG TGT GCA GGC TTT GTA CAG CCG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

- Diversificadas únicamente en la colección "primaria"
- Diversificadas únicamente en la colección "somatica"
- Diversificadas en las colecciones "primaria" y "somatica"

Colección NKK "primaria" antes de la preselección



Colección NKK "primaria" después de la preselección

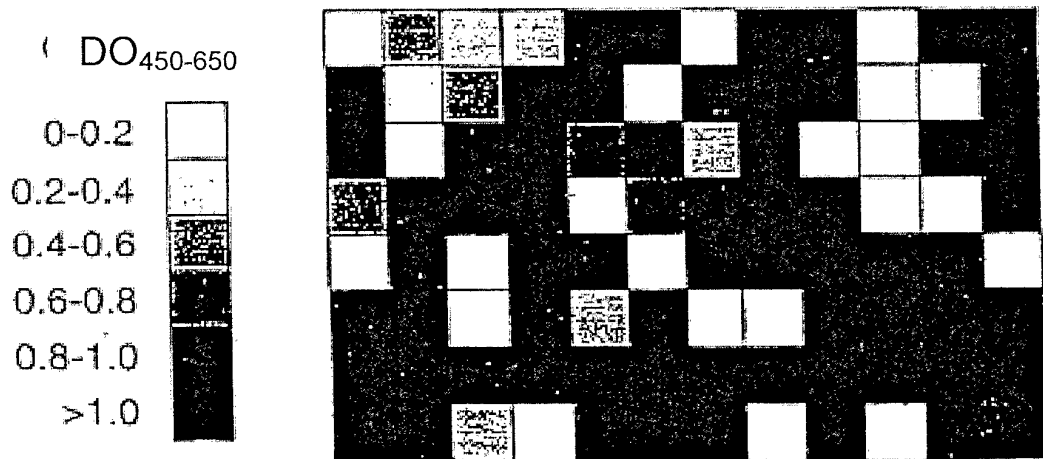


FIGURA 3

Figura 4 Cadena pesada (estructura DP47) Cadena ligera (estructura DPk9)

Clones	Antígeno	Colección	CDRH1	CDR2	CDR3	CDRH1	CDR2	CDR3	No. ^a
LSA 1.9	Ubicultina	VNK prim	SYAMS	IGSEGMETIYADSVKG	ESGAFDY	FASGSSISYLN	FASLLOS	COSSNTPVT	9
LSB 1.3-10	bobina	VNK som	AYAMT	ADSGGGSTIYADSVKG	KASSFDY	FASGSSISYLN	MASSLOS	COSSYSTPST	9
BPA 1.3-6.9	BIP rata	VNK prim	SYAMS	ISELGGKTSYADSVKG	FAGFDY	FASGSSISYLN	FASBLOS	COYRUFPLT	5
BPA 4			SYAMS	GHEWGGNTSYADSVKG	GHLFDY	FASGSSISYLN	YASLLOS	COYLLDPVT	1
BPA 5,7,9			SYAMS	ANXGGMITDYADSVKG	GSDAFDY	FASGSSISYLN	QASFLQS	COEYNNKPEIT	3
BPB 1-4,6-10		NNK som	NYGMH	AISGGGGSTIYADSVKG	GTRIFDY	FASGSSISYLN	MASSLOS	COSSYSTPVT	9
HSA 1,2,7-8	Histona	VNK prim	SYAMS	AISEKGGHEITDYADSVKG	RDKLFDY	FASGSSISYLN	FASLLOS	COEYNNKPEIT	4
HSA 6	bovina		SYAMS	RITPAGRETIYADSVKG	ESPPFDY	FASGSSISYLN	FASLLOS	COGQHEPILT	1
HSA 3.9			SYAMS	RITPAGHEITDYADSVKG	QVSEFDY			.	2
HSA 10			SYAMS	ITSEQLEITDYADSVKG	GEPEFDY			.	1
HSA 4			SYAMS	ITSEKGGSTIYADSVKG	INLSPDY	FASGSSISYLN	FASBLOS	COEYNNKPEIT	1
HSA 1.3		NNK som	KYRME	AISGGGGSTIYADSVKG	GRMPPDY	FASGSSISYLN	MASSLOS	COSSYSTPST	2
HSA 6			EYEMH	AISGGGGSTIYADSVKG	NERPFDY	FASGSSISYLN	MASSLOS	COSSYSTPST	1
HSA 2			EYEMG	AISGGGGSTIYADSVKG	GYPGFDY	FASGSSISYLN	MASSLOS	COSSYSTPST	1
HSA 4,7,9			EYEMG	AISGGGGSTIYADSVKG	QYTRFDY	FASGSSISYLN	MASSLOS	COSSYSTPST	3
HSA 5,8			EYEMG	AISGGGGSTIYADSVKG	GYPKFDY	FASGSSISYLN	MASSLOS	COSSYSTPST	2
MPA 27,10	MP-BSA	NNK prim	SYAMS	RIPAGTIVTHYADSVKG	QCELFDY	FASGSSISYLN	FASLLOS	COSSYKRPIT	3
MPA 3			SYAMS	GSHIGSEITDYADSVKG	RHKGFY	FASGSSISYLN	FASLLOS	COGYPFPAT	1
MPA 5,6,9			SYAMS	RIPAGESEITDYADSVKG	GSLVAFDY	FASGSSISYLN	FASBLOS	COSEYAFIT	3
MPA 1,8			SYAMS	ITSLGKTEITDYADSVKG	SFHLFDY	FASGSSISYLN	KASLLOS	COEISEFPAT	2

