

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 725 673**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/70** (2006.01)  
**C07K 14/005** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)  
**C40B 40/02** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013 PCT/US2013/038497**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13163602**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 13780660 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2841606**

---

(54) Título: **Proteínas de fusión para facilitar la selección de células infectadas con virus vaccinia recombinante de gen de inmunoglobulina específica**

(30) Prioridad:

**26.04.2012 US 201261639046 P**  
**03.12.2012 US 201261732776 P**  
**15.03.2013 US 201313844388**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.09.2019**

(73) Titular/es:

**VACCINEX, INC. (100.0%)**  
**1895 Mt. Hope Avenue**  
**Rochester, NY 14620, US**

(72) Inventor/es:

**SMITH, ERNEST S.;**  
**PANDINA, TRACY;**  
**BALCH, LESLIE A.;**  
**PARIS, MARK;**  
**ZAUDERER, MAURICE;**  
**MOKSA, ANGELIKA y**  
**KIRK, RENEE**

(74) Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 725 673 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**

Proteínas de fusión para facilitar la selección de células infectadas con virus vaccinia recombinante de gen de inmunoglobulina específica.

## Antecedentes de la invención

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de alta eficiencia para expresar moléculas de inmunoglobulina en partículas de virus vaccinia, por ejemplo, viriones EEV, y/o en células huésped, un método para producir bibliotecas de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina para la expresión en partículas de virus vaccinia, por ejemplo, viriones EEV, y/o células eucarióticas y métodos de aislamiento de inmunoglobulinas que unen antígenos específicos. La invención también se refiere a proteínas de fusión usadas para expresar moléculas de inmunoglobulina en partículas de virus vaccinia, por ejemplo, viriones EEV, o en células huésped.

## 10 Técnica Relacionada

## Producción de inmunoglobulina

15 Se emplean anticuerpos de especificidad definida en un número creciente de aplicaciones terapéuticas diversas. Se han utilizado varios métodos para obtener anticuerpos útiles para uso terapéutico humano. Estos incluyen anticuerpos químicos y humanizados y anticuerpos totalmente humanos seleccionados de bibliotecas, por ejemplo, bibliotecas de presentación de fagos, o de animales transgénicos. Las bibliotecas de inmunoglobulina construidas en bacteriófagos pueden derivar de células productoras de anticuerpos de individuos no tratados o inmunizados específicamente y podrían, en principio, incluir emparejamientos nuevos y diversos de cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humana. Aunque esta estrategia no presenta una limitación de repertorio intrínseco, requiere que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del fragmento de inmunoglobulina expresado se sintetizan y se doblen adecuadamente en células bacterianas. Muchas regiones de unión al antígeno, sin embargo, son difíciles de ensamblar correctamente como una proteína de fusión en células bacterianas. Además, la proteína no sufrirá modificaciones postraduccionales eucariotas normales. Como resultado, este método impone un filtro selectivo diferente sobre las especificidades del anticuerpo que se pueden obtener. Alternativamente, los anticuerpos totalmente humanos pueden ser aislados de bibliotecas en sistemas eucarióticos, por ejemplo, presentación de levadura, presentación retroviral o expresión en virus ADN, como poxvirus. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 7,858,559 y el documento US 2005/266425 A1. También, el documento EP 1 516 932A1 se refiere a una partícula poxviral que tiene una especificidad de infección dirigida por una porción de ligando heterólogo presente en la superficie de dicha partícula poxviral y describe que las partículas poxviral pueden identificarse mediante la selección de una biblioteca de partículas poxviral.

20 30 35 La presente invención permite una expresión eficiente de una biblioteca de anticuerpos totalmente humanos sobre la superficie del virus vaccinia, un virus de mamífero envuelto. De manera similar a la presentación de fagos, se utilizan condiciones en las que cada virión de vaccinia expresa una sola inmunoglobulina, por ejemplo, un anticuerpo o scFV, sobre su superficie.

40 Sin embargo, en la presente invención, se han desarrollado diversos métodos basados en la exploración (*panning*) y en perlas magnéticas para seleccionar bibliotecas de viriones vaccinia-MAb para seleccionar virus recombinantes que codifican anticuerpos específicos. Cuando se infectan las células de mamíferos, el anticuerpo no solo se incorpora en el virus recién producido, sino que también se visualiza en la superficie de la célula huésped. Esto permite estrategias de selección eficientes, que combinan los beneficios de la selección de viriones vaccinia-MAb en un sistema de *panning* libre de células, seguido por la selección basada en células para una alta especificidad y optimización de anticuerpos.

45 Esto difiere de otras tecnologías en el campo que expresan un único scFV pero no expresan una biblioteca. Además, se diseñan otras tecnologías para redirigir la infección de vaccinia a través del scFV para terapia génica, que no se usan para el descubrimiento de anticuerpos. Adicionalmente, la tecnología actual difiere de la tecnología anterior al utilizar EEV en lugar de IMV y también mediante la utilización de diferentes proteínas de fusión (por ejemplo, A56R).

## Compendio de la invención

La invención es conforme se define en las reivindicaciones.

50 En ciertos aspectos, la invención se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina fusionado al extremo N de (a) un segmento polipeptídico que consiste en los aminoácidos 117 a 421 de la SEQ ID NO: 11, que es el dominio CH1 de la IgG1 humana fusionada a la región del tallo, el dominio transmembrana y el dominio intracelular de la proteína A56R del virus vaccinia o (b) un segmento polipeptídico que consta de los aminoácidos 117 a 653 de la SEQ ID NO: 30, que es la región constante completa de la IgG1 humana fusionada a la región del tallo, el dominio transmembrana y el dominio intracelular de una proteína A56R de un virus vaccinia; donde la proteína de fusión puede expresarse en la superficie de una partícula de virus

vaccinia con envoltura extracelular (EEV) y donde la proteína de fusión, cuando se combina con un dominio variable de cadena ligera, puede formar un dominio de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina.

En ciertos aspectos, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión. En ciertas realizaciones, el polinucleótido comprende nucleótidos de la SEQ ID NO: 10 que codifica los aminoácidos 108 a 314 de A56R de la cepa del virus vaccinia de Western Reserve. En ciertas realizaciones, el polinucleótido codifica los aminoácidos 215 a 421 de la SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, el polinucleótido comprende nucleótidos de la SEQ ID NO: 10 que codifica los aminoácidos 215 a 421 de la SEQ ID NO: 11.

En ciertos aspectos, la invención se refiere a un vector de virus vaccinia que comprende dicho polinucleótido.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que comprende dicho vector de virus vaccinia.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a una biblioteca de vaccinia recombinante, que comprende una biblioteca de polinucleótidos que codifican una pluralidad de polipéptidos de fusión de inmunoglobulina que comprenden diferentes regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina, donde cada polipéptido de fusión de inmunoglobulina, en orden N- a C-terminal, comprende un dominio variable de cadena pesada fusionado a un dominio constante CH1 fusionado a un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica EEV, donde la biblioteca de polinucleótidos se construye en un vector de virus vaccinia y donde cada polinucleótido en la biblioteca comprende los siguientes elementos:

(a) un cebador polinucleótido que codifica un cebador segmento polipeptídico que comprende un dominio de cadena pesada IgG CH1;

20 (b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo segmento polipeptídico que comprende la región del tallo, el dominio transmembrana y el dominio intracelular de la proteína de membrana específica EEV del virus vaccinia A56R, situada en dirección descendente respecto del cebador polinucleótido que codifica el cebador segmento del polipéptido; y

25 (c) un tercer polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina o un fragmento de ella en dirección ascendente respecto del cebador polinucleótido que codifica el cebador segmento polipeptídico;

donde la proteína de fusión de inmunoglobulina se puede expresar en la superficie de una partícula de vaccinia EEV y la proteína de fusión se puede combinar con una cadena ligera de inmunoglobulina para formar un dominio de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión comprende aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 que corresponde a los aminoácidos de secuencia polipeptídica 108 a 314 de A56R de la cepa del virus vaccinia de Western Reserve. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión comprende aminoácidos 215 a 421 de la SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión comprende aminoácidos 215 a 421 de la SEQ ID NO: 11 que corresponde a los aminoácidos de secuencia polipeptídica 108 a 314 de A56R de la cepa del virus vaccinia de Western Reserve.

35 En otro aspecto, la invención comprende métodos, como se indica en las reivindicaciones, para la selección de polinucleótidos que codifican un región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina de unión al antígeno o fragmento de unión al antígeno de esta, que comprende: (a) introducir la biblioteca de polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de inmunoglobulina en una población de células huésped permisivas para la infectividad del virus vaccinia; (b) introducir uno o más polinucleótidos que codifican una cadena ligera de inmunoglobulina en la población de células huésped, donde una proteína de fusión de inmunoglobulina es capaz de combinarse con una cadena ligera de inmunoglobulina para formar un dominio de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina; (c) permitir la liberación de virus envueltos extracelulares (EEV) de las células huésped; (d) poner en contacto los EEV liberados con un antígeno y (e) recuperar los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina expresados en la superficie de la membrana de EEV que se unen específicamente al antígeno en la etapa (d).

45 En una realización, los métodos comprenden además: (f) introducir los polinucleótidos recuperados en (e) en una segunda población de células huésped permisivas para la infectividad del virus vaccinia; (g) introducir uno o más polinucleótidos que codifican una cadena ligera de inmunoglobulina en la población de células huésped, de manera que se forme un dominio de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina; (h) permitir la liberación de virus envueltos extracelulares (EEV) de las células huésped; (i) poner en contacto los EEV liberados con un antígeno y (j) recuperar los polinucleótidos de la biblioteca que codifican los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina expresados en la superficie de la membrana de EEV que se unieron al antígeno en la etapa (i).

En ciertas realizaciones, los pasos (f)-(j) se repiten una o más veces, con lo que se enriquece a los polinucleótidos de la biblioteca que codifican los polipéptidos de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina expresados en la superficie de la membrana de EEV que se unen específicamente al antígeno.

55 En ciertas realizaciones, los polinucleótidos recuperados de la biblioteca están aislados.

La divulgación también proporciona un método para seleccionar polinucleótidos que codifican una molécula de inmunoglobulina de unión al antígeno o un fragmento de unión al antígeno de esta, que comprende: (a) introducir una primera biblioteca, que es una biblioteca de conformidad con la invención, en una población de células huésped permisivas para la infectividad del virus vaccinia; (b) introducir una segunda biblioteca en la población de células huésped, donde en la segunda biblioteca comprende una pluralidad de polinucleótidos que codifican una cadena ligera de inmunoglobulina, donde el polipéptido de fusión de inmunoglobulina es capaz de combinarse con la cadena ligera de inmunoglobulina para formar una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno de esta; (c) permitir la expresión del polipéptido de fusión de inmunoglobulina de las células huésped; (d) recoger el polipéptido de fusión de inmunoglobulina de las células huésped; (e) poner en contacto el polipéptido de fusión de inmunoglobulina recogido con un antígeno y (f) recuperar los polinucleótidos de la primera biblioteca que codifican los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina que son específicos para el antígeno.

En una realización, el método proporcionado comprende además: (g) introducir los polinucleótidos recuperados en (f) en una segunda población de células huésped permisivas para la infectividad del virus vaccinia; (h) introducir en la segunda población de células huésped la segunda biblioteca de polinucleótidos; (i) permitir la expresión del polipéptido de fusión de inmunoglobulina de las células huésped; (j) recoger el polipéptido de fusión de inmunoglobulina de las células huésped; (k) poner en contacto el polipéptido de fusión de inmunoglobulina recogido con un antígeno y (l) recuperar los polinucleótidos de la primera biblioteca que codifican los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina que son específicos para el antígeno.

En ciertas realizaciones, los pasos (g)-(l) se repiten una o más veces, enriqueciendo así los polinucleótidos de la primera biblioteca que codifican las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulina o sus fragmentos de unión al antígeno, como parte de un polipéptido de fusión de inmunoglobulina que se une específicamente al antígeno.

La divulgación también proporciona un método para seleccionar polinucleótidos que codifican una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina específica de antígeno o un fragmento de unión al antígeno de esta, que comprende el aislamiento de dicho tercer polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada (VH) de la inmunoglobulina seleccionada o su fragmento de unión al antígeno.

#### Breve descripción de las figuras

La FIG. 1. muestra los elementos del plásmido pJEM1 y sus respectivas secuencias (SEQ ID NO: 1).

La FIG. 2. ilustra la estrategia general para la selección de bibliotecas mediante un virus vaccinia recombinante.

Las FIG. 3A-C muestran datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de C35 y tinción de CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa H2124-A56R + L517 (B) o 2408-A56R-scFV (C) en comparación con células infectadas de tipo (WT) (A).

Las FIG. 4A-B muestran los resultados de unión ELISA para EEV que contienen la proteína de fusión específica C35 (etiquetada "A56R EEV"), un control ("L517+G7000-A56R EEV") y un anticuerpo específico de C35 en formato IgG1 unido a membrana estándar ("mbg EEV") con C35/Anti-Vac HRP (A) y C35/Anti-Fab (B).

Las FIG. 5A-D muestran los resultados de la placa de ensayo de placa para la unión C35 después de 2 horas (A) y durante la noche (B), y la unión VEGF después de 2 horas (C) y durante la noche (D).

La FIG. 6. es una ilustración de la estrategia de selección del anticuerpo CD100.

La FIG. 7. muestra una alineación de la secuencia VH del clon C20 de CD100 (SEQ ID NO: 19) y un clon VH idéntico identificado por la selección de la biblioteca de vaccinia recombinante.

La FIG. 8. muestra los resultados de la citometría de flujo de C35 y Her2 para la selección de Her2.3.2 y Her2.3.3. con cadenas ligeras L48, L116 y L9021.

La FIG. 9. es una ilustración de la estrategia de selección del anticuerpo Her2.

La FIG. 10. Muestra los resultados de la citometría de flujo para C35 + anti-His y Her2 + anti-His para la selección de Her2.3.2 y Her2.3.3.

La FIG. 11. muestra una alineación de la secuencia VH del clon B10 de Her2 (SEQ ID NO: 20) y un clon VH idéntico identificado por la selección de la biblioteca de vaccinia recombinante.

FIG.12. muestra un diagrama de las construcciones "Fab", "TR" e "IgG-gamma de cadena pesada".

La FIG. 13. Muestra datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de C35 y la tinción de Her2 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa 8000-Fab L8000.

- La FIG. 14. Muestra datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de C35 y la tinción de Her2 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) 8000-IgG L8000 y (B) 8000-TR L8000.
- 5 La FIG. 15. muestra datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de C35 y la tinción de Her2 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) H2124-IgG y (B) H2124-TR L517.
- La FIG. 16. Muestra los controles para el análisis de flujo de CD100 Lib 10.3 Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de Her2 y la tinción CD 100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) 2368 y (B) 8000.
- 10 La FIG. 17. muestra los resultados del análisis de flujo de CD100 Lib 10.3 de tosilo seleccionado. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de Her2 y la tinción de CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) L223, (B) L151 y (C) L9021.
- 15 FIG.18. muestra los resultados del análisis de flujo de CD100 Lib 10.3 de tosilo seleccionado. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de Her2 y la tinción de CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) L48, (B) L7110, y (C) L122.
- La FIG. 19. muestra los resultados del análisis de flujo de CD100 Lib 10.3 de tosilo seleccionado. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de Her2 y la tinción de CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) L116, (B) L214 y (C) L3-1.
- 20 La FIG. 20. Muestra los resultados del análisis de flujo de CD100 Lib 10.3 de ProG seleccionado. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de Her2 y la tinción de CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) L223, (B) L151 y (C) L9021.
- La FIG. 21. Muestra los resultados del análisis de flujo de CD100 Lib 10.3 para ProG seleccionado. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de Her2 y la tinción de CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) L48, (B) L7110, y (C) L122.
- 25 La FIG. 22. Muestra los resultados del análisis de flujo de CD100 Lib 10.3 para ProG seleccionado. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de Her2 y la tinción de CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) L116, (B) L214 y (C) L3-1.
- 30 La FIG. 23. muestra los controles para el análisis de flujo de CD100 Lib 10.3/L3-1. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción del precomplejo Her2 y la tinción de 2 etapas de CD 100 y la tinción del precomplejo CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) 8000 y (B) 2368.
- 35 La FIG. 24. muestra los resultados del análisis de flujo de CD100 Lib 10.3Tosilo/L3-1. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción del precomplejo Her2, la tinción de 2 etapas de CD 100 y la tinción del precomplejo CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) CD100 Lib 10.3 de tosilo preseleccionado y (B) CD100 Lib 10.3 de tosilo seleccionado.
- La FIG. 25. muestra los resultados del análisis de flujo de CD100 Lib 10.3ProtG/L3-1. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción del precomplejo Her2, la tinción de 2 etapas de CD 100 y la tinción del precomplejo CD100 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa (A) CD100 Lib 10.3 de ProtG preseleccionada y (B) CD100 Lib 10.3 de ProtG seleccionada.
- 40 La FIG. 26. muestra los resultados de la citometría de flujo con una especificidad a CD100 sobre células Jurkat (CD100+) y células BxPc3 para mAbs 2050, 2063 y 2110.
- La FIG. 27. muestra los resultados de ELISA en (A) huCD100-His recubierta y (B) hemoglobina recubierta con tres anticuerpos específicos de CD100 (Mab2050, MabC2063 y MabC2110) en comparación con los controles positivos y negativos.
- 45 La FIG. 28. muestra un esquema para la identificación de Ig-H/Ig-L específicos después de los métodos de visualización de vaccinia.
- La FIG. 29. Datos de análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción de C35 y Her2 de células HeLa infectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresa clones Her2 específicos (A) D5, (B) D8 y (C) H2.
- 50 La FIG. 30. Muestra resultados de ELISA para tres anticuerpos específicos Her2 (Mab8287, Mab8290 y Mab9298).
- La FIG. 31. muestra los resultados de la citometría de flujo con una especificidad a Her2 sobre células SKBR3 (Her2++) y para Mab8289, Mab8293 y Mab8297.

## Descripción detallada

La invención es conforme se define en las reivindicaciones.

La presente invención se relaciona ampliamente con los métodos para identificar y/o producir moléculas de inmunoglobulinas de unión al antígeno funcionales o fragmentos de inmunoglobulina de unión al antígeno (es decir, fragmentos de unión al antígeno) en un sistema eucariótico desplegado en la superficie del virus vaccinia con envoltura extracelular. (EEV), como una fusión con un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV. Además, la invención se relaciona con métodos para identificar polinucleótidos que codifican una molécula de inmunoglobulina de unión al antígeno o un fragmento de inmunoglobulina de unión al antígeno de bibliotecas de expresión de complejos de polinucleótidos que codifican dichas moléculas o fragmentos de inmunoglobulina, donde las bibliotecas se construyen y se seleccionan a partir de

5 un sistema eucariota desplegado en la superficie del virus vaccinia con envoltura extracelular (EEV), como una fusión con un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV. Otras realizaciones relacionadas con una proteína de fusión que comprende (a) un cebador segmento polipeptídico que comprende el dominio CH1 de la cadena pesada humana (b) un segundo segmento

10 polipeptídico que comprende los dominios extracelular y transmembrana de una proteína de membrana específica del virus con envoltura extracelular (EEV). Una proteína de fusión como se describe en la presente incluye una región variable de cadena pesada, que, cuando se combina con una cadena ligera de inmunoglobulina adecuada, se une a un antígeno de interés.

15 La presente invención también permite la construcción de bibliotecas de inmunoglobulinas complejas en un sistema eucariótico desplegado en la superficie del virus vaccinia con envoltura extracelular (EEV), como una fusión con un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV.

20 Resulta importante señalar que el término "un" o "una" en relación con una entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que el término "una molécula de inmunoglobulina" representa una o más moléculas de inmunoglobulina. Los términos "un" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en la presente.

25 El término "eucariota" o "organismo eucariótico" abarca todos los organismos de los reinos animal, vegetal y protista, incluidos protozoos, hongos, levaduras, algas verdes, plantas unicelulares, plantas multicelulares y todos los animales, tanto vertebrados como invertebrados. El término no comprende bacterias o virus. El término "célula eucariota" abarca tanto el singular, "célula eucariota", como el plural, "células eucarióticas", y comprende células derivadas de un eucariota.

30 El término "vertebrado" abarca tanto el singular, "vertebrado", como el plural, "vertebrados", y comprende mamíferos y aves, así como peces, reptiles y anfibios.

35 El término "mamífero" abarca tanto el singular, "mamífero", como el plural, "mamíferos", e incluye, a modo no taxativo, seres humanos; primates, como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos, como perros y lobos; felinos, como gatos, leones y tigres; équidos, como caballos, burros y cebras; animales destinados a la alimentación, como vacas, cerdos y ovejas; ungulados, como venados y jirafas; roedores, como ratones, ratas, hámsteres y cobayas, y osos. En ciertas realizaciones, el mamífero es un humano.

40 Los términos "cultivo tisular" o "cultivo celular" o "cultivo" o "cultivación" se refieren al mantenimiento o crecimiento de células o tejidos animales o vegetales *in vitro* en condiciones que permiten la preservación de la arquitectura celular, la preservación de la función celular, la diferenciación adicional o las tres. Las "células de tejido primario" son aquellas tomadas directamente del tejido, es decir, una población de células del mismo tipo que realizan la misma función en un organismo. El tratamiento de dichas células tisulares con la enzima proteolítica tripsina, por ejemplo, las disocia en células tisulares individuales que crecen o mantienen la arquitectura celular cuando se siembran en placas de cultivo.

45 El término "polinucleótido" se refiere a uno o más segmentos de ácido nucleico o moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un ácido nucleico o una construcción. Un "polinucleótido que codifica un polipéptido de la subunidad de inmunoglobulina" se refiere a un polinucleótido que comprende la región codificante para dicho polipéptido. Además, un polinucleótido puede codificar un elemento regulador, como un promotor o un terminador de la transcripción, o puede codificar un elemento específico de un polipéptido o proteína, como un péptido señal secretor o un dominio funcional.

50 Como se usa en la presente, el término "identificar" se refiere a métodos en los que las moléculas deseadas, por ejemplo, polinucleótidos que codifican moléculas de inmunoglobulina con una especificidad o función deseada, se diferencian de una pluralidad o biblioteca de dichas moléculas. Los métodos de identificación incluyen "selección" y "filtrado". Como se usa en la presente, los métodos de "selección" son aquellos en los que las moléculas deseadas se pueden separar directamente de la biblioteca. Por ejemplo, en un método de selección descrito en la presente, las células huésped que comprenden los polinucleótidos deseados se separan directamente de las células huésped que comprenden el resto de la biblioteca al sufrir un evento lítico y, por lo tanto, se liberan del sustrato al que se

encuentran unidas las demás células huésped. Como se usan en la presente, los métodos de "filtrado" son aquellos en los que los grupos que comprenden las moléculas deseadas se someten a un ensayo en el que se puede detectar la molécula deseada. Las partes alícuotas de los grupos en los que se detecta la molécula se dividen en grupos sucesivamente más pequeños que también se analizan, hasta que se logra un grupo que está muy enriquecido con la molécula deseada.

*Inmunoglobulinas* Como se usa en al presente, una "molécula de inmunoglobulina" se define como una inmunoglobulina bimolecular completa, es decir, que comprende generalmente cuatro "polipéptidos de subunidad", es decir, dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. En algunos casos, por ejemplo, las moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélidos o diseñadas a base de inmunoglobulinas de camélidos, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir solo en cadenas pesadas, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993). Por lo tanto, por "polipéptido de subunidad de inmunoglobulina" se entiende un polipéptido de cadena pesada único o un polipéptido de cadena ligera único. Las moléculas de inmunoglobulina también se denominan "anticuerpos", y los términos se usan indistintamente en la presente. Una "inmunoglobulina aislada" se refiere a una molécula de inmunoglobulina o dos o más moléculas de inmunoglobulina, que se eliminan sustancialmente del medio de las proteínas y otras sustancias y que se unen a un antígeno específico.

La cadena pesada, que determina la "clase" de la molécula de inmunoglobulina, es el mayor de los dos polipéptidos de la subunidad y comprende una región variable y una región constante. Por "cadena pesada" se entiende una forma de cadena pesada secretada de longitud completa, es decir, una que se libera de la célula, o una forma de cadena pesada unida a la membrana, es decir, que comprende un dominio que abarca la membrana, por ejemplo, fusiones con un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV. Las "clases" de inmunoglobulina se refieren a los amplios grupos de inmunoglobulinas que cumplen diferentes funciones en el huésped. Por ejemplo, las inmunoglobulinas humanas se dividen en cinco clases, es decir, IgG, que comprende una cadena pesada  $\gamma$ , IgM, que comprende una cadena pesada  $\mu$ , IgA, que comprende una cadena pesada  $\alpha$ , IgE, que comprende una cadena pesada  $\epsilon$ , e IgD, que comprenden una cadena pesada  $\delta$ .

Por "cadena ligera" se entiende la subunidad de inmunoglobulina más pequeña que se asocia con la región amino terminal de una cadena pesada. Al igual que una cadena pesada, una cadena ligera comprende una región variable y una región constante. Hay dos tipos diferentes de cadenas ligeras,  $\kappa$  y  $\lambda$ , y un par de dichas cadenas pueden asociarse con un par de cualquiera de las diversas cadenas pesadas para formar una molécula de inmunoglobulina.

Los polipéptidos de subunidad de inmunoglobulina comprenden típicamente una región constante y una región variable. En la mayoría de las especies, la región variable de la cadena pesada, o el dominio  $V_H$ , y la región variable de la cadena ligera, o el dominio  $V_L$ , se combinan para formar una "región determinante de la complementariedad" o CDR, la porción de una molécula de inmunoglobulina que reconoce específicamente un epítope antigenóico. Se produce un gran repertorio de regiones variables asociadas con regiones constantes de cadena pesada y ligera tras la diferenciación de células productoras de anticuerpos en un animal a través de reordenamientos de una serie de segmentos de ADN de línea germinal que dan como resultado la formación de un gen que codifica una región variable determinada. Otras variaciones de las regiones variables de la cadena pesada y ligera tienen lugar a través de mutaciones somáticas en células diferenciadas. La estructura y la formación *in vivo* de moléculas de inmunoglobulina son bien conocidas por los entendidos en la técnica de la inmunología. Se pueden encontrar revisiones concisas de la generación de diversidad de inmunoglobulinas, por ejemplo, en Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988) (en adelante, "Harlow"); y Roitt, et al., Immunology Gower Medical Publishing, Ltd., London (1985) (en adelante, "Roitt").

Como se usa en la presente, un "fragmento de unión al antígeno" de una molécula de inmunoglobulina es cualquier fragmento o variante de una molécula de inmunoglobulina que sigue siendo capaz de unirse a un antígeno. Los fragmentos de unión al antígeno incluyen, a modo no taxativo, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs de cadena simple (scFv), inmunoglobulinas de cadena simple (por ejemplo, donde una cadena pesada, o parte de esta, y la cadena ligera, o parte de esta, están fusionadas), Fvs con enlaces disulfuro (sdFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos scFv, minicuerpos Fab y scFv dimérico y cualquier otro fragmento que comprenda un dominio  $V_L$  y  $V_H$  en una conformación tal que se forma una CDR específica.

Los fragmentos de inmunoglobulina de unión al antígeno pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la región constante total o parcial, por ejemplo, un dominio CH1, CH2, CH3 en la cadena pesada, y un dominio constante de cadena ligera, por ejemplo, un dominio C $\kappa$  o C $\lambda$ , o parte del mismo en la cadena ligera. Una proteína de fusión, como se describe en la presente, comprende un dominio variable de cadena pesada fusionado a un dominio constante CH1 fusionado a un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV, que es A56R.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para identificar, es decir, seleccionar o, alternativamente, filtrar polinucleótidos que codifiquen individual o colectivamente moléculas de inmunoglobulina de unión al antígeno o fragmentos de unión al antígeno de estas. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para seleccionar una molécula de inmunoglobulina de unión al antígeno de interés, donde la inmunoglobulina o el

anticuerpo se muestran en la superficie de un EEV, el EEV se aísla y el polinucleótido que codifica una parte de la inmunoglobulina, por ejemplo, la región VH, está aislado.

En ciertos aspectos, se habilita un método para seleccionar polinucleótidos que codifican una molécula de inmunoglobulina de unión al antígeno, que comprende: (1) introducir una biblioteca de polinucleótidos de conformidad con la invención en una población de células huésped que admiten la infección con el virus vaccinia. El método comprende además (2) introducir en la población de células huésped un polinucleótido que codifica una cadena ligera, por ejemplo, una cadena ligera conocida o una segunda biblioteca que comprende una pluralidad de polinucleótidos, cada uno de los cuales codifica una cadena ligera de inmunoglobulina. Una vez introducido en la población de células huésped, el polipéptido de fusión de inmunoglobulina puede combinarse con la cadena ligera de inmunoglobulina para formar una porción de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina, donde la molécula puede expresarse o "mostrarse" en la superficie de una partícula seleccionable, por ejemplo, un virión de EEV producido y liberado por las células huésped en el medio circundante. El método incluye además la selección del EEV liberado de las células huésped que se une a un antígeno de interés, por ejemplo, mediante la unión específica del antígeno a una placa o a perlas, por ejemplo, perlas de proteína G, perlas de estreptavidina o perlas tisiladas. El EEV que expresa el dominio de unión al antígeno de interés se puede luego recuperar y usar para reinfestar nuevas células huésped, con lo que se enriquece a los polinucleótidos que contienen EEV, que codifican la cadena pesada de la unión de inmunoglobulina al antígeno de interés. Los polinucleótidos se pueden recuperar. El método se puede repetir, con lo que se enriquece a los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de cadena pesada de interés.

Los polinucleótidos aislados que codifican las proteínas de fusión del polipéptido de cadena pesada de la inmunoglobulina que se unen a un antígeno de interés pueden transferirse y expresarse en células huésped (ya sea como una proteína de fusión EEV o no) en la que una biblioteca de polinucleótidos que codifica regiones variables de cadena ligera de inmunoglobulina se fusiona a un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV, lo que permite la identificación de un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que, cuando se combina con la región variable de cadena pesada identificada en el cebador paso, forma una molécula de inmunoglobulina funcional o un fragmento de esta, que reconoce un antígeno específico.

Como se usa en la presente, una "biblioteca" es un género representativo de polinucleótidos, es decir, un grupo de polinucleótidos relacionados a través de, por ejemplo, su origen de una sola especie animal, tipo de tejido, órgano o tipo celular, donde la biblioteca comprende colectivamente al menos dos especies diferentes dentro de un género dado de polinucleótidos. Una biblioteca de polinucleótidos puede comprender al menos 10, 100, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, o 10<sup>9</sup> especies diferentes dentro de un género dado de polinucleótidos. El género puede ser moléculas relacionadas, por ejemplo, regiones variables de inmunoglobulina, por ejemplo, dominios VL o dominios VH de inmunoglobulina humana. Los dominios VH y VL pueden representar un repertorio completo de dominios variables o ya pueden ser específicos para un antígeno, por ejemplo, específicos para el mismo antígeno. Más específicamente, una biblioteca puede codificar una pluralidad de polipéptidos de subunidad de inmunoglobulina, es decir, polipéptidos de subunidad de cadena pesada o polipéptidos de subunidad de cadena ligera. En este contexto, una "biblioteca" puede comprender polinucleótidos de un género común, donde el género es polinucleótidos que codifican un polipéptido de la subunidad de inmunoglobulina de cierto tipo y clase, por ejemplo, una biblioteca puede codificar una cadena pesada humana μ, γ-1, γ-2, γ-3, γ-4, α-1, α-2, ε o δ o una cadena ligera humana κ o λ. Aunque cada miembro de una biblioteca puede codificar la misma región constante de la cadena pesada o ligera, la biblioteca puede comprender colectivamente al menos dos, o al menos 10, 100, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> o 10<sup>9</sup> regiones variables diferentes, es decir, una "pluralidad" de regiones variables asociadas con la región constante común.

En otras realizaciones, la biblioteca puede codificar una pluralidad de fragmentos de cadena única de inmunoglobulina que comprenden una región variable de cadena pesada o pueden comprender tanto una región variable de cadena ligera como una región variable de cadena pesada.

En un aspecto, se proporciona en la presente un método para producir bibliotecas de polinucleótidos que codifican polipéptidos de subunidades de inmunoglobulina. Además, se proporcionan bibliotecas de polipéptidos de subunidades de inmunoglobulina construidos como proteínas de fusión en vectores de expresión eucarióticos, por ejemplo, EEV, donde el polipéptido de la subunidad de inmunoglobulina se fusiona con un segmento de polipéptido que comprende el dominio transmembrana de la proteína de membrana A56R específica de EEV.

Por "célula receptora" o "célula huésped" o "célula" se entiende una célula o población de células en la que se introducen bibliotecas de polinucleótidos, como se describe en la presente. Las células huésped adecuadas para las bibliotecas descritas en la presente son células eucariotas que permiten la infección con el virus vaccinia. Las líneas celulares adecuadas pueden ser células o líneas celulares de vertebrados, mamíferos, roedores, ratones, primates o humanos.

Por "una población de células huésped" se entiende un grupo de células cultivadas en las que se puede introducir y expresar una "biblioteca", conforme la presente. Las células huéspedes para bibliotecas de EEV, como se describen en la presente, pueden permitir la infección con el virus vaccinia. Las células huésped de la presente invención

pueden ser adherentes, es decir, células huésped que crecen unidas a un sustrato sólido, o, alternativamente, pueden estar en suspensión.

Como se señaló anteriormente, ciertos métodos para identificar moléculas de inmunoglobulina comprenden la introducción de una "primera" biblioteca de polinucleótidos (que codifican, por ejemplo, una proteína de fusión VH-CH1-A56R) en una población de células huésped, así como una "segunda" biblioteca de polinucleótidos (por ejemplo, que codifican una región VL) en la misma población de células huésped. La primera y la segunda biblioteca son complementarias, es decir, si la "primera" biblioteca codifica los dominios variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina, la "segunda" biblioteca codificará los dominios variables de la cadena ligera de la inmunoglobulina, lo que permitirá el ensamblaje de moléculas de inmunoglobulina, o sus fragmentos específicos de unión al antígeno, en la población de células huésped, de manera que las inmunoglobulinas se expresan, o se muestran, en la superficie del EEV.

Los polinucleótidos contenidos en las bibliotecas descritas en la presente pueden codificar polipéptidos de subunidades de inmunoglobulina a través de una "asociación operable con una región de control transcripcional". Una o más moléculas de ácido nucleico en un polinucleótido dado están "asociadas operativamente" cuando se colocan en una relación funcional. Esta relación puede ser entre una región de codificación para un polipéptido y una o más secuencias reguladoras que están conectadas de tal manera que permiten la expresión de la región de codificación cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción, polimerasas, etc.) se unen a la o las secuencias reguladoras. Las "regiones de control transcripcional" incluyen, a modo no taxativo, potenciadores, operadores y señales de terminación de la transcripción y se incluyen con el polinucleótido para dirigir su transcripción. Por ejemplo, un promotor estaría asociado operativamente con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de subunidad de inmunoglobulina si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de esa molécula de ácido nucleico. En general, "asociadas operativamente" significa que las secuencias de ADN son contiguas o están estrechamente conectadas en un polinucleótido. Sin embargo, algunas regiones de control de transcripción, por ejemplo, potenciadores, no tienen que ser contiguas.

Por "secuencias de control" o "regiones de control" se entiende las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante asociada operativamente en un organismo huésped en particular. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y/o potenciadores.

Una variedad de regiones de control transcripcional son conocidas por los entendidos en la técnica. Como se explicará con más detalle a continuación, las regiones de control de la transcripción adecuadas incluyen promotores capaces de funcionar en el citoplasma de células infectadas con poxvirus.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión como se describe en la presente puede comprender un enlazador, por ejemplo, que conecta el dominio variable de inmunoglobulina a un dominio constante, por ejemplo, un dominio CH1, C-kappa o C-lambda y/o que conecta el dominio constante a un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV, A56R. Un enlazador puede comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10 o al menos aproximadamente 15 aminoácidos. Los enlazadores adecuados pueden ser identificados por un entendido en la técnica.

Cuando una proteína de fusión descrita en el presente documento comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, un dominio CH1, se puede utilizar cualquier región constante de cadena pesada, incluidas, entre otras, cadenas pesadas de inmunoglobulina de vertebrados como aves, peces o mamíferos o cadenas pesadas de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, una cadena pesada de inmunoglobulina humana o una porción de esta, por ejemplo, un dominio CH1, puede ser una cadena pesada μ o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgM, una cadena pesada γ-1 o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgG1, una cadena pesada γ-2 o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgG2, una cadena pesada γ-3 o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgG3, una cadena pesada γ-4 o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgG4, una cadena pesada α-1 o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgA1, una cadena pesada α-2 o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgA2, una cadena pesada ε o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgE, o una cadena pesada δ o un fragmento de esta, es decir, la cadena pesada de una inmunoglobulina IgD.

Las proteínas de fusión unidas a una membrana, como se describe en la presente, pueden anclarse a la superficie de una partícula, por ejemplo, una partícula de virus vaccinia (o virión), por ejemplo, una partícula de EEV (o virión) por un dominio transmembrana fusionado al polipéptido de cadena pesada.

El dominio transmembrana es parte de un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV, es decir, una proteína que se expresa en la superficie de un virus vaccinia con envoltura extracelular, pero NO en partículas de virus vaccinia intracelular, donde la proteína de membrana específica de EEV es A56R, la proteína HA de vaccinia. Los términos "dominio intracelular", "dominio citoplásico", "región citosólica" o términos relacionados, que se usan indistintamente en la presente, se refieren a la porción del polipéptido de fusión que está dentro de la célula.

En aquellas realizaciones en las que una proteína de fusión u otra proteína de la biblioteca comprende una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de esta, se puede usar cualquier cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier especie animal, por ejemplo, cadenas ligeras de inmunoglobulina de vertebrados, como aves, peces o mamíferos, o cadenas ligeras humanas, por ejemplo, cadenas ligeras κ y λ. Una cadena ligera puede asociarse con una cadena pesada para producir una proteína de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina.

Cada miembro de una biblioteca de polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de cadena pesada como se describe en la presente puede comprender (a) una primera molécula de ácido nucleico que codifica un cebador segmento polipeptídico que comprende una región constante de inmunoglobulina común a todos los miembros de la biblioteca, un dominio CH1, por ejemplo, un dominio gamma o mu CH1, (b) una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un segundo segmento polipeptídico que comprende los dominios extracelular y transmembrana de una proteína A56R de membrana específica de virus con envoltura extracelular (EEV), donde la segunda molécula de ácido nucleico está directamente en dirección descendente y alineada a la primera molécula de ácido nucleico (ya sea fusionada directamente o conectada por un enlazador), y (c) una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un tercer segmento polipeptídico que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, donde el tercer nucleico la molécula de ácido está directamente en dirección ascendente y en línea con la primera molécula de ácido nucleico (ya sea directamente fusionada o conectada por un enlazador).

Se pueden usar bibliotecas de cadenas ligeras de inmunoglobulina que no están fusionadas a un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV para coinfectar células huésped para proporcionar la cadena de inmunoglobulina "complementaria" para producir un fragmento de inmunoglobulina funcional de unión al antígeno. Dichas bibliotecas se describen en detalle, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 7,858,559.

Las bibliotecas de polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena pesada o ligera pueden contener una pluralidad, es decir, al menos dos o al menos 10, 100, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> o 10<sup>9</sup> regiones variables diferentes. Como es bien sabido por los entendidos en la técnica, una región variable de cadena ligera está codificada por moléculas de ácido nucleico reordenadas, cada una de las cuales comprende una región V<sub>L</sub> de cadena ligera, específicamente una región V<sub>k</sub> o V<sub>A</sub>, y una región J de cadena ligera, específicamente una región J<sub>k</sub> o una región J<sub>λ</sub>. De manera similar, una región variable de la cadena pesada está codificada por moléculas de ácido nucleico reorganizadas, cada una de las cuales comprende una región V<sub>H</sub> de la cadena pesada, una región D y una región J. Estos reordenamientos tienen lugar a nivel de ADN tras la diferenciación celular. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera se pueden derivar, por ejemplo, mediante PCR de células B maduras y células plasmáticas que se han diferenciado terminalmente para expresar un anticuerpo con especificidad para un epítope particular. Además, si se desean anticuerpos contra un antígeno específico, se pueden aislar regiones variables de células B maduras y células plasmáticas de un animal que ha sido inmunizado con ese antígeno y, en consecuencia, se ha producido un repertorio expandido de regiones variables de anticuerpos que interactúan con el antígeno. Alternativamente, si se desea una biblioteca más diversa, se pueden aislar regiones variables de células precursoras, por ejemplo, células pre-B y células B inmaduras, que se han reordenado a partir de los genes de inmunoglobulina, pero no se han expuesto al antígeno, ya sea por sí mismas o no. Por ejemplo, las regiones variables se pueden aislar mediante RT-PCR de la médula ósea humana normal de múltiples donantes. Alternativamente, las regiones variables pueden ser sintéticas, por ejemplo, fabricadas en el laboratorio a través de la generación de oligonucleótidos sintéticos, o pueden derivarse a través de manipulaciones *in vitro* de ADN de la línea germinal que produce el reordenamiento de los genes de inmunoglobulina.

Además de la primera y la segunda molécula de ácido nucleico, que codifican las regiones constantes y las regiones variables de inmunoglobulina, respectivamente, cada miembro de una biblioteca de polinucleótidos de la presente invención como se describe anteriormente puede comprender además una molécula de ácido nucleico adicional que codifica un péptido señal directamente en dirección ascendente y en línea con la molécula de ácido nucleico que codifica la región variable.

Por "péptido señal" se entiende una secuencia polipeptídica que, por ejemplo, dirige el transporte de la subunidad polipeptídica de inmunoglobulina naciente a la superficie de las células huésped. En la técnica, los péptidos señal también se denominan "secuencias de señal", "secuencias líder", "péptidos señal secretores" o "secuencias de señal secretoras". Los péptidos señal se expresan normalmente como parte de un polipéptido completo o "inmaduro" y, normalmente, están situados en el extremo N.

Todas las células, incluidas las células huésped de la presente invención, poseen una vía secretora constitutiva, en la que las proteínas, que incluyen los polipéptidos de la subunidad de inmunoglobulina secretada destinados a la exportación, se secretan de la célula. Estas proteínas pasan a través de la vía de procesamiento de ER-Golgi donde pueden ocurrir modificaciones. Si no se detectan más señales en la proteína, se dirige a la superficie de la célula para su secreción o inserción como un componente integral de la membrana expresado en la superficie de la célula huésped o partícula de virus, por ejemplo, el virión EEV. Las formas unidas a la membrana de los polipéptidos de la subunidad de inmunoglobulina siguen inicialmente la misma vía que las formas secretadas, pasando a través de la luz del retículo endoplasmático ER, excepto que están retenidas en la membrana del ER por la presencia de señales de detención de la transferencia o "dominios transmembrana". Los dominios transmembrana son estiramientos hidrófobos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos que adoptan una conformación alfa-helicoidal cuando

atravesan la membrana. Las proteínas incluidas en la membrana se anclan en la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática. Al igual que con las proteínas secretadas, la región N-terminal de las proteínas transmembrana tiene un péptido señal que pasa a través de la membrana y se escinde al salir a la luz del ER.

5 Las cadenas pesadas de inmunoglobulina recién sintetizadas se mantienen en residencia en el ER por una proteína chaperona llamada BiP (un miembro de la familia de chaperonas moleculares Hsp70). El emparejamiento del dominio CH1 de la cadena pesada con el dominio CL de su cadena ligera asociada induce la disociación de BiP, el plegamiento final y la formación de enlaces disulfuro y la salida del anticuerpo ensamblado del ER. Luego, el anticuerpo utiliza la vía de secreción normal de la célula y el tráfico a través de los golgi a la superficie celular, donde se secreta o se retiene en la superficie (si el anticuerpo tiene un dominio transmembrana). Véase Daniel et al.,  
10 Molecular Cell 34:635-36 (2009).

Los péptidos señal adecuados proporcionados en la presente pueden ser péptidos señal de inmunoglobulina naturales, es decir, codificados por una secuencia que forma parte de una transcripción de cadena pesada o ligera natural, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido de la subunidad de inmunoglobulina que está asociado operativamente a él. Alternativamente, se puede usar un péptido señal heterólogo, o un derivado funcional de este. En ciertos aspectos, el péptido señal puede ser el de la proteína A56R del virus vaccinia o su derivado funcional.  
15

En otros aspectos, los miembros de una biblioteca de polinucleótidos como se describe en la presente pueden comprender además moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos heterólogos. Dichas moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos heterólogos pueden estar en dirección 20 ascendente o descendente respecto de las moléculas de ácido nucleico que codifican un dominio variable o constante de inmunoglobulina o la proteína de membrana específica de EEV.

Un polipéptido heterólogo codificado por una molécula de ácido nucleico adicional puede ser una secuencia de rescate. Una secuencia de rescate es una secuencia que se puede usar para purificar o aislar la inmunoglobulina o un fragmento de ella o el polinucleótido que la codifica. Así, por ejemplo, las secuencias de rescate de péptidos 25 incluyen secuencias de purificación, como la etiqueta 6-His para uso con columnas de afinidad de Ni y etiquetas de epítopo para detección, inmunoprecipitación o FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia). Las etiquetas de epítopo adecuadas incluyen myc (para uso con el anticuerpo 9E10 disponible comercialmente), la secuencia diana de biotinilación BSP de la enzima bacteriana BirA, etiquetas de gripe, LacZ y GST. La molécula de ácido nucleico adicional también puede codificar un enlazador peptídico.

30 Los polinucleótidos comprendidos en varias bibliotecas descritas en la presente pueden introducirse en células huésped adecuadas. Las células huésped adecuadas pueden caracterizarse, por ejemplo, por ser capaces de expresar moléculas de inmunoglobulina unidas a su superficie o permitir la infectividad con el virus vaccinia. Los polinucleótidos pueden introducirse en células huésped mediante métodos que son bien conocidos por los entendidos en la técnica. Cuando el polinucleótido es parte de un vector de virus, por ejemplo, un virus vaccinia, la introducción en células huésped se realiza convenientemente mediante infección estándar.  
35

La primera y la segunda biblioteca de polinucleótidos pueden introducirse en células huésped en cualquier orden o simultáneamente. Por ejemplo, si tanto la primera como la segunda biblioteca de polinucleótidos se construyen en vectores de virus vaccinia, ya sean infecciosos o inactivados, los vectores pueden introducirse por infección simultánea como una mezcla o en infecciones consecutivas. Si una biblioteca se construye en un vector de virus 40 vaccinia, y la otra se construye en un vector plásmido, la introducción se puede realizar mediante la introducción de una biblioteca antes que la otra.