Figura 4 (cont)

NIP B1	"	NNK som	RYGMH	AISGGGGSTYYADSVKG	RGLGFDY	RASQSISSYYLN	AASSLOS	QOQSYSTRLT	1
NIP B2,4,7	"	"	SYEMW	AISGGGGSTYYADSVKG	RCMAFDY	RASQSIHSELS	AASSLOS	QOQSYSTRLT	4
NIP B5,6	"	"	KYNMH	AISGGGGSTYYADSVKG	ARWRFDY	RASQSISSYYLN	AASSLOS	QOQSYSTRIT	2
NIP B8	"	"	RYEMH	AISGGGGSTYYADSVKG	TPRPFDY	RASQSIKAGLS	AASSLOS	QOQSYSTRNT	1
NIP B9	"	"	RYEMH	AISGGGGSTYYADSVKG	TPRPFDY	RASQSIENLL	AASSLOS	QOQSYSTRLT	1
10 CG 1	FTIC-BSA	NNK prim	SYAMS	ISPYGKQTRYADSVKG	KSOHFDY	RASQSISSYYLN	AASELOS	QOEIGGGPPT	1
10 CG 2	"	"	SYAMS	ITPRGSLTSYADSVKG	TAPFDY	RASQSISSYYLN	RASELOS	QOQSRFKPST	1
10 CG 3	"	"	SYAMS	GISAYGTVYYADSVKG	BRAGFDY	RASQSISSYYLN	RASELOS	QOQRFIMFGIT	1
10 CG 5	"	"	SYAMS	SINSGLATAYADSVKG	RSRFDY	RASQSISSYYLN	HASELOS	QOQHINPPT	1
10 CG 6	"	"	SYAMS	GIITFGQITRYADSVKG	TYRFDY	RASQSISSYYLN	NASELOS	QOQKLSPT	1
10 CG 7	"	NNK som	SYAMS	TIPAFGCHTRYADSVKG	SAKAFDY	RASRRISSYYLN	QASNLOS	QOQBSAGPPT	1
10 DH 1	"	"	MYEMG	AISGGGGSTYYADSVKG	HIFRFDY	RASQSISSRLS	AASSLOS	QOQSYSTRPPT	1
10 DH 2,3	"	"	SYAMT	AISGGGGSTYYADSVKG	KTGMFDY	RASQSIHTBLE	AASSLOS	QOQSYSTRPPT	2
11 CG 1	Leptina h	NNK prim	SYAMS	AINRFGSATRYADSVKG	YUHTFDY	RASQSISSYYLN	RASELOS	CHIFGLRPGT	1
11 CG 2,3	"	"	SYAMS	AINRFGSATRYADSVKG	YUHTFDY	RASQSISSYYLN	AASALOS	QOQDLRFPST	2
11 DH 2	"	NNK som	RYEMW	AISGGGGSTYYADSVKG	RPSIFDY	RASQSIKQNL	AASSLOS	QOQSYSTRPST	1
11 DH 3	"	NNK prim	RYEMW	AISGGGGSTYYADSVKG	RPSIFDY	RASQSIKQRH	AASSLOS	QOQSYSTRPST	1
12 CG 1,2	Tiroglobulina n	"	SYAMS	SIAPAGRHTRYADSVKG	NIRIFDY	RASQSISSYYLN	SASELOS	QOQRAGTPTVT	2
12 CG 3	"	"	SYAMS	GIMTIGRITRYADSVKG	NSMIFDY	RASQSISSYYLN	QASELOS	QOQRLRPPPT	1
12 DH 1,2,3	"	NNK som	RYEMS	AISGGGGSTYYADSVKG	GFAFDY	RASQSIKRVLT	AASSLOS	QOQSYSTRIT	3
13 CG 1	BSA	NNK prim	SYAMS	ITASGPNTRYADSVKG	NHSIFDY	RASQSISSYYLN	RASELOS	QOQRTAPPT	1
13 CG 2	"	DVT prim	SYAMS	ITVYAGSNTRYADSVKG	GYTIFDY	RASQSISSYYLN	YASNLOS	QOQDLSRPT	1