Después de la introducción en las células huésped de la primera y la segunda biblioteca de polinucleótidos, se permite que ocurra la expresión de moléculas de inmunoglobulina o sus fragmentos de unión al antígeno en la superficie de EEV. Por "permite la expresión" se entiende permitir que los vectores que se han introducido en las 45 células huésped experimenten la transcripción y traducción de los polipéptidos de la subunidad de inmunoglobulina, de modo de permitir que las células huésped transporten moléculas de inmunoglobulina completamente ensambladas o fragmentos de unión al antígeno de estas a la superficie de la membrana como una fusión con un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV. En general, permitir la expresión requiere incubar las células huésped en las que se han introducido los 50 polinucleótidos en condiciones adecuadas para permitir la expresión. Esas condiciones y el tiempo requerido para permitir la expresión variará en función de la elección de la célula huésped y de los vectores, como es bien sabido por los entendidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, las células huésped y/o los viriones de vaccinia a los que se les ha permitido expresar 55 moléculas de inmunoglobulina en su superficie o moléculas de inmunoglobulina solubles secretadas en el medio celular se ponen en contacto con un antígeno. Como se usa en la presente, un "antígeno" es cualquier molécula que puede unirse específicamente a un anticuerpo, una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno de esta. Por "específicamente unido" se entiende que el antígeno se une a la CDR del anticuerpo. La porción del antígeno que interactúa específicamente con la CDR es un "epítopo" o un "determinante antigénico". Un antígeno puede comprender un solo epítopo, pero por lo general, un antígeno comprende al menos dos epítopos y 60 puede incluir cualquier número de epítopos, según el tamaño, la conformación y el tipo de antígeno.

Los antígenos son típicamente péptidos o polipéptidos, pero pueden ser cualquier molécula o compuesto. Por ejemplo, un antígeno adecuado puede ser un compuesto orgánico, por ejemplo, dinitrofenol o DNP, un ácido nucleico, un carbohidrato o una mezcla de cualquiera de estos compuestos con o sin un péptido o polipéptido. Se cree que el tamaño mínimo de un epítopo peptídico o polipeptídico es de aproximadamente de cuatro a cinco aminoácidos. Los epitopos peptídicos o polipeptídicos pueden contener al menos siete, al menos nueve o entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigenógeno en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítopo no necesitan ser contiguos y, en algunos casos, ni siquiera pueden estar en la misma cadena peptídica. En la presente invención, los antígenos peptídicos o polipeptídicos pueden contener una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 y entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. En ciertas realizaciones, los péptidos o polipéptidos que comprenden epítopos antigenógenos o que alternativamente contienen epítopos antígenos son al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 residuos de aminoácidos de longitud. El antígeno puede estar en cualquier forma y puede estar libre, por ejemplo, disuelto en una solución, o puede estar unido a cualquier sustrato. Los sustratos adecuados se describen en la presente. En ciertas realizaciones, un antígeno puede ser parte de un virus vaccinia que expresa antígeno, por ejemplo, el virión de EEV, como se describe con más detalle a continuación.

Las moléculas de inmunoglobulina específicas para cualquier antígeno pueden producirse de conformidad con los métodos descritos en la presente. En ciertas realizaciones, los antígenos son antígenos "propios", es decir, antígenos derivados de la misma especie que las moléculas de inmunoglobulina producidas. Como ejemplo, podría desearse producir anticuerpos humanos dirigidos a antígenos tumorales humanos. Otros antígenos "propios" deseados incluyen, a modo no taxativo, citoquinas, receptores, ligandos, glicoproteínas y hormonas.

Los anticuerpos dirigidos a antígenos en agentes infecciosos también pueden identificarse y seleccionarse mediante los métodos descritos. Entre los ejemplos de dichos antígenos se incluyen, a modo no taxativo, antígenos bacterianos, antígenos víricos, antígenos parásitos y antígenos fúngicos.

En ciertos esquemas de selección y filtrado en los que las moléculas de inmunoglobulina se expresan en la superficie de EEV, los viriones EEV recombinantes producidos conforme se describe se "ponen en contacto" con el antígeno mediante un método que permitirá un antígeno, que reconoce específicamente una CDR de una molécula de inmunoglobulina expresada en la superficie del EEV, para unirse a la CDR, lo que permite que los viriones EEV recombinantes que se unen específicamente al antígeno se distingan de los viriones de EEV que no se unen al antígeno. Se incluye cualquier método que permita que los viriones EEV recombinantes que expresan un dominio de unión específico al antígeno de un anticuerpo interactúen con el antígeno. Por ejemplo, si los viriones EEV están en suspensión y el antígeno está unido a un sustrato sólido, los viriones EEV recombinantes que se unen específicamente al antígeno quedarán atrapados en el sustrato sólido, de modo de permitir que los viriones que no se unen al antígeno sean arrastrados con agua y posteriormente los viriones EEV recombinantes unidos se recuperaren. Los métodos por los cuales se permite que los viriones EEV recombinantes entren en contacto con el antígeno se describen en la presente.

Después de la recuperación de viriones EEV recombinantes que se unen específicamente al antígeno, los polinucleótidos de la primera biblioteca pueden recuperarse de esos viriones EEV. Por "recuperación" se entiende una separación bruta de un componente deseado de aquellos componentes que no se desean. Por ejemplo, los viriones EEV recombinantes que se unen al antígeno pueden "recuperarse" en función de su unión a sustratos sólidos recubiertos con antígeno, por ejemplo, perlas magnéticas, que luego se pueden separar con un imán.

La recuperación de polinucleótidos se puede lograr mediante cualquier método estándar conocido por los entendidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos se recuperan recogiendo viriones EEV infecciosos que se unen al antígeno.

Como apreciarán fácilmente los entendidos en la técnica, la identificación de polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión de inmunoglobulina puede requerir dos o más rondas de selección, como se describió anteriormente, y necesariamente requerirá dos o más rondas de filtrado, como se describió anteriormente. Una sola ronda de selección puede no necesariamente resultar en el aislamiento de un conjunto puro de polinucleótidos que codifican los primeros polipéptidos de fusión de inmunoglobulina deseados; la mezcla obtenida después de una primera ronda puede enriquecerse para los polinucleótidos deseados, pero también puede estar contaminada con secuencias de inserciones no diana. Por consiguiente, la primera etapa de selección, como se describe, puede o debe repetirse una o más veces, de modo de enriquecer los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina deseados. Con el fin de repetir la primera etapa de esta realización, el EEV que comprende aquellos polinucleótidos recuperados como se describió anteriormente puede introducirse mediante infección en una población de células huésped. La segunda biblioteca de polinucleótidos también se introduce en estas células huésped, por ejemplo, mediante una infección con el virus vaccinia capaz de expresar las moléculas de inmunoglobulina complementarias (por ejemplo, cadenas ligeras) codificadas por los polinucleótidos en la biblioteca y la expresión de moléculas de inmunoglobulina o fragmentos de unión al antígeno de estas sobre la superficie de la membrana de los viriones EEV recombinantes. Los viriones EEV recombinantes se ponen en contacto de manera similar con el antígeno y los polinucleótidos de la primera biblioteca se vuelven a recuperar de los viriones EEV, que

expresan una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente al antígeno. Estos pasos pueden repetirse una o más veces, lo que resulta en un enriquecimiento para los polinucleótidos derivados de la primera biblioteca que codifica un polipéptido de fusión de inmunoglobulina que, como parte de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno de ella, se une específicamente al antígeno y/o tiene una característica funcional deseada.

Después del enriquecimiento adecuado para los polinucleótidos deseados de la primera biblioteca, como se describió anteriormente, los polinucleótidos que se han recuperado se "aislan", es decir, se eliminan sustancialmente de su entorno nativo y se separan en gran medida de los polinucleótidos en la biblioteca que no codifican polipéptidos de fusión de inmunoglobulina de unión al antígeno. Por ejemplo, los polinucleótidos clonados contenidos en un vector se consideran aislados. Se entiende que dos o más polipéptidos de fusión de inmunoglobulina diferentes que al combinarse con una cadena ligera, por ejemplo, se unen específicamente al mismo antígeno pueden recuperarse mediante los métodos descritos en la presente. Por consiguiente, una mezcla de polinucleótidos que codifican polipéptidos que se unen al mismo antígeno también se considera "aislada". Otros ejemplos de polinucleótidos aislados incluyen aquellos mantenidos en células huésped heterólogas, en vaccinia recombinante, por ejemplo, viriones EEV o moléculas de ADN purificadas (parcial o sustancialmente) en solución.

Sin embargo, un polinucleótido contenido en un clon que es miembro de una biblioteca mixta y que no se ha aislado de otros clones de la biblioteca, por ejemplo, en virtud de la codificación de un polipéptido de fusión de inmunoglobulina de unión al antígeno, no se "aísle" a los fines de esta invención. Por ejemplo, un polinucleótido contenido en un vector de virus se "aísle" después de que se haya recuperado y, opcionalmente, purificado en placa.

Dado que un antígeno puede comprender dos o más epítopenos y que varias moléculas de inmunoglobulina diferentes pueden unirse a cualquier epítope dado, se contempla que varios polinucleótidos adecuados, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, diez, 100 o más polinucleótidos, pueden recuperarse a partir de la primera etapa de esta realización, todos los cuales pueden codificar un polipéptido de fusión de inmunoglobulina que, cuando se combina con un polipéptido de subunidad de inmunoglobulina adecuado codificado por un polinucleótido preseleccionado o un polinucleótido de la segunda biblioteca, formará una molécula de inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno de esta, capaz de unirse específicamente al antígeno de interés. Se contempla que cada polinucleótido diferente recuperado de la primera biblioteca se aislaría por separado.

Una vez que se aíslan uno o más polinucleótidos adecuados de la primera biblioteca, en la segunda etapa de esta realización, se identifican uno o más polinucleótidos en la segunda biblioteca que codifican polipéptidos de la subunidad de inmunoglobulina que son capaces de asociarse con el o los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina codificados por los polinucleótidos aislados de la primera biblioteca para formar una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno de esta, que se une específicamente a un antígeno de interés.

En el presente documento se proporcionan vectores de virus vaccinia para la expresión de moléculas de unión al antígeno, donde la molécula de unión al antígeno, por ejemplo, una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y CH1, se expresa como una fusión con una proteína de membrana específica de EEV. En ciertas realizaciones, las cadenas pesadas pueden recuperarse como proteínas de fusión EEV y las bibliotecas de cadenas ligeras, o cadenas ligeras preseleccionadas individuales pueden expresarse como proteínas solubles en virus vaccinia u otros vectores, por ejemplo, vectores plasmídicos.

En ciertos aspectos, la inactivación de los virus que expresan una cadena complementaria soluble, por ejemplo, una cadena ligera, se puede realizar con 4'-aminometil-trioxsaleno (psoraleno) y luego se expone el vector del virus a la luz ultravioleta (UV). La inactivación de virus por psoral y UV es bien conocida por los entendidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Tsung, K., et al., J Virol. 70:165-171 (1996).

La capacidad de ensamblar y expresar moléculas de inmunoglobulina o fragmentos de unión al antígeno de estas en células eucarióticas de dos bibliotecas de polinucleótidos que codifican polipéptidos de subunidades de inmunoglobulina, donde una subunidad se expresa como una fusión con una proteína de membrana específica de EEV, proporciona una mejora significativa con respecto a los métodos de producir anticuerpos de cadena única en sistemas bacteriano, donde el proceso de selección en dos etapas puede ser la base para la selección de moléculas de inmunoglobulina o fragmentos de unión al antígeno de estas con una variedad de especificidades.

Vectores de vaccinia EEV Los poxvirus son únicos entre los virus de ADN, porque se replican solo en el citoplasma de la célula huésped, fuera del núcleo. Durante su ciclo de replicación, el virus vaccinia produce cuatro formas infecciosas que difieren en sus membranas externas: el virión maduro intracelular (IMV), el virión envuelto intracelular (IEV), el virión envuelto asociado a células (CEV) y el virión envuelto extracelular (EEV). La opinión predominante es que el IMV consiste en una sola membrana de lipoproteínas, mientras que el CEV y el EEV están rodeados por dos capas de membrana y el IEV tiene tres envolturas. El EEV se elimina de la membrana plasmática de la célula huésped y la membrana del EEV se deriva del trans-Golgi.

Después de la infección, el virus pierde su o sus membranas y el núcleo de ADN/proteína se transporta a lo largo de los microtúbulos hacia la célula. Las proteínas codificadas por ARNm de vaccinia temprana ("temprana" se define como la replicación previa al ADN) conducen a la remoción de capas del núcleo de vaccinia y la posterior replicación del ADN. Esta replicación ocurre en lo que se denominan "fábricas virales", que se ubican esencialmente en la parte superior del ER. Dentro de la fábrica viral, los viriones inmaduros (IV) se ensamblan y se procesan para formar el

- IMV (virus maduro intracelular). Los IMV contienen una membrana que se deriva de la ER. La mayoría de los IMV se liberan de la célula por lisis celular. Algunos IMV se transportan en microtúbulos a sitios de envoltura por membranas de la red trans-Golgi o endosomas tempranos. La envoltura de las partículas de IMV por una membrana doble crea una forma de vaccinia llamada IEV (virus envuelto intracelular). Los IEV se transportan luego a la superficie celular en microtúbulos. La membrana de IEV externa se fusiona con la membrana plasmática para exponer un CEV (virus asociado a célula) en la superficie celular. La polimerización de la actina de la célula huésped puede hacer que el CEV infecte las células vecinas o el virus puede ser liberado como un EEV. Véase, por ejemplo, Kim L. Roberts and Geoffrey L. Smith. Trends in Microbiology 16(10):472-479 (2008); Geoffrey L. Smith, et al., Journal of General Virology 83:2915-2931 (2002).
- 10 Al menos seis proteínas codificadas por virus han sido reportadas como componentes de la envoltura de EEV. De estas, cuatro proteínas (A33R, A34R, A56R y B5R) son glicoproteínas, una (A36R) es una proteína transmembrana no glicosilada y una (F13L) es una proteína de membrana periférica palmada. Véase, por ejemplo, Lorenzo et al., Journal of Virology 74(22):10535 (2000). Durante la infección, estas proteínas se localizan en el complejo de Golgi, donde se incorporan a virus infecciosos que luego se transportan y liberan en el medio extracelular. De conformidad con la presente, la inmunoglobulina, por ejemplo, las cadenas pesadas variables, se une a la membrana de EEV, como una proteína de fusión con una proteína A56R de membrana de EEV específica.
- 15 Las proteínas de fusión de EEV de conformidad con la presente pueden expresarse en cualquier virus vaccinia adecuado. En ciertas realizaciones, el ADN que codifica una proteína de fusión de EEV puede insertarse en una región del genoma del virus vaccinia que no es esencial para el crecimiento y la replicación del vector, de modo que se producen virus infecciosos. Aunque se ha caracterizado una variedad de regiones no esenciales del genoma del virus vaccinia, el locus más utilizado para la inserción de genes extraños es el locus de la timidina quinasa, ubicado en el fragmento HindIII J en el genoma.
- 20 Las bibliotecas de polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión de inmunoglobulina se insertan en vectores de virus vaccinia, en una asociación operable con una región de control transcripcional que funciona en el citoplasma de una célula infectada con poxvirus.
- 25 Las regiones de control transcripcional de poxvirus comprenden un promotor y una señal de terminación de la transcripción. La expresión génica en los poxvirus está regulada temporalmente y los promotores de genes tempranos, intermedios y tardíos poseen estructuras variables. Determinados genes de poxvirus se expresan de manera constitutiva y los promotores de estos genes "tempranos-tardíos" tienen estructuras hibridas. También se han desarrollado promotores sintéticos tempranos-tardíos. Véase Hammond J.M., et al., J. Virol. Methods 66:135-8 (1997); Chakrabarti S., et al., Biotechniques 23:1094-7 (1997). Para las realizaciones divulgadas en la presente, se puede usar cualquier promotor de poxvirus, pero el uso de promotores precoces, tardíos o constitutivos puede ser deseable en función de la célula huésped y/o el esquema de selección elegido. En ciertas realizaciones, se utiliza un promotor constitutivo. Un promotor adecuado para uso en los métodos descritos en la presente es el promotor temprano/tardío 7,5-kD o el promotor temprano/tardío H5 (o sus variantes).
- 30 El método de recombinación trimolecular. Tradicionalmente, los vectores de poxvirus como el virus vaccinia no se han utilizado para identificar genes de interés previamente desconocidos de bibliotecas complejas debido a que no existía un método de alta eficiencia y producción de titulación para construir y seleccionar bibliotecas para el virus vaccinia. Los métodos estándar de expresión de proteínas heterólogas en el virus vaccinia implican la recombinación homóloga *in vivo* y la ligación directa *in vitro*. A partir de la recombinación homóloga, la eficiencia de la producción de virus recombinante se ubica en el intervalo de aproximadamente 0.1% o menos. Aunque la eficiencia de la producción de virus recombinante mediante la ligadura directa es mayor, la titulación resultante es relativamente baja. Por lo tanto, el uso del vector de virus vaccinia se ha limitado a la clonación de ADN previamente aislado a los fines de la expresión de proteínas y el desarrollo de vacunas.
- 35 40 El método de recombinación trimolecular, como se describe en Zauderer, Publicación PCT No. WO 00/028016 y en la patente de los Estados Unidos No. 7,858,559, es un método de alta eficiencia y alta producción de titulación para producir bibliotecas en virus vaccinia. A partir del método de recombinación trimolecular, el presente inventor ha logrado la generación de virus recombinantes a eficiencias de al menos el 90% y titulaciones de al menos 2 órdenes de magnitud superiores a las obtenidas por ligación directa.
- 45 En ciertas realizaciones, pueden construirse bibliotecas de polinucleótidos capaces de expresar polipéptidos de fusión de inmunoglobulina, como se describe en la presente, en vectores de poxvirus, por ejemplo, vectores de virus vaccinia, por recombinación trimolecular.
- 50 En ciertas realizaciones, se proporciona un plásmido de transferencia para producir bibliotecas de polipéptidos de fusión, que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada CH1 de inmunoglobulina y al menos la porción transmembrana de una proteína A56R de virus vaccinia a través de una asociación operable con un promotor H5 de virus vaccinia. Un vector ejemplar es el promotor pJEM1, que comprende la secuencia:
- 55

AAAAAATGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAAATAATCAT  
 AAATTCCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAG **GGCGCG** ACTCCG  
 AGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGGCCCTGAGCTGAAGCAGCCTGGCGAGACCGTGAGGATCAGCTGC  
 AAGGCCAGCGGCTACACCTCACCAACTACGGCATGAACCTGGTGAAGCAGGCCCTGGCAAGGG  
 CCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCCAGCAGGCCCTACCTACGCCGACTTCAAGA  
 GGAGGTTCACCTCAGCCTGGAGACCAGCGCCAGCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAACCTGAAG  
 AACGACGACACCGCCACCTACTTCTGCGCCAAGTACCCCTACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTA  
 CTTGACGTGTGGGGCGCCGGCACAC **GGTCACCG** GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGG  
 TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTC  
 AAGGACTACTCCCCAACCGGTGACGGTGTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCAC  
 CACCTCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCT  
 CCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCGAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG  
GACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAAAGTAGATTATGAAAGATACTCCACAGA  
 GTTGATTGTAATACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAACTATCTGGATCTACACATTAC  
 CGGAAACTAGTTCTAAGAACCTGATTATAGATAATTCTAATTGCTCGTCGGATTTCGAAATC  
 GCGACTCCGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATACAGACACCGTCACATACACTAGTGA  
 TAGCATTAATACAGTAAGTGCATCATCTGGAGAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATT  
 CTGATAAAGAAGATCATACAGTTACAGACACTGTCTCATACACTACAGTAAGTACATCTGG  
 ATTGCTCACTACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTATGATACTGACAATGATAATGATAC  
 AGTACCAACCAACTACTGTAGGGCTAGTACAACCTCTATTAGCAATTAAAACCAAGGACTTG  
 TAGAAATATTGGTATTACCGCATTAATTATATTGTCGGCGTGGCAATTCTGTATTACATAT  
 TATATATATAATAACGTTACGTAAATACAAAACAGAGAACAAAGTCTAG

5

Subrayado doble - promotor H5

Subrayado simple - péptido líder

Subrayado ondulado - Región Pesada Variable Representativa

Subrayado en negrita - dominio IgG CH1

10 Sin subrayar - Vaccinia A56R

Cursiva negrita - sitio de clonación del gen variable BssHII y BstEII

designado en la presente como SEQ ID NO: 1. Se pueden insertar varias regiones variables de cadena pesada amplificadas por PCR en sitios únicos BssHII y BstEII, que se indican en dirección ascendente en negrita y cursiva.

15 El plásmido pJEM1 es un derivado de p7,5/tk descrito en la patente de los Estados Unidos No. 7,858,559. pJEM1 conserva las regiones flanqueantes de homología con el genoma vaccinia que permite la recombinación, como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 7,858,559. Sin embargo, en lugar del casete de expresión en p7,5/tk (promotor y secuencias expresadas), pJEM1 contiene los siguientes elementos:

Promotor H5 de virus vaccinia

20 Péptido líder

Sitio de clonación para clonar cadenas pesadas variables 5' BssHII

Región variable pesada

Sitio de clonación para clonar cadenas pesadas variables 3' BstEII

Dominio IgG CH1

25 Vaccinia A56R

Estos elementos están enumerados en la Figura 1 y en la SEQ ID NO: 1. Este casete se puede crear de manera sintética.

Un plásmido de transferencia de la presente divulgación que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de cadena ligera kappa de inmunoglobulina a través de una asociación operable con un promotor p7,5 del virus vaccinia es pVKE, que comprende la secuencia:

5      GGCCAAAAATTGAAAAACTAGATCTATTATTGCACGCCGGCCCATGGGA  
 TGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGC***GTGCACTTGAC***  
***TCGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTTCCGCCATCT***  
 GATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGCCTGCTGAATAACTT  
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG  
 GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC  
 AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA  
 GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTACAAAGA  
 GCTTCAACAGGGAGAGTGTAGGTCGAC

designada en la presente como SEQ ID NO: 2. Se pueden insertar regiones variables de cadena liviana kappa amplificadas por PCR en sitios únicos ApaLI y Xhol , indicados arriba en negrita.

10     Además, pVKE se puede usar en aquellas realizaciones en las que se desea tener polinucleótidos de la segunda biblioteca en un vector plásmido durante la selección de polinucleótidos de la primera biblioteca, como se describió anteriormente.

Otro plásmido de transferencia de la presente divulgación que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de cadena ligera lambda de inmunoglobulina a través de una asociación operable con un promotor p7,5 del virus vaccinia es pVLE, que comprende la secuencia:

15     GGCCAAAAATTGAAAAACTAGATCTATTATTGCACGCCGGCCCATGGGA  
 TGGAGCTGTATCATCCTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGC***GTGCACTTGAC***  
***CTCGAGAAAGCTTACCGCCTACGAACGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTT***  
 CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGCCTGC  
 TGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGC  
 CCTCCAATCGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC  
 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA  
 AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGT  
 CACAAAGAGCTAACAGGGAGAGTGTAGGTCGAC

designada en la presente como SEQ ID NO: 3. Se pueden insertar regiones variables de cadena liviana lambda amplificadas por PCR en sitios únicos ApaLI y HindIII, indicados arriba en negrita.

20     Además, pVLE se puede usar en aquellas realizaciones en las que se desea tener polinucleótidos de la segunda biblioteca en un vector plásmido durante la selección de polinucleótidos de la primera biblioteca, como se describió anteriormente.

25     La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican en detalle en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), ADN Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. Patente de los Estados Unidos No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D.

30     Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); and in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

40     Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se establecen en Antibody Engineering, 2nd edition, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). General principles of protein engineering are set forth in Protein

Engineering, A Practical Approach, Rickwood, D., et al., Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995). Los principios generales de los anticuerpos y la unión anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff, A., Molecular Immunology, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); and Steward, M.W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, New York, NY (1984). Además, generalmente se siguen los métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente, conforme se indican en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al. (eds) , Basic and Clinical -Immunology (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) and Mishell and Shiigi (eds), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., New York (1980).

Entre los trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales de inmunología se incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R., et al., eds., Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" in Burden, R., et al., eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984).

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Preparación de la proteína de fusión CH1-A56R

Las proteínas de fusión de la cadena pesada se construyeron para facilitar la selección de segmentos de inmunoglobulina específicos expresados en la superficie celular del virus vaccinia recombinante.

20 Mediante el método que se indica a continuación se construyó un vector de expresión que codifica una proteína de fusión que incluye el dominio CH1 de la cadena pesada humana de C gamma fusionada con los dominios extracelular y transmembrana de A56R del virus vaccinia de Western Reserve, designada en la presente como CH1-A56R, así como un VH específico de C35 (H2124).

25 pJEM1. Se construyó un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la región constante de inmunoglobulina gamma humana (CH1), un fragmento de vaccinia A56R y un casete para la inserción de una región variable de cadena pesada humana (por ejemplo, H2124), que en la presente se designa como "pJEM1". En resumen, el p7,5/tk, producido como se describe en la publicación PCT No. WO 00/028016, se convirtió en pJEM1 mediante el método que se describe a continuación.

30 IgG CH1. Un ADNc que codifica para la cadena pesada de IgG humana se aisló a partir de ARN de médula ósea mediante el Kit de Amplificación de ADNc SMART RACE™ disponible de Clontech, Palo Alto, CA. La PCR se llevó a cabo mediante el cebador 5' huCy1-5B: 5' ATTAGGATCC GGTCACCGTC TCCTCAGCC 3' (SEQ ID NO. 4) y el cebador 3' huCy1-3S: 5' ATTAGTCGAC TCATTTACCC GGAGACAGGG AGAG 3' (SEQ ID NO:5). El producto de PCR comprendía los siguientes elementos: BamHI-BstEII- (nucleótidos que codifican los aminoácidos 111-113 de VH) - (nucleótidos que codifican los aminoácidos 114-478 de Cy1)-TGA-Sall. Este producto se subclonó en pBluescriptII/KS en los sitios BamHI y Sall, y un segundo sitio BstEII correspondiente a los aminoácidos 191 y 192 dentro del dominio CH1 de Cy1 se eliminó por mutagénesis dirigida al sitio, sin cambio en la secuencia de aminoácidos. El plásmido pBluescriptII/KS también se digirió con BstEII y Sall, y el menor fragmento de ADN resultante de aproximadamente 1 Kb se purificó en gel. Este fragmento más pequeño se utilizó luego como modelo en una reacción de PCR mediante el uso del cebador directo CH1(F)-5'-  
40 CAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCAGCCTCC-3' (SEQ ID NO: 6) (sitio de restricción BstEII en cursiva y subrayado) y el cebador inverso CH1(R) 5'-AACTTCTGTCCACCTGGTGTG-3' (SEQ ID NO: 7). El producto de PCR resultante de aproximadamente 320 pares de bases se purificó en gel.

45 Se aisló la longitud completa IgG. Un ADNc que codifica para la cadena pesada de IgG humana a partir de ARN de médula ósea mediante el Kit de Amplificación de ADNc SMART RACE™ disponible de Clontech, Palo Alto, CA. La PCR se llevó a cabo mediante el cebador 5' huCy1-5B: (SEQ ID NO. 4) y el cebador 3' huCy1-3S: (SEQ ID NO. 5). El producto de PCR comprendía los siguientes elementos: BamHI-BstEII- (nucleótidos que codifican los aminoácidos 111-113 de VH) - (nucleótidos que codifican los aminoácidos 114-478 de Cy1)-TGA-Sall. Este producto se subclonó en pBluescriptII/KS en los sitios BamHI y Sall, y un segundo sitio BstEII correspondiente a los aminoácidos 191 y 192 dentro del dominio CH1 de Cy1 se eliminó por mutagénesis dirigida al sitio, sin cambio en la secuencia de aminoácidos. El plásmido pBluescriptII/KS se digirió con BstEII y Sall y el fragmento de ADN de 993 pares de bases correspondiente a IgG1 de longitud completa se purificó en gel.

50 A56R (forma larga). Un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 108 a 314 de la proteína hemaglutinina A56R de virus vaccinia (Western Reserve), que comprende el tallo, la transmembrana y los dominios intracelulares (acceso a Genbank n.º YP\_233063), se amplificó a partir de ADN aislado del virus vaccinia Western Reserve con cebador directo A56R (F)

55 5'-CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAG-3' (SEQ ID NO. 8) y cebador inverso A56R(R) 5'-TATAG7UOicCTAGACTTGTCTGTGTTGTATTACG-3' (SEQ ID NO. 9) (sitio de restricción

Sall en cursiva y subrayado). El producto de PCR resultante de aproximadamente 660 pares de bases se purificó en gel.

A56R (forma corta). Un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 240 a 314 de la proteína hemaglutinina A56R de virus vaccinia (Western Reserve), que comprende el tallo, la transmembrana y los dominios intracelulares (acceso a Genbank n.º YP\_233063), se amplificó a partir de ADN aislado del virus vaccinia Western Reserve con cebador directo A56R (F2) 5'-CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTACCACCGATGATGCGGATCTTATG A-3' (SEQ ID NO. 21) y cebador inverso A56R(R): (SEQ ID NO. 9). El producto de PCR resultante de aproximadamente 263 pares de bases se purificó en gel.

Construcción de Fab (IgG CH1 con A56R forma más larga). Los fragmentos de pares de bases 320 y 660 se combinaron luego con la técnica SOE PCR con el cebador directo CH1 (F) (SEQ ID NO. 6) y el cebador inverso CH1 (R2): 5'-ACAAAAGTATTGGTAATCGTGTCAACTTCTTGTCACCTGGTGTG-3' (SEQ ID NO. 22) para el producto 5' y A56R (F) (SEQ ID NO. 8) en combinación con A56R (R) (SEQ ID NO. 9) para el producto 3'. Estos dos productos se combinaron luego para producir un fragmento de fusión de aproximadamente 980 pares de bases. Este fragmento se digirió con BstEII y Sall, y el fragmento del par de base 934 resultante se purificó en gel.

Construcción de TR (Longitud completa IgG1 con A56R forma corta). Los fragmentos de pares de bases 993 y 263 se combinaron luego con la técnica SOE PCR con el cebador directo CH1 (F): (SEQ ID NO. 6) y el cebador inverso A56R(R2): 5'-TCATAAAGATCCGCATCATCGGTGGTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT C-3' (SEQ ID NO. 23) para el producto 5' y A56R(F3): 5'-GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAACACCACCGATGATGCGGATCTTATGA-3' (SEQ ID NO. 24) en combinación con A56R(R): (SEQ ID NO. 9) para el producto 3'. Estos dos productos se combinaron luego para producir un fragmento de fusión de aproximadamente 1256 pares de bases. Este fragmento se digirió con BstEII y Sall, y el fragmento del par de base 1235 resultante se purificó en gel.

Construcción de FL (Longitud completa IgG1 con A56R forma larga). Los fragmentos de pares de bases 993 y 660 se combinaron luego con la técnica SOE PCR con el cebador directo CH1 (F): (SEQ ID NO. 6) y el cebador inverso A56R(R3): 5'-TATCAGTGTCAATTGTAGTTGATGTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTC-3' (SEQ ID NO. 25) para el producto 5' y A56R(F4): 5'-GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAACATCAAACATGACACTGATA-3' (SEQ ID NO. 26) en combinación con A56R(R) (SEQ ID NO. 9) para el producto 3'. Estos dos productos se combinaron luego para producir un fragmento de fusión de aproximadamente 1653 pares de bases. Este fragmento se digirió con BstEII y Sall, y el fragmento del par de base 1632 resultante se purificó en gel.

El plásmido p7,5/tk también se digirió con BstEII y Sall, y el mayor fragmento resultante de aproximadamente 5,7 Kb se purificó en gel. Estos dos fragmentos BstEII/Sall se ligaron para producir el plásmido pJEM1.

pJEM 1 retiene las regiones flanqueantes de homología con el genoma de vaccinia que permite la recombinación. Sin embargo, en lugar del casete de expresión en p7,5/tk (promotor y secuencias expresadas), pJEM1 contiene los siguientes elementos: promotor del virus vaccina H5; péptido líder; 5' sitio de clonación BssHII para la clonación de las cadenas pesadas variables; región variable de cadena pesada; 3' sitio de clonación BstEII para la clonación de las cadenas pesadas variables; dominio IgG CH1; y Vaccinia A56R, la secuencia para estos elementos de pJEM1 se muestra en la **Figura 1** y SEQ ID NO. 1.

La región variable de cadena pesada (H2124), específica para C35, se insertó en los sitios de BssHII y BstEII de pJEM1 y produjo una construcción de fusión VH (H2124)-CH1-A56R. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para la construcción de fusión VH (H2124)-CH1-A56R preparada en pJEM1 se muestran a continuación, respectivamente.

Secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión del producto Fab VH (H2124)-CH1-A56R (SEQ ID NO. 10):

```
CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA
GACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGCTACTCCATCACCACGCGCTATT
TCTGGAACTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTA
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTCAAAAATAGGGTC
```

ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG  
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAACCTACCGGGTTT  
GCTTACTGGGCCAAGGGACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG  
GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACA  
GCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT  
CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCCGCTGTCCT  
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCCTCCAGCA  
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC  
CAAGGTGGACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAAAGTAGAT  
TATGAAGAATACTCCACAGAGTTATTGTAATACAGATAGTGAATCGACTA  
TAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTACCGGAAACTAGTTCTAAGAA  
ACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGGTATTGAAATCGCGACTC  
CGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATACAGACACCGTCACATACAC  
TAGTGTACCATTAATAACAGTAAGTGCATCATCTGGAGAATCCACAACAGAC  
GAGACTCCGGAACCAATTACTGATAAAAGAAGATCATACAGTTACAGACACTG  
TCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGGATTGTCACTACTAAATCAACC  
ACCGATGATGCGGATCTTATGATAACGTACAATGATAATGATAACAGTACCCAC  
CAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGA  
CTTGTAGAAATATTGGTATTACCGCTTAATTATATTGTCGGCCGTGGCAA  
TTTCTGTATTACATATTATATATAAAACGTACACGTAACAAACAAAAACA  
GAGAACAAAGTCTAG

La secuencia de nucleótidos que codifica los dominios VH (H2124) y CH1 está subrayada, y la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio A56R está subrayada doble.

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión del producto Fab VH (H2124)-CH1-A56R (SEQ ID NO. 11):

5

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGYTSGYFWNWIROPPGKGLEWI  
GYISYDGSSNSNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTYCARGTTGFA  
YWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKV  
TSTTNNDKVDYEEYSTELIVNTDSESTIDIILSGSTHSPETSSKKPDYIDNSNCSSV  
FEIATPEPITDNVEDHTDTVYTSDSINTVSASSGESTTDETFPEPITDKEDHTVTDT  
  
VSYTTVSTSSGIVTTKSTTDDADLYDTYNDNDTVPPPPTVGGSTSISNYKTKDFVE  
IFGITALIILSAVAIFCITYYIYNKRSRKYKTENKV.

10

La secuencia de aminoácidos para VH (H2124) y el dominio CH1 está subrayada, y la secuencia de aminoácidos que codifica el dominio A56R está subrayada doble.

Secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de la construcción TR VH (H2124)-IgG-A56R (SEQ ID NO. 27):

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA  
GACCCCTGTCCCTCACCTGCCTGTCTATGGCTACTCCATACCAGCGGCTATT  
TCTGGAACTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGATTGGGTA  
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTAAAAATAGGGTC  
ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCACTCTCCAGAGCTGAGCTCTG  
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTATTACTGTGCCAGAGGAACCTACCGGGTTT  
GCTTA<sub>CT</sub>GGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG  
GCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCCCTGGGGCACA  
GC<sub>GG</sub>CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGT  
CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGTCCT  
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCA  
GCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACAC  
CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAAC<sub>T</sub>CACACATGC  
CCACCGTGCCCAGCACCTGA<sub>A</sub>CTCCTGGGGACC<sub>G</sub>TCA<sub>G</sub>TCTCCTCTCCC  
CCC<sub>A</sub>AAACCCAAGGACACCC<sub>T</sub>CATGATCTCCCGACCC<sub>G</sub>TGAGGTACATGC  
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC<sub>G</sub>TGAGGTCAAGITCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT  
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC<sub>G</sub>TCTGCACCCAGGACTG  
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGA<sub>A</sub>GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC  
CCC<sub>A</sub>TCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAG  
GTGTACACCC<sub>T</sub>GCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGT<sub>G</sub>CAGCC  
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGA  
GAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA<sub>G</sub>CACGCC<sub>T</sub>CCGTGCTGGAC  
TCCGACGGCTCCTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG  
GCAGCAGGGAAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAAC

CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAACCACCGATGATG  
CGGATCTTATGATACGTACAATGATAATGATAACAGTACCAACTACTGTA  
GGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGACTTTGTAGAAA  
TATTTGGTATTACCGCATTAAATTATATTGTCCGCCGTGGCAATTCTGTATTA  
CATATTATATATAATAAACGTTACGTAAATACAAAACAGAGAACAAAGT  
CTAG

5 La secuencia de nucleótidos que codifica VH (H2124) y el dominio Ig de longitud completa está subrayada, y la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de forma corta A56R está subrayada doble.

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la construcción TR VH (H2124)-IgG-A56R (SEQ ID NO. 28):

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGYSITSGYFWNWIRQPPGKGLEWI  
GYISYDGSSNSNPSLKNRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGTTGFA  
YWGQGTLTVSSASIKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKV  
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSISPGKTDDADLYDTYNDNDTVPPTVGGSTSISNYKTKDFVEI  
FGITALIILSAVAIFCITYYIYNKRSRKYKTENKV.

- 5 La secuencia de aminoácidos para VH (H2124) y el dominio Ig de longitud completa está subrayada, y la secuencia de aminoácidos que codifica el dominio A56R está subrayada doble.

Secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de la construcción FL VH (H2124)-IgG-A56R (SEQ ID NO. 29):

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCAGGACTGCTGAAGCCTAGCGA  
GACCCTGTCCCTCACCTGCCGTGTCTATGGCTACTCCATCACCAGCGGCTATT  
TCTGGAACTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGATTGGTA  
CATCAGCTACGACGGCAGCAGCAACTCCAACCCATCTCTAAAAATAGGGTC

ACAATCAGCAGAGACACCTCCAAGAACCAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG  
TGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGGAACTACCGGGTTT  
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG  
GCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGACACCTCTGGGGCACA  
GCGGCCCTGGCTGCCCTGGTAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT  
CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTCCGGCTGCCT  
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCGTGACCGTGCCCTCCAGCA  
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC  
CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGC  
CCACCGTGCCAACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCC  
CCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTCACATGC  
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT  
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTG  
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC  
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAG  
GTGTACACCCTGCCCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAGCC  
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGA  
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAACGCCCTCCGTGCTGGAC  
TCCGACGGCTCCTCTTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTG  
GCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGTCTGCACAAAC  
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAACATCAACTACAA  
ATGACACTGATAAAAGTAGATTATGAAGAAAACTCCACAGAGTTGATTGTAAA  
TACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAACTATCTGGATCTACACATTCAC  
CGGAAACTAGTCTAAGAACCTGATTATAGATAATTCTAATTGCTCGTCG  
GTATTGAAATCGCGACTCCGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATA  
CAGACACCGTCACATACACTAGTGAAGCATTAATACAGTAAGTGCATCATC  
TGGAGAACCCACACAGACGAGACTCCGGAACCAATTACTGATAAAAGAAGAT  
CATACAGTTACAGACACTGTCTACACTACAGTAAGTACATCATCTGGAAT  
TGTCACTACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTATGATACGTACAATG  
ATAATGATAACAGTACCAACCAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAG  
CAATTATAAAACCAAGGACTTTGTAGAAATATTGGTATTACCGCATTAAATTA  
  
TATTGTCGGCCGTGGCAATTCTGTATTACATATTATATATATAATAAACGTT  
CACGTAAATACAAAACAGAGAACAAAGTCTAG.

5 La secuencia de nucleótidos que codifica VH (H2124) y el dominio Ig de longitud completa está subrayada, y la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de forma larga A56R está subrayada doble.

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la construcción FL VH (H2124)-IgG-A56R (SEQ ID NO. 30):

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGYSITSGYFWNWIROPPGKGLEWI  
GYISYDGSSNSNPSLKNVRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGTTGFA  
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPFPEPVTSWNS  
GALTSGVHTEPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV  
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
EVKFNWYVDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTOKSLSLSPGKTSTTNDKVDYEEYSTELIVNTDSESTIDIILSGSTHSPETS  
SKKPDYIDNSNCSSVFEIATPEPITDNVEDHTDTVYTSDSINTVSASSGESTTDET  
PEPITDKEDHTVTDTVSYTTVSTSSGIVTTKSTTDDADLYDTYNDNDTVPPITVG  
GSTTSISNYKTKDVEIFGITALIILSAVAIFCITYYYIYNKRSRKYKTENKV

La secuencia de aminoácidos para VH (H2124) y el dominio Ig de longitud completa está subrayada, y la secuencia de aminoácidos que codifica el dominio de forma larga A56R está subrayada doble.

## 5 Ejemplo 2

### Expresión de la proteína de fusión A56R en la superficie de las células HeLa

Las células HeLa fueron infectadas o coinfectadas con virus vaccinia recombinante EEV que expresan construcciones de fusión de inmunoglobulinas, Variable Pesada (H2124) CH1-A56R (descrita en el Ejemplo anterior) e Ig-K ("A56R H + L") o scFv -A56R ("A56R scFv"). En la **Figura 2** se muestra una ilustración de la estrategia general para la infección de células con el virus vaccinia recombinante EEV y los pasos subsiguientes de selección de la biblioteca. En el ejemplo actual, en lugar de utilizar bibliotecas, las células HeLa se coinfectaron con virus vaccinia recombinante que expresaba la fusión VH (H2124) CH1-A56R y virus vaccinia recombinante que expresaba Ig-K (A56R H + L) o se infectaron con virus vaccinia recombinante que expresaba scFv-A56R. Se realizó un análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción con C35 y la tinción con CD100 de células infectadas con virus vaccinia recombinante EEV. Rápidamente se agregaron 1 µg/ml de CD 100-His o 1 µg/ml de C3 5-His a las muestras y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Luego, las células se lavaron y se añadió APC anti-his y las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo, y posteriormente se lavaron, fijaron y analizaron. Los datos de FACS se muestran en la Figura 3A-C. Estos resultados muestran que las proteínas de fusión A56R se expresaron en la superficie celular.

20 Los clones en formato EEV también se sometieron a pruebas mediante ELISA; la proteína C35 purificada se revistió en una placa ELISA de 96 pocillos (placa inmune de fondo plano de 96 pocillos Nunc-MaxiSorp Cat # 439454) a 1 µg/ml en buffer carbonato. La placa se lavó y luego se bloqueó con 1 x PBS, FBS al 10%, luego se añadió a la placa EEV inactivado con Psoralen, se diluyó en 1 x PBS/FBS al 10%/Tween-20 al 0,05%, en los pocillos designados y se dejó que se unieran. Las partículas virales se detectaron mediante el anticuerpo conjugado con HRP anti-vaccinia generado en conejo (catálogo AbCam n.º 28250), y el anticuerpo se diluyó 1:2000 en 1XPBS/FBS al 10%/Tween-20 al 0,05%. A continuación, se añadió sustrato de TMB a la placa (para detectar la actividad de peroxidasa de rábano (HRP)); se dejó que se desarrollara el color y luego se terminó la reacción con un volumen igual de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La placa se leyó en un lector de placas ELISA y los resultados se muestran en la Figura 4A. Se utilizó una segunda prueba ELISA para confirmar la unión mediante la detección de FAbs, utilizando las mismas condiciones anteriores, excepto que el anticuerpo secundario fue de cabra anti-IgG humana F(ab')<sub>2</sub>-HRP (catálogo Jackson ImmunoResearch n.º 109-036-097) mediante una dilución 1:10.000 del anticuerpo stock, con 1 X PBS/FBS al 10%/Tween-20 al 0,05% como buffer de dilución. Los resultados se muestran en la Figura 4B. Los pocillos que fueron positivos en ambas placas mostraron que la construcción del anticuerpo se expresó en presencia del virión viral vaccinia. Como se muestra en la Figura 3A-B, EEV contiene la proteína de fusión específica C35 (etiquetada como "A56R EEV") unida a C35, mientras que un control ("L517 + G7000-A56R EEV"), que no une a EEV con C35, no se unió, y el anticuerpo específico de C35 en formato IgG1 unido a la membrana estándar ("mbg EEV") tampoco se unió. Los datos demostraron la unión específica de antígeno de EEV cuando el anticuerpo se expresó con A56R.

**Ejemplo 3****Selección de proteínas de fusión basadas en placa y en solución**

El virus vaccinia recombinante que expresaba fusiones A56R con moléculas de unión a C35 y VEGF conocidas fue sometido a pruebas para determinar la unión a moléculas objetivo mediante un ensayo basado en la exploración.

5 El EEV recombinante que expresa moléculas de inmunoglobulina conocidas por ser específicas para C35 (scFv2408-A56R, H2124-L517-A56R doble gen, y L517 + H2124-A56R coinfección) o VEGF (L7000 + H7000-A56R) se produjo en las células BSC1 (por alrededor de 24 horas). El doble gen H2124-L517-A56R produjo el mismo anticuerpo que el L517 + H2124-A56R, excepto que los genes Ig-H e Ig-K fueron codificados por el mismo virus del gen doble y los genes Ig-H e Ig-K fueron codificados por virus separados utilizados para la coinfección H2124-A56R.

10 Los clones en formato EEV se analizaron mediante ensayo en placa. Las placas de ELISA de 96 pocillos estériles se recubrieron con 1 µg/ml de C35 o 1 µg/ml de VEGF. EEV que contenía el sobrenadante "Puro" (sin diluir) se diluyó por dilución en serie en diluciones de 1:10 a 1:10<sup>6</sup>. Se agregaron 100 µl de las diversas construcciones de virus en los pocillos designados y se dejó que la unión continuara durante 2 horas o toda la noche a temperatura ambiente. Las células se lavaron 10 veces con PBS para eliminar el EEV no unido y luego se agregaron aproximadamente 15 25.000 células BSC1 a cada pocillo, y las placas se incubaron a 37°C durante la noche. La formación de placa se detectó al teñir los pocillos con violeta cristal. Las Figuras 5A-D muestran los resultados del ensayo de placa para la unión de C35 después de 2 horas y durante la noche, y la unión de VEGF después de 2 horas y durante la noche, respectivamente. Estos resultados mostraron que las proteínas de fusión A56R se expresaron en la superficie de los viriones de vaccinia. Además, los resultados mostraron que los segmentos de unión conocidos producidos mediante fusiones A56R expresadas en EEV fueron capaces de unirse a sus objetivos específicos.

20 Luego, la selección basada en perlas se realizó mediante perlas de estreptavidina, perlas de Proteína G o perlas tosilactivas.

Selección de perlas de estreptavidina (SAV). La selección basada en perlas magnéticas se sometió a pruebas con EEV recombinante que expresa MAb 2408 (H2124-A56R + L517 (específico de C35)) o MAb 7000 (H7000-A56R + L7000 (específico de VEGF)).