Figura 4 (cont)

13CG3	"	NNK pirm	SYAMS	<u>M</u> Y <u>P</u> GGY <u>T</u> KYADSVKG	<u>N</u> AD <u>L</u> FDY	RASOSISSYLN	IASFILOS	CO <u>M</u> RF <u>R</u> KPAT	1
13DH1	"	NNK som	<u>L</u> Y <u>N</u> VY	AISGGGGSTYYADSVKG	<u>E</u> W <u>S</u> RFDY	RASOSISKSJ	AASSLOS	COOSY <u>S</u> TP <u>K</u> T	1
13DH2	"	"	<u>G</u> Y <u>M</u> S	AISGGGGSTYYADSVKG	<u>T</u> H <u>D</u> SFDY	RASOSIDRYLN	AASSLOS	COOSY <u>S</u> TP <u>I</u> T	1
13DH3	"	NNK pirm	<u>B</u> Y <u>O</u> M <u>Y</u>	AISGGGGSTYYADSVKG	<u>H</u> L <u>S</u> RFDY	RASOSIKYNLA	AASSLOS	COOSY <u>S</u> TP <u>P</u> ET	1
14CG 12:	Ovolisozima		SYAMS	<u>E</u> I <u>L</u> PRGHFTAYADSVKG	<u>S</u> G <u>H</u> FDY	RASOSISSYLN	IASFILOS	CO <u>R</u> K <u>L</u> LP <u>E</u> T	3
	De gallina	NNK som							
14DH23	"	NNK som	<u>Y</u> Y <u>E</u> M <u>L</u>	AISGGGGSTYYADSVKG	<u>P</u> F <u>M</u> SFDY	RASOSIHODLY	AASSLOS	COOSY <u>S</u> TP <u>P</u> ET	2
19CG 13	IgG murina	DVT prim	SYAMS	<u>S</u> IG <u>S</u> GGY <u>G</u> IGYADSVKG	<u>G</u> Y <u>Y</u> SFDY	RASOSISSYLN	DASSLOS	CO <u>S</u> D <u>S</u> SP <u>Y</u> T	2
19DH2	"	NNK pirm	<u>D</u> Y <u>M</u> S	AISGGGGSTYYADSVKG	<u>D</u> G <u>A</u> GFDY	RASOSIGSLS	AASSLOS	COOSY <u>S</u> TP <u>N</u> T	1
20CG 1	IgG humana	NNK som	SYAMS	<u>A</u> IS <u>G</u> L <u>G</u> K <u>G</u> THYADSVKG	<u>G</u> Y <u>S</u> RFDY	RASOSISSYLN	IASFILOS	CO <u>L</u> G <u>I</u> FP <u>P</u> ET	1
20DH1	"	"	<u>B</u> Y <u>E</u> M <u>S</u>	AISGGGGSTYYADSVKG	<u>S</u> W <u>T</u> LFDY	RASOSIFINLD	AASSLOS	COOSY <u>S</u> TP <u>P</u> ET	1
20DH2	"	IgG humana	<u>B</u> Y <u>E</u> M <u>S</u>	AISGGGGSTYYADSVKG	<u>S</u> W <u>T</u> LFDY	RASOSIGTLLE	AASSLOS	COOSY <u>S</u> TP <u>N</u> T	1