25 Se infectaron células Hela con las diversas construcciones de virus en dos matraces T175 durante 2 días, se recogió el sobrenadante y se sedimentaron las células. La EEV se sedimentó mediante centrifugación durante 1 hora en un rotor SA-600 a 15.000 RPM. El sedimento de EEV se resuspendió en 1 ml de DMEM suplementado con FBS al 10%. Para cada virus recombinante, se utilizaron 500 µl de sobrenadante (~10<sup>7</sup> pfu). Seguidamente se agregaron a cada muestra 500 µl de DMEM con 1 µg de biotina-C35 (lo que dio como resultado una solución de 1 ml de volumen con una concentración de 1 µg/ml). La solución se incubó en una habitación fría en un rotador durante 2 horas. Se añadieron 200 µl de perlas magnéticas de estreptavidina (SAV) M280 a la solución de EEV/C35 (la concentración de perlas de SAV fue lo suficientemente alta para unir toda la biotina-C35, por lo que no se requirió ninguna etapa de lavado). La solución se hizo girar a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir que las perlas se unieran a la biotina-C35. Las construcciones de virus preparadas como se describió anteriormente se añadieron a las perlas. Las perlas se recogieron mediante un imán, y el virus no unido se recogió por separado. Las perlas se lavaron 5 veces con 1 ml de PBS. Todos los lavados con el virus no unido se agruparon ("No unido"). Las perlas fueron removidas del imán. Se añadió 1 ml de DMEM suplementado con FBS al 2,5% y la solución se transfirió a un tubo nuevo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido". Los resultados se muestran en la Tabla 1. Estos resultados muestran que el EEV que expresa el anticuerpo 2408, específico de C35, se unió a las perlas, mientras que el EEV que expresa el anticuerpo 7000, específico de VEGF, no se unió.

40 Tabla 1: Selección de mAb específico de C35 con perlas magnéticas SAV y biotina-C35

Virus	Titulación	% Unión
MAb 7000 - No unido	1,45 x 10 <sup>7</sup>	
MAb 7000 - Unido	1,2 x 10 <sup>4</sup>	0,1%
MAb 2408 - No unido	7,6 x 10 <sup>6</sup>	
MAb 2408 - Unido	7,7 x 10 <sup>5</sup>	50%

45 Se realizaron experimentos con muestras enriquecidas en los que EEV que expresaba L517 se ajustó a moi = 1, y se coinfectó en Hela con una mezcla en la que EEV que expresaba H2124-A56R se diluyó a 1:10<sup>4</sup> y 1:10<sup>5</sup> con H7000 A56R (un Hela T175 por condición enriquecida). En resumen, se cultivó EEV y se usaron 500 µl de EEV que contenía sobrenadante (5X10<sup>6</sup> pfu) para cada muestra enriquecida. Se agregaron a cada muestra 500 µl de DMEM con 1 µg de biotina-hC35 (una solución de 1 ml de volumen con una concentración de 1 µg/ml). Las soluciones Unido y No unido se recolectaron con el método de selección de perlas SAV (M280) descrito anteriormente. El virus unido se amplificó en BSC1 en matraces T75.

Las muestras Unidas y No unidas recolectadas para cada experimento con muestras enriquecidas se sometieron a pruebas de citometría de flujo. Los resultados de los experimentos de muestras enriquecidas presentaron un claro enriquecimiento con perlas  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  y esa selección de perlas fue más eficiente que el método de selección de placas (no se muestran los datos).

- 5 También se realizaron pruebas sobre diferentes perlas -perlas de Proteína G (Dynal) y perlas tosilactivas (Dynal)- con métodos similares a los descritos anteriormente para perlas SAV. Los siguientes anticuerpos previamente identificados se utilizaron durante los ensayos de selección: MAb 2408 (anticuerpo específico de C35, un anticuerpo 1F2 humanizado que comprende H2124 + L517), MAb 2368 (anticuerpo específico de CD100, descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2010/0285036), mAb 7000 (anticuerpo parental de bevacizumab específico de VEGF) y mAb 8000 (anticuerpo parental de trastuzumab específico de Her2).

Selección de perlas de Proteína G Se usó EEV producido en infecciones a pequeña escala de células Hela en placas de 6 pocillos (título  $\sim 5 \times 10^5$ /ml). La selección de perlas de Proteína G se sometió a pruebas mediante EEV que expresaba 2368-A56R (H2090-A56R + L512, tanto VH como VL expresadas en vaccinia): 1 ml de virus ( $\sim 5 \times 10^5$  pfu) y EEV que expresaba 2408-A56R (H2124-A56R + L517, tanto VH como VL expresadas en vaccinia): 1 ml de virus ( $5 \times 10^5$  pfu). Se preparó CD100 unido a perlas de Proteína G de la siguiente manera: Se utilizaron 300 µl de perlas de Proteína G magnética (2 veces la cantidad estándar/muestra) y se extrajeron con un imán. Se añadieron 600 µl de PBS + 18 µl de CD100-Fc (= 36 µg) a las perlas, que se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos (en el rotador) para permitir que CD100-Fc se uniera a las perlas de Proteína G. Las perlas se extrajeron con un imán y se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS. A continuación, las perlas se resuspendieron en 300 µl de DMEM suplementado con un 10%. Se añadieron 100 µl de perlas de CD100-Fc/Pro G a cada muestra de virus (aproximadamente 2 veces la cantidad estándar de perlas de Pro-G), que era aproximadamente 12 µg/ml de CD100-Fc. La solución se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retiraron 550 µl (aproximadamente 50%) de las perlas y se recogieron las No unido; luego se realizaron 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán, se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5% y la solución se transfirió a un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido". Los 550 µl restantes continuaron incubando a temperatura ambiente durante otras 1,5 horas (3,5 horas en total) y luego durante 18 horas a 4 grados antes de ser recolectados como se describió anteriormente.

Selección de perlas tosilativadas El EEV que expresa los mismos anticuerpos 2408 (específicos de C35) y 2368 (específicos de CD100) utilizados en la selección de perlas de la Proteína G se usaron anteriormente para la selección de perlas magnéticas tosilativadas. Se conjugaron 100µg de C35-His con perlas magnéticas tosilativadas en un buffer de recubrimiento (CB) ELISA o PBS. La solución se incubó a 37 grados durante la noche y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con PBS, FBS al 10%, BSA al 0,5%. Las perlas se lavaron 1 vez, se resuspendieron en 160 µl de DMEM suplementado con un 10%. Se agregaron 50 µl de cada muestra de perlas a cada muestra de virus y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 horas. No unido se recogió después de realizar 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán, se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5%, y las perlas se transfirieron a un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido".

Se conjugaron 100 µg de CD100-His con perlas magnéticas tosilativadas en PBS para el ensayo de selección del anticuerpo CD100 con 2368-A56R (1 ml de virus ( $\sim 5 \times 10^5$  pfu)) y 2408-A56R (1 ml de virus ( $5 \times 10^5$  pfu)) con los mismos métodos descritos anteriormente para el ensayo de selección de anticuerpos C35.

- 40 Los resultados que utilizan la selección de perlas de Proteína G se muestran en la Tabla 2 y los resultados que utilizan la selección de perlas tosilativadas se muestran en las **Tablas 3 y 4**.

Tabla 2: Selección de mAb específico de CD100 con CD100-Fc y perlas de Proteína G

Virus/Tiempo de unión	Muestra	Titulación	% Unión
mAb 2408 - 2 horas	No unido	100.000	
mAb 2408 - 2 horas	Unido	360	0,36%
mAb 2368 - 2 horas	No unido	64.000	
mAb 2368 - 2 horas	Unido	88.000	58%
MAb 2368 - durante la noche	No unido	130.000	
MAb 2368 - durante la noche	Unido	90.000	41%
MAb 2408 - durante la noche	No unido	320.000	
MAb 2408 - durante la noche	Unido	160	0,05%

Tabla 3: Selección de mAb específico de C35 con perlas tosilactivadas C35

Virus	Muestra	Titulación	% Unión
MAb 2408	No unido	96.000	
MAb 2408	Unido	160.000	61%
MAb 2368	No unido	240.000	
MAb 2368	Unido	1.600	0,6%
MAb 2408	No unido	97.000	
MAb 2408	Unido	140.000	59%

Tabla 4: Selección de mAb específico de CD100 con perlas tosilactivadas CD100-His

Virus	Muestra	Titulación	% Unión
MAb 2408	No unido	384.000	
MAb 2408	Unido	480	0,1%
MAb 2368	No unido	264.000	
MAb 2368	Unido	232.000	46,7%

5   **Ejemplo 4****Creación de la biblioteca de proteínas de fusión CH1-A56R**

Se produjo una biblioteca de polinucleótidos que codifican segmentos de inmunoglobulina. Se creó una biblioteca de vaccinia recombinante denominada "pesada ingenua, fusión A56R" con un ARN de médula ósea que se compró a un proveedor comercial (Life Technologies) que representa a más de 100 donantes. La transcripción inversa se realizó con cebadores antisentido específicos para la región constante de inmunoglobulina humana gamma o mu. El ADNc resultante se usó como plantilla para PCR con uno de los dos cebadores de sentido que se unieron al comienzo de la región estructural pesada humana 1 e introdujo un sitio de restricción BssHII en combinación con un grupo de cebadores antisentido que se unieron a los diversos segmentos J humanos de la línea germinal e introdujo un sitio de restricción BstEII. Las secuencias de estos cebadores fueron las siguientes:

15    Sentido VH 3: AATATGCGCGCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (SEQ ID NO. 12)

Sentido VH 3a: AATATGCGCGCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (SEQ ID NO. 13)

Antisentido JH 1: GAGACGGTGACCAGGGTGCCCTGGCCCCA (SEQ ID NO. 14)

Antisentido JH 2: GAGACGGTGACCAGGGTGCCACGGCCCCA (SEQ ID NO. 15)

Antisentido JH 3: GAGACGGTGACCATTGCCCTGGCCCCA (SEQ ID NO. 16)

20    Antisentido JH 4/5: GAGACGGTGACCAGGGTCCCTGGCCCCA (SEQ ID NO. 17)

Antisentido JH 6: GAGACGGTGACCCTGGTCCCTGGCCCCA (SEQ ID NO. 18)

Los productos PCR resultantes se clonaron en el plásmido pJEM1 descrito anteriormente con el propósito de crear virus vaccinia recombinante. En particular, el casete de expresión pesada variable de inmunoglobulina humana descrito en este documento se clonó en un marco con la región del dominio constante de inmunoglobulina humana CH1 y el ADNc de la proteína de membrana A56R de la membrana integral del virus vaccinia. Las proteínas resultantes creadas a partir de la expresión de la biblioteca eran proteínas de fusión que contenían un segmento variable de cadena pesada de inmunoglobulina, la cadena pesada CH1 y una parte de la proteína A56R expresada en la superficie de vaccinia EEV.

25    La biblioteca pesada ingenua, fusión A56R, se usó junto con vaccinia que expresa Ig-L conocida o una biblioteca de Ig-L expresada por el virus vaccinia (como se describe previamente en la Patente de Estados Unidos No. 7.858.559) para la exploración de vaccinia, como se ilustra en la **Figura 2**.

**Ejemplo 5****Cribado de la biblioteca de proteínas de fusión CH1-A56R para la selección de anticuerpos CD100**

Se realizó la selección de nuevos anticuerpos CD100 mediante ~1.200.000 clones de la biblioteca pesada ingenua, fusión A56R (también denominada "biblioteca 3") descrita en el Ejemplo anterior + clones de cadena ligera (L48, L116 y L9021).

Se infectaron células T-175 Hela con EEV que expresaba la biblioteca de fusión + cadenas ligeras descritas anteriormente durante 2 días, después de lo cual se recogió el sobrenadante, se sedimentó con giros de baja velocidad 2 veces y se sedimentó el EEV a 15.000 RPM durante 1 hora. El EEV se resuspendió en 3 ml de DMEM suplementado con FBS al 10%.

- 10 Ronda 1: Selección. Se utilizaron como controles EEV que expresa 2368-A56R (1 ml de virus ( $\sim 5 \times 10^5$  pfu)) y EEV que expresa 2408-A56R (1 ml de virus ( $5 \times 10^5$  pfu)) y la biblioteca 3 (1 ml de virus ( $\sim 10^8$  pfu)) se utilizó para el ensayo de selección. Primero, se extrajeron 300  $\mu$ l de perlas de Proteína G (2 veces la cantidad estándar/muestra) con un imán y se agregaron a las perlas 600  $\mu$ l de PBS + 18  $\mu$ l de CD100-Fc (= 36  $\mu$ g). La solución se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos (en un rotador) para permitir que CD100-Fc se uniera a las perlas de Proteína G. Las perlas se extrajeron con un imán, se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de DMEM suplementado con un 10%.

- 15 A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de CD100-Fc/Pro G por muestra (aproximadamente 12  $\mu$ g/ml de CD100-Pc) al EEV (controles 2408 y 2368, y biblioteca 3) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retiraron 550  $\mu$ l (aproximadamente 50%) de las perlas y se recogió el virus No unido; luego se realizaron 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán y se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5% y la solución se transfirió a un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido". Estas muestras de "incubación de 2 horas" se titularon con metilcelulosa añadida después de 45 minutos. Las perlas recuperadas de la biblioteca unida se amplificaron en BSC1 en T75 (esta selección de 2 horas de la Ronda 1 se denominó "CD100 3.1A"). Los otros 550  $\mu$ l (aproximadamente el 50%) de las perlas se continuaron incubando a temperatura ambiente durante otras 1,5 horas (3,5 horas en total) y luego durante 18 horas a 4°C grados ("durante la noche"). El virus no unido se recogió después de realizar 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán, se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5% y la solución se transfirió a un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido". La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (esta selección durante la noche de la Ronda 1 se denominó "CD100 3.1B"). Los resultados se muestran en la **Tabla 5**.

- 30 Tabla 5: Ronda 1: Selección de CD100 Ab

Virus/Tiempo de unión	Muestra	Titulación	% Unión
2408-2 horas	No unido	100.000	
2408-2 horas	Unido	360	0,36%
2368-2 horas	No unido	64.000	
2368-2 horas	Unido	88.000	58%
Biblioteca 3.1A-2 horas	No unido	22.000.000	
Biblioteca 3.1A-2 horas	Unido	20.000	~0,1%
2408-Durante la noche	No unido	130.000	
2408-Durante la noche	Unido	90.000	41%
2368-Durante la noche	No unido	320.000	
2368-Durante la noche	Unido	160	0,05%
Biblioteca 3.1B-Durante la noche	No unido	56.000.000	
Biblioteca 3.1B-Durante la noche	Unido	17.000	0,03%

Respecto de las bibliotecas 3.1A y 3.1B se pudo realizar una buena amplificación en BSC1, recolección y titulación ( $\sim 2 \times 10^7$ /ml cada una).

- 35 Ronda 2: Selección. Se usó EEV producido en infecciones a pequeña escala de células Hela en placas de 6 pocillos (título  $\sim 5 \times 10^5$ /ml). Las bibliotecas 3.1A y 3.1B se agruparon en una sola muestra. EEV que expresa 2368-A56R (1 ml de virus ( $\sim 5 \times 10^5$  pfu)), EEV que expresa 2408-A56R (1 ml de virus ( $5 \times 10^5$  pfu)) y la biblioteca 3.1A/B (1 ml de virus ( $\sim 5 \times 10^5$  pfu)) se combinaron individualmente con 300  $\mu$ l de perlas de Proteína G (2 veces la cantidad

estándar/muestra). Se añadieron a las perlas 600 µl de PBS + 18 µl de CD100-Fc (= 36 µg). La solución se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos (en un rotador) para permitir que CD100-Fc se uniera a las perlas de Proteína G. Las perlas se lavaron y se resuspendieron como se describió anteriormente para la Ronda 1. Se añadieron 100 µl de CD100-Fc/Pro G por muestra (~12 µg/ml de CD100-Fc) a las muestras de virus y se incubaron durante 4,5 horas a temperatura ambiente. Los "No unido" y "Unido" fueron recopilados y titulados. La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (la selección de la Ronda 2 se denominó "CD100 3.2"). Los resultados de la selección de la Ronda 2 se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Ronda 2: Selección para CD100 Ab

Virus-Antígeno	Muestra	Titulación	% Unión
2408-CD100-Fc	No unido	384.000	
2408- CD100-Fc	Unido	780	0,2%
2368- CD100-Fc	No unido	264.000	
2368- CD100-Fc	Unido	224.000	46%
Biblioteca 3.2-CD100-Fc	No unido	780.000	
Biblioteca 3.2-CD100-Fc	Unido	5.000	0,6%

Respecto de la biblioteca 3.2, se pudo realizar una buena amplificación en BSC1, recolección y titulación (~3X10<sup>7</sup>/ml), y dio como resultado una pequeña población de células positivas. Se realizó una tercera ronda de selección.

Ronda 3: Selección. Se realizó una tercera ronda de selección con los mismos métodos descritos anteriormente mediante la "biblioteca 3.2A" (Rondas 1 y 2 = CD100-Fc/Pro G). La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (la selección de la Ronda 3 se denominó "CD100 3.3A"). Los resultados de la selección de la Ronda 3A se sometieron a pruebas de citometría de flujo. Se realizó una segunda selección de la Ronda 3 con 100 µg de CD100-His conjugado con perlas magnéticas tosilactivadas en PBS mediante los métodos descritos anteriormente. Se agregaron 50 µl por muestra para la selección con el mismo lote de virus que se usó para CD100 3.3A (2368-A56R (1 ml de virus (5X10<sup>5</sup> pfu)), 2408-A56R (1 ml de virus (5X10<sup>5</sup> pfu)) y 3.2A (1 ml de virus (5X10<sup>5</sup> pfu)). Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Los "No unido" y "Unido" fueron recopilados y titulados. La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (la selección tosilactivada de la Ronda 3 se denominó "CD100 3.3B"). Los resultados de la selección de la Ronda 3B se sometieron a pruebas de citometría de flujo. En la **Figura 6** se ilustra un diagrama que resume la estrategia de selección del anticuerpo CD100.

La tinción de citometría de flujo sugirió que probablemente había una población positiva en CD100 3.3A/B cuando se pareó con L116. Las placas de 3.3A (n = 27) y 3.3B (n = 30) se seleccionaron y amplificaron durante 3 días en BSC1 en una placa de 24 pocillos (1 placa por pocillo). Las células Hela se infectaron en placas de 24 pocillos con 1/3 de cada placa amplificada. Las células se coinfectaron con L116 a moi = 1 (controles: 2368, 2408 y sobrenadante de Hela no infectado). EEV se produjo durante 2 días, se recolectó y se inactivó con psoraleno y se irradió con luz UV de onda larga (PLWUV). El virus se unió a placas recubiertas con CD100 (2 µg/ml) y C35 (2 µg/ml) O/N con 50 µl de EEV + 50 µl de buffer de bloqueo ELISA por pocillo.

La unión del anticuerpo se detectó al añadir anti-Fab-HRP. Dos clones (3.3.C20 y 3.3C27) tuvieron una buena unión a CD100 y fueron secuenciados. Estos clones se caracterizaron además por especificidad y afinidad mediante citometría de flujo. Los clones se amplificaron en BSC1 en T75 y se titularon. Las células infectadas con 3.3A/B (con L116) se clasificaron CD100. El virus de las células clasificadas (150 células) se amplificó, se tituló y se analizó mediante flujo (100 µg/ml de CD100-His): 30 minutos en hielo, se lavó con 5 ml, anti-HIS-APC + anti-Fab-FITC: 30 minutos en hielo). Ambos clones 20 y 27 se unieron a CD100 según lo determinado por citometría de flujo.

Las secuencias para dos clones VH CD100 de alta afinidad (3.3.C20 y 3.3C27) cuando se emparejaron con L116 fueron idénticas. La alineación de la secuencia de los dos clones se muestra en la **Figura 7**. La secuencia de aminoácidos para la cadena pesada variable es la siguiente (VH CDR1-3 están subrayadas):

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFTDYYLSWIRQAPGKGPEWLSYI

SSYSRYTNYADSVKGRFTISRDNTRNSIYLQMNNLRVEDTAVYYCARAGSYGY

WGQGTLVT (SEQ ID NO:19).

**Ejemplo 6****Cribado de la biblioteca de proteínas de fusión CH1-A56R para la selección de anticuerpos Her2**

Se realizó la selección de nuevos anticuerpos Her2 mediante 1.200.000 clones de la biblioteca pesada ingenua, fusión A56R (también denominada "biblioteca 3") + clones de cadena ligera (L48, L116 y L9021). La biblioteca es la misma que se usó para las selecciones de CD100 discutidas anteriormente.

Ronda 1: Selección. La biblioteca 3 (1 ml de virus ( $\sim 10^8$  pfu)) se utilizó para esta selección. Primero, se añadieron a las perlas de Proteína G 100  $\mu$ l de PBS + 100  $\mu$ l de Her2-Fc (R&D Systems) (= 10  $\mu$ g). La solución se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos (en un rotador) para permitir que Her2-Fc se uniera a las perlas de Proteína G. Las perlas se extrajeron con un imán, se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de DMEM suplementado con un 10%.

Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de Her2-Fc/Pro G (~10 $\mu$ g/ml de Her2-Fc) a 1 ml de la Biblioteca 3 y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente. Se retiraron las perlas y se recogió el virus No unido; luego se realizaron 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán y se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5% y la solución se transfirió un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido". Las perlas recuperadas de la biblioteca unida se amplificaron en BSC1 en T75 (la selección de la Ronda 1 se denominó "Her2.3.1").

Ronda 2: Selección. Her2.3.1 amplificado se tituló y amplificó en formato de placa de 6 pocillos (coinfectado con L48, L116 y L9021) y se realizó un ciclo adicional de selección Her2-Fc/ProG con los métodos descritos anteriormente. La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (la selección de la Ronda 2 se denominó "Her2.3.2").

Ronda 3: Selección. Her2.3.2 amplificado se tituló y reamplificó en formato de placa de 6 pocillos (coinfectado con L48, L116 y L9021) y se realizó un ciclo adicional de selección Her2-Fc/ProG con los métodos descritos anteriormente. La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (la selección de la Ronda 3 se denominó "Her2.3.3"). Los resultados de la selección Her2.3.2 y Her2.3.3 se sometieron a pruebas de citometría de flujo. En este experimento, se incubaron 3  $\mu$ g/ml de C35-His o 10  $\mu$ g/ml de Her2-His con MAB anti-His-APC durante 30 minutos en hielo para formar complejos. Se añadió anti-Fab-FITC y los complejos Antigen-anti-His se añadieron a las células durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron luego con 2 ml de PBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 nM. Luego se agregaron anti-his-APC y anti-Fab-FITC durante 30 minutos en hielo, las células se lavaron, se fijaron y se realizó el ensayo de citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 8**, las tres cadenas ligeras se enriquecieron para anticuerpos específicos contra Her2.

Ronda 4: Selección. Las células Hela en formato de placa de 6 pocillos se coinfectaron con Her2.3.3 y L116 solamente, se aisló EEV como se describió anteriormente y se realizó un ciclo adicional de selección de Her2-Fc/ProG mediante los métodos descritos anteriormente. La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (la selección de la Ronda 4 se denominó "Her2.3.4"). En la **Figura 9** se ilustra un diagrama que resume la estrategia de selección del anticuerpo Her2.

Los resultados de la selección de Her2.3.3 y Her2.3.4 se sometieron a pruebas de citometría de flujo mediante el método de tinción descrito anteriormente. Se utilizó el control H8000-A56R + L8000 (8000 = 4D5 químérico; el pariente murino de trastuzumab).

Los resultados de la citometría de flujo mostraron 2 poblaciones en las muestras 3.3 y 3.4. La muestra de Her2.3.4 se coinfectó en células Hela y la muestra se tiñó para determinar la unión de Her2 y se seleccionaron las células positivas. Los clones se seleccionaron y cribaron de la muestra clasificada, 30 placas se recogieron de Her2.3.4 y se amplificaron durante 2 días en BSC1 en una placa de 24 pocillos (1 placa por pocillo). Las células Hela se infectaron en placas de 24 pocillos con 1/3 de cada placa amplificada. Las células se coinfectaron con L116 a moi = 1 (controles: 8000, 2368, 2408 y sobrenadante de Hela no infectado). EEV se produjo durante 3 días, se recogió y se inactivó con PLWUV. El virus se unió a placas recubiertas con CD100 (2  $\mu$ g/ml) y Her2 (2  $\mu$ g/ml) O/N con 50  $\mu$ l de EEV + 50  $\mu$ l de buffer de bloqueo ELISA por pocillo. Los resultados se muestran en la **Figura 10**.

La unión del anticuerpo se detectó al añadir anti-Fab-HRP. Se identificaron cinco clones positivos con buena unión a Her2 y se secuenciaron. Los 5 clones tenían la misma secuencia (ver **Figura 11**). La secuencia VH del clon B10 se muestra a continuación.

50 Secuencia del clon Her2 B10:

```
EVQLLESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFNFNYALSWVRQAPGRGLKWVS
AISPDGDYIYYADSVKGRFIFSRDNSRNMLSLQMTSLGAEDTALYYCARQNNVR
DGAVAGPLDHWGQGTIVT (SEQ ID NO:20).
```

**Ejemplo 7****Cribado de la biblioteca de proteínas de fusión CH1-A56R para la selección de anticuerpos C35**

Se realizó la selección de nuevos anticuerpos C35 mediante ~ 1.200.000 clones de la biblioteca pesada ingenua, fusión A56R (también denominada "biblioteca 3") + clones de cadena ligera (L48, L116 y L9021). La biblioteca es la misma que se usó para las selecciones de CD100 y Her2 discutidas anteriormente.

Ronda 1: Selección. Se conjugaron 100 µg de C35 con perlas magnéticas tosilactivadas en un buffer de recubrimiento (CB) ELISA o PBS. La solución se incubó a 37°C durante la noche y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con PBS, FBS al 10%, BSA al 0,5%. Las perlas se lavaron una vez, se resuspendieron en 160 µl de DMEM suplementado con un 10%. Se agregaron 50 µl de cada muestra de perlas a cada muestra de virus y se incubaron a temperatura ambiente durante 3,5 horas. No unido se recogió después de realizar 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán, se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5%, y las perlas se transfirieron a un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido".

La biblioteca unida se amplificó en Hela en T75 (la selección de la Ronda 1 se denominó "C35 3.1"). Los resultados de la ronda C35 3.1 se sometieron a pruebas de citometría de flujo. Se unió C35 3.1, pero fue baja (no se muestran los datos).

Ronda 2: Selección. El C35 3.1 amplificado se tituló y se usó para producir EEV recombinante en formato de placa de 6 pocillos por coinfección de C35 3.1 con L48, L116 y L9021 (titulación ~  $5 \times 10^5$ /ml) y se realizó un ciclo adicional de selección de C35 tosilactivado mediante los métodos descritos anteriormente. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas en lugar de 3,5, como en la Ronda 1. Las titulaciones de los virus unidos y no unidos se muestran en la **Tabla 7**. La biblioteca unida se amplificó en Hela en T75 (la selección de la Ronda 2 se denominó "C35 3.2") y la unión se analizó mediante citometría de flujo como se describió anteriormente.

Tabla 7: Ronda 2: Selección de C35-His/Tosilactivado para C35 Ab

Virus	Muestra	Titulación	% Unión
2368	No unido	684.000	
2368	Unido	1600	0,2%
2408	No unido	600.000	
2408	Unido	168.000	28%
Biblioteca C35 3.2	No unido	972.000	
Biblioteca C35 3.2	Unido	10.400	1%

Ronda 3: Selección. El C35 3.2 amplificado se tituló y se usó para producir EEV recombinante en formato de placa de 6 pocillos por coinfección con L48, L116 y L9021 (titulación ~  $5 \times 10^5$ /ml) y se realizó un ciclo adicional de selección de C35 tosilactivado mediante los métodos descritos anteriormente para la Ronda 2. Las titulaciones de los virus unidos y no unidos se muestran en la **Tabla 8**. La biblioteca unida se amplificó en Hela en T75 y se sometió a citometría de flujo la unión de C35, como se describió anteriormente (la selección de la Ronda 3 se denominó "C35 3.3").

Tabla 8: Ronda 3: Selección de C35-His/Tosilactivado para C35 Ab

Virus	Muestra	Titulación	% Unión
2368	No unido	400.000	
2368	Unido	480	0,1%
2408	No unido	228.000	
2408	Unido	108.000	47%
Biblioteca C35 3.3	No unido	540.000	
Biblioteca C35 3.3	Unido	2600	0,5%

Los clones se cribarán desde C35 3.3, así como una posible selección de cuarta ronda. Los clones positivos se caracterizarán por citometría de flujo y se evaluarán para determinar su especificidad, afinidad y función.

#### Ejemplo 8

##### 5 Amplificación selectiva del virus vaccinia que expresa cadenas pesadas o ligeras

La infección combinatoria con virus vaccinia recombinantes separados que albergan inmunoglobulina de cadena pesada o ligera es una forma eficaz de expresar anticuerpos para la selección. Sin embargo, después de la selección, durante la amplificación y la recolección, actualmente no hay ningún mecanismo para separar los virus que contienen cadenas pesadas y ligeras. Por lo tanto, sería ventajoso poder amplificar los virus vaccinia pesados y livianos por separado, como en el caso en que tanto las infecciones de cadena pesada como ligera se llevan a cabo en complejidades mayores que uno y donde se requiere la postselección de deconvolución. Por esta razón, se han producido virus vaccinia recombinantes que expresan cadenas pesadas o ligeras acopladas a un marcador seleccionable de fármacos (cadena pesada con resistencia a la neomicina y cadena ligera con resistencia a la higromicina). El siguiente experimento demuestra la utilidad en la amplificación selectiva de virus vaccinia recombinantes que contienen cadenas pesadas o ligeras de forma independiente.

Las células BSC1 se sembraron en 15 pocillos de placas de 6 pocillos a  $1,25 \times 10^6$  células por pocillo y a 2,5 ml por pocillo. Al día siguiente, se creó una serie de diluciones de higromicina o G418 para la selección de conformidad con la **Tabla 9**. DMEM-2.5 representa DMEM que contiene FBS al 2,5%.

Tabla 9A: Preparación de diluciones de higromicina

Diluciones de higromicina						
[stock] = 50 mg/ml						
	1	2	3	4	5	6
	0,2 mg/ml.	0,1 mg/ml.	0,08 mg/ml.	0,04 mg/ml.	0,02 mg/ml.	0,01 mg/ml.
Vol. Cult. (ml) necesario:	6	6	12	0,5 X en serie	0,5 X en serie	0,5 X en serie
Agregar higro (μl):	24	12	19,2	6ml de 3 en 6ml DMEM-2,5	6ml de 4 en 6ml DMEM-2,5	6ml de 5 en 6ml DMEM-2,5
A DMEM-2,5 (ml):	5,976	5,988	5,9808			

20 Tabla 9B: Preparación de diluciones G418

Diluciones G418						
[stock] = 100 mg/ml						
	1	2	3	4	5	6
	2,0 mg/ml.	1,0 mg/ml.	0,5 mg/ml.	0,25 mg/ml.	0,125 mg/ml.	0 mg/ml.
Vol. Cult. (ml) necesario:	5	5	5	5	5	5
Agregar G418 (μl):	200	5ml de 1 en 5ml DMEM-2,5	5ml de 2 en 5ml DMEM-2,5	5ml de 3 en 5ml DMEM-2,5	5ml de 4 en 5ml DMEM-2,5	5ml de DMEM-2,5
A DMEM-2,5 (ml):	10					

25 En el tercer día, las células BSC1 se infectaron con MOI = 3 de virus vaccinia de tipo salvaje o virus vaccinia que contenía los marcadores seleccionables respectivos (VHE H5 LX-IRES-HIGRO o VHE H5 HX-A56R NEO). Luego se aplicaron diluciones de higromicina y G418 a los pocillos de las placas al mismo tiempo. Se añadió DMEM-2.5 que no contenía antibióticos a los pocillos de control. La infección se llevó a cabo en un volumen de 0,65 ml por pocillo y

las células se incubaron a 37°C. Después de 2 horas, los volúmenes de medios se llevaron a 2,65 ml por pocillo y se suplementó con higromicina o G418 adicional para mantener las concentraciones deseadas en los pocillos que contienen el fármaco. Mientras tanto, nuevas células BSC1 se sembraron en placas de 12 pocillos a  $2 \times 10^5$  células por pocillo para la determinación de titulación posterior a la infección.

- 5      24 horas después de la infección, todas las muestras se recogieron en tubos de centrífuga cónicos de 15 ml, se congelaron y descongelaron tres veces, se agitaron y se resuspendieron mediante agitación suave en 1,8 ml de DMEM-2.5. Las muestras se sonicaron durante 2 minutos a la intensidad máxima y luego se transfirieron a un tubo Sarstedt de 2,0 ml. Se preparó una serie de diluciones para cada muestra en tubos de polipropileno de 7,5 ml. Primero, se retiraron 30 µl del original de cada muestra y se combinaron con DMEM-2.5 sin antibióticos hasta un volumen final de 3.000 µl (dilución 1:10<sup>2</sup>). Posteriormente se agregaron 30 µl de la dilución 1:10<sup>2</sup> a un segundo volumen final de 3.000 µl para preparar una dilución 1:104. Luego se realizó una serie de diluciones 1:10 para preparar las diluciones 1:10<sup>5</sup> a 1:10<sup>9</sup>. Todas las diluciones se agitaron en un gabinete de bioseguridad con tubos de 5 ml.
- 10     Las células BSC1 en las placas de titulación se infectaron posteriormente con seis diluciones (1:10<sup>4</sup> a 1:10<sup>9</sup>) de cada muestra y se dispensaron 0,333 ml de cada dilución de titulación por pocillo de ensayo por duplicado. Por lo tanto, el factor para calcular la titulación es igual al número total de placas en 2 pocillos duplicados dividido por 0,66 ml. La infección se incubó durante al menos 2 horas a 37°C. Se añadieron 1,0 ml adicionales de DMEM-2.5 a cada pocillo después de las 2 horas iniciales de adsorción e infección.
- 15     48 horas después de la infección, se añadió violeta cristal a las placas de titulación de 12 pocillos. Sólo se contaron las placas mayores que 1 mm de diámetro. Las placas hijas fueron excluidas del conteo.
- 20     Los resultados se muestran en la **Tabla 10**. En experimentos de resistencia a higromicina, 0,01 a 0,08 mg/ml de higromicina inhibieron significativamente la amplificación del virus vaccinia que expresaba una cadena pesada unida a un marcador de resistencia a la neomicina, pero tuvo poco o ningún efecto de inhibición (excepto el punto de datos de 0,04 mg/ml) en la amplificación del virus vaccinia que expresa una cadena ligera unida a un marcador de resistencia a la higromicina hasta que la concentración de higromicina se incrementó a 0,1 a 0,2 mg/ml. De manera similar, en los experimentos de resistencia a la neomicina, de 0,125 a 2 mg/ml de G418 inhibió significativamente la amplificación del virus vaccinia de tipo salvaje, pero no tuvo efecto inhibitorio sobre la amplificación del virus vaccinia que expresaba una cadena pesada unida a un marcador de resistencia a la neomicina.

Tabla 10A: Resultados de experimentos de resistencia a higromicina

<b>RESISTENCIA HIGRO</b>		
<b>ID de la muestra</b>	<b>Titulación</b>	<b>% Inhibición</b>
Higro 0,2mg/ml VKE H5 LX-IRES-HIGRO	2,20E+07	53,0
Higro 0,1mg/ml VKE H5 LX-IRES-HIGRO	1,70E+07	63,6
Higro 0,08mg/ml VKE H5 LX-IRES-HIGRO	4,47E+07	4,5
Higro 0,04mg/ml VKE H5 LX-IRES-HIGRO	2,77E+07	40,9
Higro 0,02mg/ml VKE H5 LX-IRES-HIGRO	4,66E+07	0,4
Higro 0,01mg/ml VKE H5 LX-IRES-HIGRO	5,98E+07	-27,9
Higro 0,08mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2,43E+06	89,1
Higro 0,04mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2,66E+06	88,1
Higro 0,02mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2,70E+06	87,9
Higro 0,01mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	6,86E+06	69,3
[sin antibiótico] VKE H5 LX-IRES-HIGRO	3,86E+07	Control higro n.º 1
[sin antibiótico] VKE H5 LX-IRES-HIGRO	5,49E+07	Control higro n.º 2
[sin antibiótico] VHE H5 HX-A56R NEO	2,23E+07	Control neo

Tabla 10B: Resultados de experimentos de resistencia a neomicina

<b>RESISTENCIA NEO</b>		
<b>ID de la muestra</b>	<b>Titulación</b>	<b>% Inhibición</b>
G418 0,125 mg/ml WT	1,58E+07	60,8
G418 0,25 mg/ml WT	8,26E+06	79,4
G418 0,5 mg/ml WT	2,54E+06	93,7
G418 1 mg/ml WT	1,36E+06	96,6
G418 2 mg/ml WT	1,59E+05	99,6
G418 0,125 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2,88E+07	-26,7
G418 0,25 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3,11E+07	-36,7
G418 0,5 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3,41E+07	-50,0
G418 1 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3,18E+07	-40,0
G418 2 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	3,03E+07	-33,3
G418 0 mg/ml WT	4,02E+07	Control neo n.º 1
G418 0 mg/ml VHE H5 HX-A56R NEO	2,27E+07	Control neo n.º 2

Por lo tanto, los virus vaccinia recombinante que expresan marcadores de inmunoglobulina y resistencia a los medicamentos unidos a través de un Sitio de Entrada del Ribosoma Interno (IRES) brindan protección contra la muerte de las células huésped en tratamiento con ese medicamento. Esto permite la propagación específica de la cadena en el virus, así como la selección contra el virus vaccinia de tipo salvaje durante la recombinación.

5 Por lo tanto, los virus vaccinia recombinante que expresan marcadores de inmunoglobulina y resistencia a los medicamentos unidos a través de un Sitio de Entrada del Ribosoma Interno (IRES) brindan protección contra la muerte de las células huésped en tratamiento con ese medicamento. Esto permite la propagación específica de la cadena en el virus, así como la selección contra el virus vaccinia de tipo salvaje durante la recombinación.

### Ejemplo 9

#### Expresión de la proteína de fusión A56R en la superficie de las células HeLa

Las células HeLa se coinfectaron con virus vaccinia EEV recombinante que expresan construcciones de fusión de inmunoglobulina, Variable Pesado (H8000) CH1-A56R con L8000 Ig-K que juntos codifican un fragmento Fab de anticuerpo ("Fab"), Variable Pesado (H8000) FL-A56R con L8000 Ig-K que juntos codifican IgG de longitud completa ("FL"), Variable Pesado (H8000) A56R truncado con FL con L8000 Ig-K que juntos codifican IgG de longitud completa con un A56R más corto ("TR"), Variable Pesado (H2124) FL-A56R con L517 Ig-K (2408 "FL"), y Variable Pesado (H2124) FL-A56R truncado con L517 Ig-K (2408 "TR") en placas de 12 pocillos. En la **Figura 12** se muestra un diagrama que presenta las construcciones "Fab", "TR" e "IgG". Se realizó un análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la tinción con C35 y la tinción con Her2 de células infectadas con virus vaccinia recombinante. Después de aproximadamente 18 horas, las células se tiñeron con C35-His/His-APC y Her2-His/His-APC, y anti-Fab-FITC y se detectaron por análisis FLOW en Canto. Brevemente, las células se traponaron y se dividieron en dos por muestra; se lavaron con 2 ml de buffer de lavado; se agregaron 10 µg/ml de Her2-His o 4 µg/ml de C35-His a una de las dos muestras y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Luego, las células se lavaron y se añadió APC anti-His y las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo, se tiñeron con un reactivo de detección secundario anti-Fab-FITC y posteriormente se lavaron las muestras, se fijaron (paraformaldehído al 0,5% con 1:100PI durante 20 min en hielo) y se analizaron por FLOW por Canto. Los datos FACS se muestran en la **Figura 13-15**. Estos resultados muestran que las proteínas de fusión A56R, ya sea que expresen un Fab o una IgG de longitud completa, se expresaron en la superficie celular, y que solo los dominios transmembrana e intracelular de A56R son necesarios para la expresión en superficie de la IgG.

### Ejemplo 10

#### Solución basada en la selección de Vac-Ig

Selección de perlas tosilactivadas. EEV expresa el específico para C35 (H2124), "FL" y "TR" VH se coinfectaron junto con L517 en células HeLa en placas de 6 pocillos, EEV se recogió del sobrenadante por centrifugación a 1200 rpm y se recogió el sobrenadante (EEV) después de aproximadamente 48 horas de infección. Como control, el H8000-Fab + L8000 específico de Her2 se produjo de la misma manera. Para la selección de las perlas, se conjugaron 100 µg de C35 - His con perlas magnéticas tosilactivas en PBS. La solución se incubó a 37 °C durante la noche y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con PBS, FBS al 10%, BSA al 0,5%. Las perlas se lavaron una vez, se resuspendieron en 160 µl de DMEM suplementado con un 10%. Se agregaron 50 µl de cada muestra de perlas a cada muestra de virus y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. EEV no unido se recogió después de

realizar 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán, se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5%, y las perlas se transfirieron a un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido".

- Como se muestra en la **Tabla 11**, se seleccionó el virus vaccinia que expresaba construcciones específicas de C35 de las proteínas de fusión Fab y FL, mientras que la construcción con la proteína de fusión TR no se seleccionó.
- Este dato sugiere que se necesita alguna secuencia A56R extracelular para la incorporación en EEV.

Tabla 11: Resultados de la selección de perlas tosilactivas

Virus	% Unión
MAb 2408-Fab	24%
Mab 2408-FL	18%
Mab 2408-TR	2,3%
Mab 8000-Fab	0,8%

### Ejemplo 11

#### Cribado de la biblioteca de proteínas de fusión CH1-A56R para la selección de anticuerpos CD100

- La selección para nuevos anticuerpos CD100 mediante una biblioteca de cadena pesada compuesta por aproximadamente 7.000.000 de clones que contienen una combinación de VH ingenuos y secuencias sintéticas de VH se produjo en el vector A56R-Fab. Para producir vaccinias que expresan la biblioteca de Ig en la superficie de EEV, la biblioteca de fusión A56R (también denominada "biblioteca 10") se coinfectó en células Hela  $1 \times 10^9$  junto con un cóctel de 9 clones de cadena ligera (cadenas Kappa: L48, L116, L122, L7110 y L9021; y cadenas Lambda: L3-1, L151, L214, y L223). El moi total del virus de la cadena pesada fue 1, y el moi total del virus de la cadena ligera fue 1; cada cadena ligera comprende aproximadamente 1/9 del total del virus de la cadena ligera agregado.

- Se infectaron células Hela-S que crecían en suspensión durante 2 días, después de lo cual se recogió el sobrenadante, se sedimentó con giros de baja velocidad 2 veces y se sedimentó EEV a 13.000 RPM durante 1 hora en un rotor F16/F250. EEV se resuspendieron en 3 ml de DMEM suplementado con FBS al 10%, y se usó 1 ml para seleccionar los anticuerpos específicos de CD100.

- Ronda 1: Selección. Se utilizaron como controles EEV que expresa 2368-A56R (1 ml de virus con aproximadamente  $\sim 5 \times 10^5$  pfu) y EEV que expresa 2408-A56R (1 ml de virus con aproximadamente  $5 \times 10^5$  pfu) y la biblioteca 10 (1 ml de virus con aproximadamente  $\sim 10^8$  pfu) se utilizó para el ensayo de selección. Primero, se extrajeron 300  $\mu$ l de perlas de Proteína G (2 veces la cantidad estándar/muestra) con un imán y se agregaron a las perlas 600  $\mu$ l de PBS + 18  $\mu$ l de CD100-Fc (= 36  $\mu$ g). La solución se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos (en un rotador) para permitir que CD100-Fc se uniera a las perlas de Proteína G. Las perlas se extrajeron con un imán, se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de DMEM suplementado con un 10% FBS.

- A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de CD100-Fc/Pro G por muestra (aproximadamente 12  $\mu$ g/ml de CD100-Fc) al EEV (controles 2408 y 2368, y biblioteca 10) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El virus no unido se eliminó siguiendo el estándar después de realizar 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán y se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5% y la solución se transfirió a un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido". Los resultados se muestran en la **Tabla 12**. El virus unido se amplificó en células BSC1 en matraces T175 durante 3 días.

Tabla 12: Resultados de la selección de perlas tosilactivas

Virus	Selección	Titulación - No unido	Titulación - Unido	% Unión
Library_10	CD100-Fc	$1,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^6$	0,15
2368	CD100-Fc	72.000	37.000	34
2408	CD100-Fc	338.400	80	0,12

- Estos resultados muestran que la Biblioteca 10.1 proporcionó una buena amplificación en BSC1, recolección y titulación.

- Ronda 2: Selección. Se produjo EEV de 10,1 + una nueva alícuota de las 9 cadenas ligeras al infectar células Hela en un apilador de células en moi = 1 cada una durante 2 días, y se recogió como se describió anteriormente. El virus recogido se dividió por la mitad y se seleccionó el 50% en perlas de ProG y el 50% en perlas tosilactivadas recubiertas con CD100.

- Ronda 2: selección de perlas ProG. EEV que expresa 2368-A56R (1 ml de virus ( $\sim 5 \times 10^5$  pfu)), EEV que expresa 2408-A56R (1 ml de virus ( $5 \times 10^5$  pfu)) y la biblioteca 10.1 (1 ml de virus ( $\sim 5 \times 10^5$  pfu)) se usaron para la selección. Se añadieron a las perlas Pro-G 600  $\mu$ l de PBS + 18  $\mu$ l de CD100-Fc (= 36  $\mu$ g). La solución se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos (en un rotador) para permitir que CD100-Fc se uniera a las perlas de Proteína G. Las perlas se lavaron y se resuspendieron como se describió anteriormente para la Ronda 1. Se añadieron 100  $\mu$ l de CD100-Fc/Pro G por muestra ( $\sim 12 \mu$ g/ml de CD100-Fc) a las muestras de virus y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los "No unido" y "Unido" fueron recopilados y titulados. La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (la selección de la Ronda 2 se denominó "CD100 10.2/ProG"). Los resultados de la selección de la Ronda 2 se muestran en la **Tabla 13A**. El virus unido se amplificó en BSC1 en un matraz T175 durante 3 días.
- 10 Ronda 2: selección de perlas tosilactivadas. El EEV que expresa los mismos anticuerpos 2408 (específicos de C35), 2368 (específicos de CD100) y la biblioteca 10 utilizados en la selección de perlas de la Proteína G se usaron anteriormente para la selección de perlas magnéticas tosilactivadas. Se conjugaron 100  $\mu$ g de CD100 - His con perlas magnéticas tosilactivas en PBS. La solución se incubó a 37°C durante la noche y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con PBS, FBS al 10%, BSA al 0,5%. Las perlas se lavaron 1 vez con DMEM, FBS al 10% y se resuspendieron en 160  $\mu$ l de DMEM suplementado con FBS al 10%. Se agregaron 50  $\mu$ l de cada muestra de perlas a cada muestra de virus y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. El virus no unido se recogió después de realizar 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán, se añadió 1 ml de DMEM suplementado con 2,5%, y las perlas se transfirieron a un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido". El virus unido se amplificó en BSC1 en un matraz T175 durante 3 días. Los resultados de la selección de la Ronda 2 se muestran en la **Tabla 13B**.
- 15
- 20

Tabla 13A: Ronda 2 - Selección para CD100 Ab (selección de perlas de proteína G)

Virus	Selección	Titulación - No unido	Titulación - Unido	% Unión
Biblioteca_10.1 Proteína G	CD100-Fc	$4.4 \times 10^7$	67.000	0,15
2368	CD100-Fc	104.400	66.000	38,7
2408	CD100-Fc	240.000	80	0,03

Tabla 13B: Ronda 2 - Selección para CD100 Ab (selección de perlas tosilactivas)

Virus	Selección	Titulación - No unido	Titulación - Unido	% Unión
Biblioteca_10.1 Tosilactiva	CD100-His	$2.4 \times 10^7$	113.000	0,47
2368	CD100-His	56.400	106.000	34,4
2408	CD100-His	354.000	0	0

- 25 Estos resultados de la segunda ronda muestran que las bibliotecas 10.2/ProG y 10.2/Tosyl dieron buena amplificación en BSC1.