* de los clones secuenciados

Figura 5a

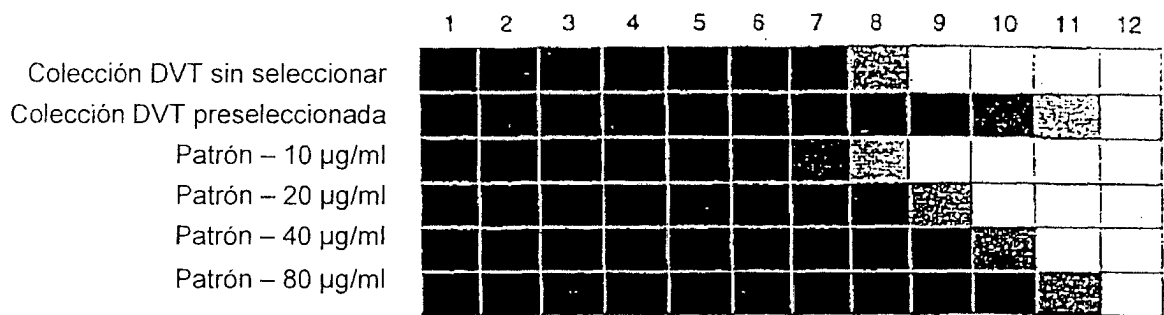


Figura 5b

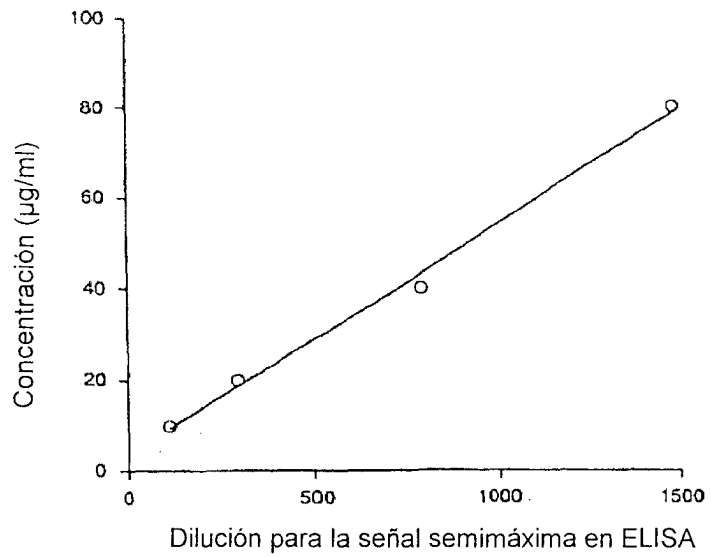


Figura 6