- 30 Ronda 3: Selecciones. Se realizó una tercera ronda de selección con los mismos métodos descritos anteriormente. 10.2/ProG fue seleccionado con CD100-Fc/ProG para la tercera ronda, y 10.2/Tosyl fue seleccionado con CD100-His/Tosil para la tercera ronda. Se produjo EEV de 10,2/ProG + una nueva alícuota de las 9 cadenas ligeras al infectar células Hela en un T175 en moi = 1 para el total del virus recombinante de la cadena pesada y una para el total del virus recombinante de la cadena ligera durante 2 días, y se recogió como se describió anteriormente. Se produjo EEV de 10,2/Tosil+ una nueva alícuota de las 9 cadenas ligeras al infectar células Hela en un matraz T175 en moi = 1 para el total del virus recombinante de la cadena pesada y una para el total del virus recombinante de la cadena ligera durante 2 días, y se recogió como se describió anteriormente. La titulación se muestra en la **Tabla 14A-B**.
- 35

Tabla 14A: Ronda 3 - Selección para CD100 Ab (selección de perlas de proteína G)

Virus	Selección	Titulación - No unido	Titulación - Unido	% Unión
Biblioteca_10.2 Proteína G	CD100-Fc	$2.5 \times 10^7$	364.000	1,44
2368	CD100-Fc	84.000	58.000	48,5
2408	CD100-Fc	99.600	0	0

Tabla 13B: Ronda 3 - Selección para CD100 Ab (selección de perlas tosilactivas)

Virus	Selección	Titulación - No unido	Titulación - Unido	% Unión
Biblioteca_10.2 Tosilactiva	CD100-His	8.2x10 <sup>5</sup>	6.100	0,074
2368	CD100-His	69.600	108.000	60,8
2408	CD100-His	121.000	0	0

La biblioteca unida se amplificó en BSC1 en T75 (la selección de la Ronda 3 se denominó "CD100 10.3/ProG y CD100 10.3/Tosil). Los resultados de la selección de la Ronda 3 se sometieron a pruebas de citometría de flujo.

5 En este experimento, una parte alícuota de las selecciones 10.3 se coinfectaron individualmente con cada cadena ligera y luego se analizaron para determinar su unión a CD100 y Her2. Las células de Hela se infectaron en moi = 1. Después de una infección durante la noche, las células se recogieron y se tiñeron para la unión a CD100 y la unión a Her2 como control. Las células se tripsinizaron, se lavaron con buffer de flujo helado (FB 1XPBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 mM) y se detectaron con cada uno de los tres métodos de detección diferentes. En el cebador método de detección (2 pasos), las células se incubaron durante 30 minutos con 10 µg/ml de huCD100-His en FB en hielo, luego se lavaron con 2 ml de FB y se incubaron con 1:50 (2 µg/ml) de murino anti 6XHis-APC mezclado con 1:500 (2ug/mL) de FITC etiquetado con cabra Fab anti-humana en hielo durante 30 minutos. En el segundo y tercer método de detección (precomplejado), se preincubaron 10ug/mL de hu CD100-His o 10ug/mL de huHer2-His con 1:50 (2ug/mL) de murino anti 6XHis-APC en FB en hielo durante 30 min, luego la mezcla se añadió a las células con 1:500 (2ug/mL) de GtFab anti huFab-FITC y se incubó durante 30 min en hielo. Después de la incubación con reactivos de detección, las células se lavaron 1 vez con 2 ml de FB, se reconstituyeron en paraformaldehído al 0,5% y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Se leyeron 20.000 eventos en FACS Canto. Los resultados se muestran en las **Figuras 16-22**.

20 La tinción con citometría de flujo mostró que había una población positiva de células de unión a CD100 en CD100 10.3/ProG y Tosil cuando se emparejaron con la mayoría de las cadenas ligeras. En particular, se observó una población extremadamente positiva cuando se coinfectó con L3-1.

Para aislar el VH específico, las células Hela se infectaron por separado con 10.3/ProG o 10.3/tosil, y se coinfectaron con L3-1. Después de una infección durante la noche, las células se recogieron y se tiñeron para la unión a CD 100 con un método precomplejado como se describió anteriormente. Luego, las células de unión a antígeno se aislaron por clasificación celular. Después de la clasificación, el virus se liberó de las células mediante congelación/descongelación, y luego el virus se amplificó en las células BSC1. La muestra amplificada de las cadenas EEV-VH aisladas se sometió a pruebas para el enriquecimiento mediante un ensayo de flujo analítico. En este ensayo, se coinfectó una parte alícuota de la muestra CD100 10.3 clasificada amplificada con la cadena ligera L3-1 y luego se sometió a pruebas la unión a CD100 y Her2 con el método de 2 pasos precomplejado descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las **Figuras 23-25**.

30 Después de la amplificación, se recolectó el virus y se extrajo el ADN de una parte alícuota del virus con un mini kit de ADN en sangre Qiagen (cat # 51104). El ADN purificado se amplificó por PCR con cebadores específicos de cadena pesada 428; 5'-GATATATTAAAGTCGAATAAGTG-3' (SEQ ID NO. 31) y 430; 5'-GACATCACATAGTTAGTTGC-3' (SEQ ID NO. 32). El resultado del producto PCR se clonó en un vector plasmídico que contenía IgG1 humana de longitud completa secretada (EFVH) y luego se secuenció el gen V contenido en las colonias resultantes. En la **Tabla 15** se muestra un resumen de los resultados de secuenciación. Después de la secuenciación de 188 clones de 10.3/ProG, se identificaron 44 clones únicos, y después de la secuenciación de 188 clones de 10.3/tosil, se identificaron 46 clones únicos.

Tabla 15: Resumen de clones únicos

Cribado	Clones secuenciados	secuencias únicas	unidos por ELISA
10.3/ProG	188	44	56,8%
10.3/tosil	188	46	60,9%

40 El ADN plasmídico para cada cadena pesada única se cotransfектó junto con un vector plasmídico que codifica VL3-1 en células CHO mediante Lipofectamina 2000 durante 3 días, y luego el anticuerpo contenido en el medio se analizó para determinar la especificidad de CD100 por citometría de flujo en CD100 + células Jurkat y por ELISA (**Figuras 26 y 27A-B**, respectivamente). Para el ensayo de citometría de flujo, el anticuerpo experimental se preincubó en 1 ug/ml con 1:400 o [2,5 g/ml] Gt anti Hu Fc-Dylight 649 secundario en buffer de flujo (1XPBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 mM). Las células Jurkat se sembraron a razón de 250.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron con un complejo de Ab preformado durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron luego 2 veces con 200 µl de buffer de flujo y se incubaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 0,5% con 1 vez de

yoduro de propidio (PI). Se leyeron 10.000 eventos en FACS Canto sincronizados en la población de células vivas. En total, se demostró que al menos 75 anticuerpos únicos eran específicos para CD100 mediante ELISA o citometría de flujo.

### Ejemplo 12

#### 5 Cribado de la biblioteca de proteínas de fusión CH1-A56R para la selección de anticuerpos Her2

Una biblioteca de cadena pesada compuesta por aproximadamente 3.000.000 de clones que contienen una combinación de VH ingenuos y secuencias sintéticas de VH se produjo en el vector A56R-Fab como una fusión con IRES-Neomicina. Para producir vaccinias que expresan la biblioteca de Ig en la superficie de EEV, la biblioteca de fusión A56R (también denominada "biblioteca 9") se coinfectó con una biblioteca de clones de cadena ligera Kappa 1.000 que contiene un gen resistente a higromicina en células Hela  $5 \times 10^9$ . La biblioteca de cadena ligera comprendía secuencia VK aisladas de médula ósea humana (sin tratar). El moi total de virus de cadena pesada fue 1, y el moi total de virus de cadena ligera fue 1.

Se infectaron células Hela-S que crecían en suspensión durante 2 días, después de lo cual se recogió el sobrenadante, se sedimentó con giros de baja velocidad 2 veces y se sedimentó EEV a 13.000 RPM durante 1 hora en un rotor F16/F250. EEV se resuspendió en 3 ml de DMEM suplementado con FBS al 10%, y se usó 1 ml para seleccionar los anticuerpos específicos de Her2/neu.

Ronda 1: Selección. La biblioteca 9 se usó para esta selección. Primero, se añadieron a 600 µl de Protein G 100 µl de PBS + 24 µg de Her2-Fc. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos (en un rotador) para permitir que Her2-Fc se uniera a las perlas de Proteína G. Las perlas se extrajeron con un imán, se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 400 µl de DMEM suplementado con un 10% FBS.

Posteriormente, se añadieron 100 µl de Her2-Fc/Pro G (~6µg/ml de Her2-Fc) a 1 ml de la Biblioteca 9 y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió una cantidad similar de perlas al control positivo MAb 8000 EEV y al control negativo MAb 2408 EEV. Se retiraron las perlas y se recogió el virus No unido en 5 lavados estándar con 1 ml de PBS. Las perlas se retiraron del imán y se añadió 1 ml de DMEM suplementado con FBS al 2,5% y la solución se transfirió un nuevo tubo ("Unido"). Se tituló "No unido" y "Unido" (ver **Tabla 16**). Las perlas recuperadas de la biblioteca unida se amplificaron en BSC1 en tres matraces T175 en la presencia de 1mg/ml G418. Esta amplificación se seleccionó para virus de cadena pesada recombinante. (La selección de la ronda 1 se denominó "Her.9.1").

Tabla 16: Ronda 1: Selección para Her2 Ab

Virus	Selección	Titulación - No unido	Titulación - Unido	% Unión
Biblioteca 9	Her2-Fc	$1,4 \times 10^9$	$4,6 \times 10^6$	0,32
2408	Her2-Fc	$1,2 \times 10^5$	180	0,14
8000	Her2-Fc	$3 \times 10^5$	$7,2 \times 10^4$	19,3

30 Ronda 2: Selección. Se tituló Her.9.1 amplificado y se realizó una segunda ronda de selección coinfectando el VH Her.9.1 y una alícuota nueva de la biblioteca VK1000 en células Hela en 2 apiladores de células durante 2 días. El virus se recolectó como se describió anteriormente y se realizó un ciclo adicional de selección de Her2-Fc/ProG mediante los métodos descritos anteriormente. El 50% del virus unido se amplificó en BSC1 en dos matraces T175 con 1 mg/ml de G418 (para seleccionar las cadenas pesadas) y el 50% del virus unido se amplificó en BSC1 en dos matraces T175 con 0,030 mg/ml de Higro (para seleccionar para cadenas ligeras). Los resultados de titulación se muestran en la **Tabla 17**. Los virus amplificados se denominaron Her.9.2/VH y Her 9.2/VK.

Tabla 17: Ronda 2: Selección para Her2 Ab

Virus	Selección	Titulación - No unido	Titulación - Unido	% Unión
Her2.9.Rd1 +VK	Her2-Fc	$1,76 \times 10^8$	$1,9 \times 10^5$	0,1
2408	Her2-Fc	$1,4 \times 10^5$	80	0,1
8000	Her2-Fc	$3,3 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	16

40 Ronda 3: Selección. Her.9.2/VH y Her 9.2/VK amplificados se titularon, se coinfectaron en células Hela en un apilador de células durante 2 días, EEV se purificó como se describió anteriormente y se realizó un ciclo adicional de selección de Her2-Fc/ProG mediante los métodos descritos anteriormente.

El 50% del virus unido se amplificó en BSC1 en un matraz T175 con 1 mg/ml de G418 (para seleccionar las cadenas pesadas) y el 50% del virus unido se amplificó en BSC1 en un matraz T175 con 0,030 mg/ml de Higro (para seleccionar las cadenas ligeras). Los virus amplificados se denominaron Her.9.3/VH y Her 9.3/VK.

5 La selección de anticuerpos específicos contra Her2 en Her.9.3/VH y Her 9.3/VK se sometió a pruebas de citometría de flujo. Las células Hela se coinfectaron a moi = 1 con Her9.3/VH y Her9.3/VK durante la noche, y luego se tiñeron para unirse a Her2, con la ausencia de unión a un antígeno de control (C35). En este experimento, se incubaron 3 µg/ml de C35-His o 6µg/ml de Her2-His con anticuerpo anti-His-APC durante 30 minutos en hielo para formar complejos. Se añadió anti-Fab-FITC y los complejos Antigen-anti-His se añadieron a las células durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron luego con 2 ml de PBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 nM. Las células se fijaron y se realizó un ensayo de citometría de flujo. Los datos mostraron enriquecimiento tanto de VH como de VK.

10 Para enriquecer aún más, se infectaron células Hela nuevas con 9.3VH y VK a moi = 1 cada una, las células se tiñeron como se describió anteriormente y luego se clasificaron las células de unión al antígeno. El virus se liberó de las células clasificadas mediante tres ciclos de congelación/descongelación y luego el 50% del virus se amplificó en BSC1 en un matraz T75 con 1 mg/ml de G418 (para seleccionar las cadenas pesadas) y el 50% del virus se amplificó en BSC1 en un matraz T75 con 0,030 mg/ml de Higro (para seleccionar las cadenas ligeras). Los virus amplificados se titularon y denominaron Her.9.3/VH/Clasificado y Her 9.3/VK/Clasificado.

15 La selección de anticuerpos específicos contra Her2 en Her.9.3/VH/Clasificado y Her 9.3/VK/Clasificado se sometió a pruebas de citometría de flujo. Las células Hela se coinfectaron a moi = 1 con Her9.3/VH/Clasificado y Her9.3/VK/Clasificado durante la noche, y luego se tiñeron para unirse a Her2, con la ausencia de unión a un antígeno de control (C35). En este experimento, se incubaron 3 µg/ml de C35-His o 6µg/ml de Her2-His con anticuerpo anti-His-APC durante 30 minutos en hielo para formar complejos. Se añadió anti-Fab-FITC y los complejos Antigen-anti-His se añadieron a las células durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron luego con 2 ml de PBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 nM. Las células se fijaron y se realizó un ensayo de citometría de flujo. Los datos mostraron enriquecimiento tanto de VH como de VK.

20 25 Con el fin de fijar el emparejamiento específico antígeno de VH y VK, Her.9.3/VH/Clasificado y Her 9.3/VK/Clasificado se coinfectaron en células Hela a moi = 0,1 cada una, y luego se tiñeron como se describió anteriormente para la unión Her2. Las células se clasificaron nuevamente, pero esta vez las células infectadas individuales se clasificaron en pocillos individuales en una placa de 96 pocillos. Cada célula clasificada de unión a antígeno debe contener un par específico de antígeno fijo de VH específico con VK específico. Después de la 30 clasificación, las células se sometieron a congelación/descongelación, y luego el virus se amplificó en BSC1 en una placa de 96 pocillos, y el virus de una célula se amplificó en un pocillo receptor. Después de 5 días, las placas se sometieron a congelación/descongelación, y luego se infectó una alícuota de virus en cada pocillo en células Hela en una placa de 96 pocillos. El virus en cada pocillo debe contener una mezcla de VH y VK, y la infección de las células Hela debe dar como resultado la expresión de IgG de superficie y la unión del antígeno. Después de una infección 35 durante la noche, las células se recogieron y se tiñeron para la unión a Her2 como se describió anteriormente (**Figura 28**).

40 45 Después del cribado de la placa 1 se identificaron 26 clones específicos. Las pruebas repetidas de estos clones demostraron que se unen a Her2, pero no a C35 mediante citometría de flujo. En la **Figura 29A-C** se muestran tres clones representativos (D5, D8 y H2). Luego se extrajo ADN de los virus, y los genes VH y VK contenidos en estos virus se amplificaron por PCR con cebadores específicos de VH y VK y se clonaron en vectores de expresión de mamíferos para que se expresaran como IgG1 de longitud completa y Kappa de longitud completa. Se determinaron las secuencias de los genes VH y VK. Por secuenciación, estos 26 clones contenían 15 anticuerpos únicos. Estos anticuerpos se expresaron luego en células CHO mediante cotransfección de los plásmidos de expresión IgG y Kappa, y el anticuerpo se recogió del sobrenadante celular después de 3 días. El anticuerpo se cuantificó mediante ELISA y luego se analizó la especificidad mediante ELISA y la citometría de flujo en células SKBR3 (Her2 +++). Los datos representativos de anticuerpos que tienen especificidad por ELISA y citometría de flujo se muestran en las **Figuras 30 y 31**, respectivamente.

50 La repetición de la clasificación de células individuales y la selección de clones adicionales de conformidad con los métodos de la presente dio como resultado la identificación de nuevos anticuerpos anti-Her2 adicionales.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas que pretenden ser ilustraciones individuales de aspectos particulares de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos.

## Listado de secuencias

&lt;110&gt; VACCINEX, INC.

&lt;120&gt; PROTEÍNAS DE FUSIÓN PARA FACILITAR LA SELECCIÓN DE CÉLULAS INFECTADAS CON VIRUS VACCINIA RECOMBINANTE DE GEN DE INMUNOGLOBULINA ESPECÍFICA

5 &lt;130&gt; 1843.071PC02/EJH/BNC

&lt;140&gt; Para ser asignado

&lt;141&gt; Con la presente

&lt;150&gt; Estados Unidos 13/844.388

10 &lt;151&gt; 2013-03-15

&lt;150&gt; Estados Unidos 61/732.776

&lt;151&gt; 03/12/2012

&lt;150&gt; Estados Unidos 61/639.046

&lt;151&gt; 26/04/2012

15 &lt;160&gt; 32

&lt;170&gt; PatentIn versión 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1416

&lt;212&gt; ADN

20 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; plásmido transferencia pJEM1

<400>	1
aaaaaatgaa aataaaataca aaggttcttg agggttgtgt taaattgaaa gcgagaaaata	60
atcataaatt ccatggatg gagctgtatc atccctttct tggtagcaac agctacaggc	120
gcgcactccg agatccagct ggtcaagagc ggcctgagc tgaaggagcc tggcgagacc	180
gtgaggatca gctgcaaggc cagcggctac accttcacca actacggcat gaactgggtg	240
aagcaggccc ctggcaaggg cctgaagtgg atggctgga tcaacaccta caccggcgag	300
cctacctacg ccggcgactt caagaggagg ttcaccttca gcctggagac cagcgccagc	360
accgcctacc tgcagatcag caacctgaag aacgacgaca cgcgcaccta cttctgcgcc	420
aagtaccctc actactacgg cagcagccac tggtaactcg acgtgtgggg cgccggcacc	480
acggtcaccg ttccttcagc ctccaccaag ggcctatcg tttccccct ggcacccctcc	540
tccaagagca cctctgggg cacagcgcc ctggctgcc tggtaagga ctacttcccc	600
gaaccgggtga cggtgtcgta gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca cacttcccc	660
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tcgtgaccgt gccctccagc	720
agcttggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg	780
gacaagaaaag ttacatcaac tacaaatgac actgataaag tagattatga agaataactcc	840
acagagttga ttgtaaatac agatagtcaa tcgactatag acataatact atctggatct	900

# ES 2 725 673 T3

	acacattcac cgaaaaactag ttctaagaaa cctgattata tagataattc taattgctcg	960
	tccgtattcg aaatcgac tccggAACCA attactgata atgtagaaga tcatacagac	1020
	accgtcacat acactagtga tagcattaat acagtaagtg catcatctgg agaatccaca	1080
	acagacgaga ctccggAACCC aattactgat aaagaagatc atacagttac agacactgtc	1140
	tcatacacta cagtaagtac atcatctgga attgtcacta ctaaatcaac caccgatgat	1200
	gcggatctt atgatacgt acaatgataat gatacagtac caccaactac tgttaggcgt	1260
	agtacaacct ctattagcaa ttataaaacc aaggactttg tagaaatatt tggattacc	1320
	gcattaatta tattgtcggc cgtggcaatt ttctgttata catattatat atataataaa	1380
	cgttcacgt aatacAAAAC agagaacaaa gtctag	1416
	<210> 2	
5	<211> 446	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> plásmido transferencia pVKE	
	<400> 2	
	ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccggccatgg gatggagctg	60
	tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggctgcac ttgactcgag atcaaacgaa	120
	ctgtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cggccatctga tgagcagttg aaatctggaa	180
	ctgcctctgt tgggtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggaa	240
	agggtggataa cggccctccaa tcgggttaact cccaggagag tggcacagag caggacagca	300
	aggacagcac ctacagcctc agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac	360
	acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcggcgtc acaaagagct	420
10	tcaacagggg agagtgttag gtcgac	446
	<210> 3	
	<211> 455	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> plásmido transferencia pVLE	
	<400> 3	
	ggccaaaaat tgaaaaacta gatctattta ttgcacgcgg ccggccatgg gatggagctg	60
	tatcatcctc ttcttggtag caacagctac aggctgcac ttgactcgag aagcttaccg	120
	tcctacgaac tgggtgcctg ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga	180
	aatctggaaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gagggccaaag	240

# ES 2 725 673 T3

	tacagtggaa ggtggataac gccctccaaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc	300
	aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact	360
	acgagaaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca	420
	caaagagctt caacagggga gagtgttagg tcgac	455
	<210> 4	
5	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 5' huCy1-5B:	
10	<400> 4	
	attaggatcc ggtcaccgtc tcctcagcc	29
	<210> 5	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador 3' huCy1-3S	
	<400> 5	
	attagtgcac tcatttaccc gagacagggg gag	33
20	<210> 6	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> CH1(F):	
25	<400> 6	
	caagggaccc tggtcaccgt ctccctcagcc tcc	33
	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> CH1(R):	
	<400> 7	
	aactttcttg tccacacctgg tgttg	25
35	<210> 8	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> A56R(F):	

	<400> 8 caacaccaag gtggacaaga aagtacatc aactacaat gacactgata g	51
5	<210> 9 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> A56R(R):	
10	<400> 9 tatagtcgac ctagacttg ttctctgtt tgtatttacg	40
	<210> 10 <211> 1266 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> VH (H2124)-CH1-A56R Proteína de Fusión de Producto Fab	
	<400> 10 caggtgcagc tgcagcagtg gggcgccagga ctgctgaagc ctagcgagac cctgtccctc acctgcgctg tctatggcta ctccatcacc agcggctatt tctggaactg gatccgcccag cccccaggga aggggctgga gtggattggg tacatcagct acgacggcag cagcaactcc aacccatctc tcaaaaatag ggtcacaatc agcagagaca cctccaagaa ccagttctcc ctgaagctga gctctgtgac cgccgcccac accgctgtgt attactgtgc cagaggaact accgggtttg cttactgggg ccaagggacc ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcggt tcttccccctt ggcacccctcc tccaagagca cctctgggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tcgtgaccgt gccctccagc agcttggca cccagaccta catctgcaac gtaaatcaca agcccgacaa caccaagggt gacaagaaag ttacatcaac tacaatgac actgataaaag tagattatga agaataactcc acagagttga ttgtaaatac agatagtcaa tcgactatag acataataact atctggatct acacattcac cggaaacttag ttctaaagaaa cctgattata tagataattc taattgctcg tcggatttcg aaatcgccac tccggacca attactgata atgtagaaga tcatacagac accgtcacat acactagtga tagcattaat acagtaagtgc catcatctgg agaattccaca acagacgaga ctccggaccc aattactgt aaagaagatc atacagttac agacactgtc tcatacacta cagtaagtac atcatctgg attgtcacta ctaaatcaac caccgatgtat gcggatctt atgatacgtt caatgataat gatacagtac caccaactac tgtaggcgtt agtacaacct ctattagcaa ttataaaacc aaggactttt tagaaatatt tggattacc gcattaatta tattgtcggc cgtggcaatt ttctgttata catattatat atataataaa cgttcacgtt aataaaaaac agagaacaaa 20 gtctag	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1266

ES 2 725 673 T3

<210> 11  
<211> 421  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> VH (H2124)-CH1-A56R Proteína de Fusión de Producto Fab

<400> 11  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

Tyr Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Ser Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

ES 2 725 673 T3

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Thr Ser Thr Thr Asn Asp Thr Asp Lys Val  
210 215 220

Asp Tyr Glu Glu Tyr Ser Thr Glu Leu Ile Val Asn Thr Asp Ser Glu  
225 230 235 240

Ser Thr Ile Asp Ile Ile Leu Ser Gly Ser Thr His Ser Pro Glu Thr  
245 250 255

Ser Ser Lys Lys Pro Asp Tyr Ile Asp Asn Ser Asn Cys Ser Ser Val  
260 265 270

Phe Glu Ile Ala Thr Pro Glu Pro Ile Thr Asp Asn Val Glu Asp His  
275 280 285

Thr Asp Thr Val Thr Tyr Thr Ser Asp Ser Ile Asn Thr Val Ser Ala  
290 295 300

Ser Ser Gly Glu Ser Thr Thr Asp Glu Thr Pro Glu Pro Ile Thr Asp  
305 310 315 320

Lys Glu Asp His Thr Val Thr Asp Thr Val Ser Tyr Thr Thr Val Ser  
325 330 335

Thr Ser Ser Gly Ile Val Thr Thr Lys Ser Thr Thr Asp Asp Ala Asp  
340 345 350

Leu Tyr Asp Thr Tyr Asn Asp Asn Asp Thr Val Pro Pro Thr Thr Val  
355 360 365

Gly Gly Ser Thr Thr Ser Ile Ser Asn Tyr Lys Thr Lys Asp Phe Val  
370 375 380

Glu Ile Phe Gly Ile Thr Ala Leu Ile Ile Leu Ser Ala Val Ala Ile  
385 390 395 400

Phe Cys Ile Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asn Lys Arg Ser Arg Lys Tyr Lys  
405 410 415

Thr Glu Asn Lys Val  
420

<210> 12

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sentido cebador VH 3

ES 2 725 673 T3

<400> 12  
aatatgcgca cactccgagg tgcagctgg ggagtcgg 39

5 <210> 13  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sentido cebador VH 3a

10 <400> 13  
aatatgcgca cactccgagg tgcagctgtt ggagtcgg 39

<210> 14  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Antisentido cebador JH 1

<400> 14  
gagacggta ccagggtgcc ctggccca 29

20 <210> 15  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Antisentido cebador JH 2

25 <400> 15  
gagacggta ccagggtgcc acggccca 29

<210> 16  
<211> 29  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Antisentido cebador JH 3

<400> 16  
gagacggta ccattgtccc ttggccca 29

35 <210> 17  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Antisentido cebador JH 4/5

<400> 17  
gagacggta ccagggttcc ctggccca 29

<210> 18  
<211> 29

ES 2 725 673 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Antisentido cebador JH 6

5 <400> 18

gagacggta ccgtggtccc ttggccca 29

<210> 19

<211> 113

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada variable

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu  
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Arg Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ser Ile Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ala Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr

15 <210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> clon Her2 B10

# ES 2 725 673 T3

<400> 20  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asn Asn Tyr  
 20                   25                   30

Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Lys Trp Val  
 35                   40                   45

Ser Ala Ile Ser Pro Asp Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50                   55                   60

Lys Gly Arg Phe Ile Phe Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Met Leu Ser  
 65                   70                   75                   80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Gly Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85                   90                   95

Ala Arg Gln Asn Asn Val Arg Asp Gly Ala Val Ala Gly Pro Leu Asp  
 100                 105                 110

His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 115                 120

<210> 21  
 <211> 51  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> A56R(F2)

<400> 21  
 10 caacaccaag tggacaaga aagtaccac cgtatgcg gatcttatg a       51

<210> 22  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> CH1 (R2):

<400> 22  
 acaaaagtat tgtaatcgt gtcataactt tcttgtccac ctgggttg       50

<210> 23  
 <211> 51  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> A56R(R2):

<400> 23  
 25 tcataaagat ccgcatcgt ggtgtttt cccggagaca gggagaggct c       51

ES 2 725 673 T3

<210> 24  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> A56R(F3):

<400> 24  
gaggcttcc ctgttccgg gtaaaaccac cgatgtatcg gatctttatg a 51

10 <210> 25  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> A56R(R3):

15 <400> 25  
tatcaagtgc atttgttagtt gatgtttac ccggagacag ggagaggctc 50

<210> 26  
<211> 50  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> A56R (F4):

<400> 26  
gaggcttcc ctgttccgg gtaaaacatc aactacaat gacactgtata 50

25 <210> 27  
<211> 1566  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Construcción TR VH (H2124)-IgG-A56R

# ES 2 725 673 T3

<400> 27

caggtcgcgc tgccggcggc gggcgccagg ctgcgtggc acgcggcattt tctggaaactg gatccggccag	60
acctgcgcgtg tctatggcta ctccatcacc agccgttatt tctggaaactg gatccggccag	120
cccccaaggga agggggctgga gtggatttttt tacatcagct acgcacggcag cagcaactcc	180
aacccatctc tcaaaaatag ggtcacaatc agcagagaca cctccaagaa ccaggttctcc	240
ctgaagctga gctctgtgac cgccggccgac accgctgtgt attactgtgc cagaggaact	300
accgggtttt cttactgggg ccaaggggacc ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag	360
ggcccatcggt tcttccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	420
ctgggctgcc tggtaagga ctactcccc gaaccgggtga cggtgtcggtg gaactcaggc	480
gccctgacca gccggcgtgca cacccctccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tcgtgaccgt gcccctccagc agcttggca cccagaccta catctgcaac	600
gtgaatcaca agcccaagccaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagccaa atcttgcac	660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	720
ctcttccccca caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctgaa ggtcacatgc	780
gtgggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggaggc agtacaacag cacgtaccgt	900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	960
aaggcttcca acaaaggccct cccagccccc atcgagaaaa ccatttccaa agccaaagg	1020
cagcccccgg aaccacaggt gtacaccctg ccccccattcc gggatgagct gaccaagaac	1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgcacatcgca cgtggagtgg	1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccctgtgt ggactccgac	1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaaac	1260
gtcttctcat gctccgtgtat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1320
tccctgtctc cgggtaaaac caccgatgtat gcggatcttt atgatacgtt caatgataat	1380
gatacagtac caccaactac tgttaggcgtt agtacaacccctt ctattagca ttataaaaacc	1440
aaggactttt tagaaatattt tggattacc gcattaatta tattgtcggt cgtggcaatt	1500
ttctgttatta catattatata atataataaa cgttcacgtt aataaaaaac agagaacaaa	1560
gtcttag	1566

<210> 28

5

<211> 521

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción TR VH (H2124)-IgG-A56R

ES 2 725 673 T3

<400> 28  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

Tyr Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Ser Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

ES 2 725 673 T3

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Thr  
435 440 445

Asp Asp Ala Asp Leu Tyr Asp Thr Tyr Asn Asp Asn Asp Thr Val Pro  
450 455 460

Pro Thr Thr Val Gly Gly Ser Thr Thr Ser Ile Ser Asn Tyr Lys Thr  
465 470 475 480

Lys Asp Phe Val Glu Ile Phe Gly Ile Thr Ala Leu Ile Ile Leu Ser  
485 490 495

Ala Val Ala Ile Phe Cys Ile Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asn Lys Arg Ser  
500 505 510

Arg Lys Tyr Lys Thr Glu Asn Lys Val  
515 520

<210> 29  
<211> 1962  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

## ES 2 725 673 T3

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Construcción FL VH (H2124)-IgG-A56R

<400> 29	
caggtgcagc tgcagcagt gggcgagga ctgctgaagc ctagcgagac cctgtccctc	60
acctgcgctg tctatggcta ctccatcacc agcggctatt tctggaactg gatccgccag	120
cccccaggga aggggctgga gtggattggg tacatcagct acgacggcag cagcaactcc	180
aacccatctc tcaaaaatag ggtcacaatc agcagagaca cctccaagaa ccagttctcc	240
ctgaagctga gctctgtgac cgccgcccac accgctgtgtt attactgtgc cagaggaact	300
accgggtttg cttactgggg ccaagggacc ctggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag	360
ggcccatcggt tcttccccc ggcacccctcc tccaagagca cctctggggg cacagccggcc	420
ctgggctgcc tggtaaggaa ctactcccc gaaccggta cggtgtcgtg gaactcaggc	480
gccctgacca gccgcgtgca cacctcccg gctgtcctac agtccctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tcgtgaccgt gccctccagc agcttggca cccagaccta catctgcaac	600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggta gacaagaaag ttgagccaa atcttgtac	660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	720
ctcttccccc caaaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc	780
gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactgta cgtggacggc	840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	960
aaggcttcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaagg	1020
cagcccccag aaccacaggt gtacaccctg ccccccattccc gggatgagct gaccaagaac	1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgcacatcgc cgtggagtgg	1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccctgtct ggactccgac	1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggAAC	1260
gtcttctcat gctccgttat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1320
tccctgtctc cgggtaaaac atcaactaca aatgacactg ataaagtata ttatgaagaa	1380
tactccacag agttgattgt aaatacagat agtgaatcga ctatagacat aatactatct	1440
ggatctacac attcaccgga aactagttct aagaaacctg attatataga taattctaat	1500
tgctcgtcgg tattcgaaat cgcgactccg gaaccaatta ctgataatgt agaagatcat	1560
acagacaccg tcacatacac tagtgatagc attaatacag taagtgcacat atctggagaa	1620
tccacaacag acgagactcc ggaaccaatt actgataaaag aagatcatac agttacagac	1680
actgtctcat acactacagt aagtacatca tctggaatttgc tcactactaa atcaaccacc	1740
gatgatgcgg atctttatga tacgtacaat gataatgata cagtaccacc aactactgt	1800
ggcggtagta caaccccttat tagcaattat aaaaccaagg actttgtata aatatttgg	1860
attaccgcat taattatatt gtcggccgtg gcaattttct gtattacata ttatatatat	1920
aataaacgtt cacgtaaaata caaaaacagag aacaaagtct ag	1962

ES 2 725 673 T3

<210> 30  
<211> 653  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Construcción FL VH (H2124)-IgG-A56R

<400> 30  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
20 25 30

Tyr Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Ser Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

ES 2 725 673 T3

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

ES 2 725 673 T3

385                   390                   395                   400  
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405                   410                   415  
  
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420                   425                   430  
  
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Ser  
435                   440                   445  
  
Thr Thr Asn Asp Thr Asp Lys Val Asp Tyr Glu Glu Tyr Ser Thr Glu  
450                   455                   460  
  
Leu Ile Val Asn Thr Asp Ser Glu Ser Thr Ile Asp Ile Ile Leu Ser  
465                   470                   475                   480  
  
Gly Ser Thr His Ser Pro Glu Thr Ser Ser Lys Lys Pro Asp Tyr Ile  
485                   490                   495  
  
Asp Asn Ser Asn Cys Ser Ser Val Phe Glu Ile Ala Thr Pro Glu Pro  
500                   505                   510  
  
Ile Thr Asp Asn Val Glu Asp His Thr Asp Thr Val Thr Tyr Thr Ser  
515                   520                   525  
  
Asp Ser Ile Asn Thr Val Ser Ala Ser Ser Gly Glu Ser Thr Thr Asp  
530                   535                   540  
  
Glu Thr Pro Glu Pro Ile Thr Asp Lys Glu Asp His Thr Val Thr Asp  
545                   550                   555                   560  
  
Thr Val Ser Tyr Thr Thr Val Ser Thr Ser Ser Gly Ile Val Thr Thr  
565                   570                   575  
  
Lys Ser Thr Thr Asp Asp Ala Asp Leu Tyr Asp Thr Tyr Asn Asp Asn  
580                   585                   590  
  
Asp Thr Val Pro Pro Thr Thr Val Gly Gly Ser Thr Thr Ser Ile Ser  
595                   600                   605  
  
Asn Tyr Lys Thr Lys Asp Phe Val Glu Ile Phe Gly Ile Thr Ala Leu  
610                   615                   620  
  
Ile Ile Leu Ser Ala Val Ala Ile Phe Cys Ile Thr Tyr Tyr Ile Tyr  
625                   630                   635                   640  
  
Asn Lys Arg Ser Arg Lys Tyr Lys Thr Glu Asn Lys Val  
645                   650

<210> 31  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador específico cadena pesada 428

<400> 31

gatatatataa agtcaataa agtg 24

5

<210> 32

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> cebador específico cadena pesada 430

<400> 32

gacatcacat agtttagtg c 21

**REIVINDICACIONES**

1. Una biblioteca de vaccinia recombinante que comprende una biblioteca de polinucleótidos que codifican una pluralidad de polipéptidos de fusión de inmunoglobulina que comprenden diferentes regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina; cada polipéptido de fusión de inmunoglobulina comprende, en orden N- a C-, un dominio variable de cadena pesada fusionado a un dominio constante CH1 fusionado a un segmento polipeptídico que comprende el dominio transmembrana de una proteína de membrana específica de EEV, donde la biblioteca de polinucleótidos se construye en un vector de virus vaccinia y donde cada polinucleótido en la biblioteca comprende los siguientes elementos:
- 5           (a) un cebador polinucleótido que codifica un cebador segmento polipeptídico que comprende un dominio de cadena pesada IgG CH1;
- 10          (b) un segundo polinucleótido que codifica un segundo segmento polipeptídico que comprende la región del tallo, el dominio transmembrana y el dominio intracelular de la proteína de membrana específica de EEV del virus vaccinia A56R, situada aguas abajo del cebador polinucleótido que codifica el cebador segmento del polipéptido, y
- 15          (c) un tercer polinucleótido que codifica una región variable (VH) de cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de ella situado aguas arriba del cebador polinucleótido que codifica el cebador segmento polipeptídico; donde la proteína de fusión de inmunoglobulina se puede expresar en la superficie de una partícula de vaccinia EEV y la proteína de fusión se puede combinar con una cadena ligera de inmunoglobulina para formar un dominio de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina.
- 20          2. La biblioteca de la reivindicación 1, donde los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina comprenden cada uno un VH o fragmento de este fusionado al extremo N de los aminoácidos 117 a 421 de la SEQ ID NO. 11.
- 25          3. La biblioteca de la reivindicación 1, donde el cebador polinucleótido de (a) codifica un cebador segmento polipeptídico que comprende una región constante de IgG de longitud completa.
- 30          4. La biblioteca de la reivindicación 3, donde los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina comprenden cada uno un VH o fragmento de este fusionado al extremo N de los aminoácidos 117 a 653 de la SEQ ID NO. 30.
- 35          5. Un método para seleccionar polinucleótidos que codifican una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina específica de antígeno o un fragmento de unión al antígeno, que comprende:
- 40           (a) introducir la biblioteca de polinucleótidos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en una población de células huésped que admiten la infección con el virus vaccinia;
- 45           (b) introducir uno o más polinucleótidos que codifican una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno en la población de células huésped, donde las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden combinarse con una cadena ligera de inmunoglobulina para formar un dominio de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina;
- 50           (c) permitir la liberación de virus con envoltura extracelular (EEV) de las células huésped;
- 55           (d) poner en contacto el EEV liberado con un antígeno; y
- 60           (e) recuperar los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de fusión de la cadena pesada de inmunoglobulina expresados en la superficie de la membrana de EEV que se unen específicamente al antígeno en el paso (d).
- 65          6. El método de la reivindicación 5, que comprende, además:
- 70           (f) introducir los polinucleótidos recuperados en (e) en una segunda población de células huésped que admiten la infección con el virus vaccinia;
- 75           (g) introducir uno o más polinucleótidos que codifican una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno en la segunda población de células huésped, de manera que se forma un dominio de unión al antígeno de una molécula de inmunoglobulina;
- 80           (h) permitir la liberación de EEV de las células huésped;
- 85           (i) poner en contacto el EEV liberado con un antígeno; y
- 90           (j) recuperar los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de fusión de la cadena pesada de inmunoglobulina expresados en la superficie de la membrana de EEV que se unen específicamente al antígeno en el paso (i).
- 95          7. El método de la reivindicación 6, que comprende además repetir los pasos (f)-(j) una o más veces, y así enriquecer los polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina expresados en la superficie de la membrana de EEV que se unen específicamente al antígeno.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende además aislar los polinucleótidos recuperados de la biblioteca.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde uno o más polinucleótidos que codifican una cadena ligera de inmunoglobulina de (b) están contenidos en un vector de virus vaccinia.

5 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde uno o más polinucleótidos que codifican una cadena ligera de inmunoglobulina de (b) están contenidos en un vector plásmido.

10 11. Una proteína de fusión que comprende un dominio de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada al extremo N de (a) un segmento polipeptídico que consiste en los aminoácidos 117 a 421 de la SEQ ID NO. 11, que es el dominio CH1 de la IgG1 humana fusionada a la región del tallo, el dominio transmembrana y el dominio intracelular de la proteína A56R del virus vaccinia o (b) un segmento polipeptídico que consta de los aminoácidos 117 a 653 de la SEQ ID NO. 30, que es la región constante completa de la IgG1 humana fusionada a la región del tallo, el dominio transmembrana y el dominio intracelular de una proteína A56R de un virus vaccinia; donde la proteína de fusión puede expresarse en la superficie de una partícula de virus vaccinia con envoltura extracelular (EEV) y donde la proteína de fusión, cuando se combina con un dominio variable de cadena ligera, puede formar un dominio de unión a antígeno de una molécula de inmunoglobulina.

15 12. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 11.

13. Un vector de virus vaccinia que comprende el polinucleótido de la reivindicación 12.

14. Una célula huésped que comprende el vector de virus vaccinia de la reivindicación 13.

"pJEM1"

AAAAAATGAAAATAAAATACAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAAT  
TCCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAG **CCCCGG** ACTCCGAGATCCAG  
CTGGTGCAAGAGCGGCCCTGAGCTGAAGCAGCCTGGCGAGACCGTGAGGATCAGCTGCAGGCCAGCGGC  
TACACCTTCACCAACTACGGCATGAACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGC  
TGGATCAACACACTAACCGGGAGCCTACCTACGCCGCCACTTCAAGAGGAGGTTCACCTTCAGCCTG  
GAGACCAGCGCCAGCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAACCTGAAGAACGACGGACACCGCCACCTACTTC  
TGCGCCAAGTACCCCTCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGCCGGCACCAACG  
**GTCACCGT** CTCCCTAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACC  
TCTGGGGGACAGCGGCCCTGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGG  
AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC  
CTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGAAACGTGAATCAC  
AAGCCCAGCAACACCAAGGTTGACAAGAAAGTTACATCAACTACAAATGACACTGATAAAGTAGATTAT  
GAAGAAATCTCCACAGAGTTGATTGAAAACAGATAGTGAATCGACTATAGACATAATACTATCTGGA  
TCTACACATTCAACGGAAACTAGTTCTAAGAAACCTGATTATATAGATAATTCTAATTGCTCGTCGGTA  
TTCGAAATCGCAGTCCGGAACCAATTACTGATAATGTAGAAGATCATACAGACACCGTCACATACACT  
AGTGATAGCATTAAATACAGTAAGTGCATCATCTGGAGAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATT  
ACTGATAAAGAAGATCATACAGTTACAGACACTGTCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGGAATT  
GTCACTACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTATGATACGTACAATGATAATGATAACAGTACCA  
CCAACACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGACTTTGAGAAATATT  
GGTATTACCGCATTAAATTATATTGTCGGCGTGGCAATTCTGTATTACATATTATATATAATAAAA  
CGTTCACGTAAAACAAAACAGAGAACAAGTAGCTAG

(SEQ ID NO: 1)

Subrayado doble - promotor H5

Subrayado simple - péptido líder

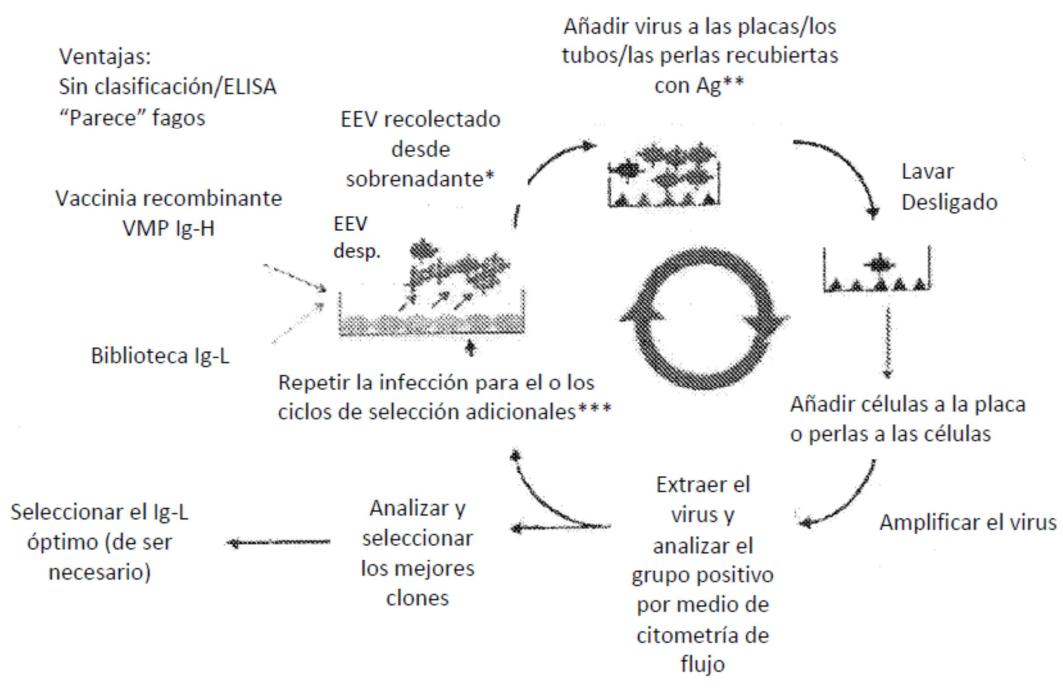
Subrayado ondulado - Región Pesada Variable Representativa

Subrayado en negrita - dominio IgG CH1

Sin subrayar - Vacinia A56R

Cursiva negrita - sitio de clonación del gen variable BssHII y BstEII

## FIG. 1

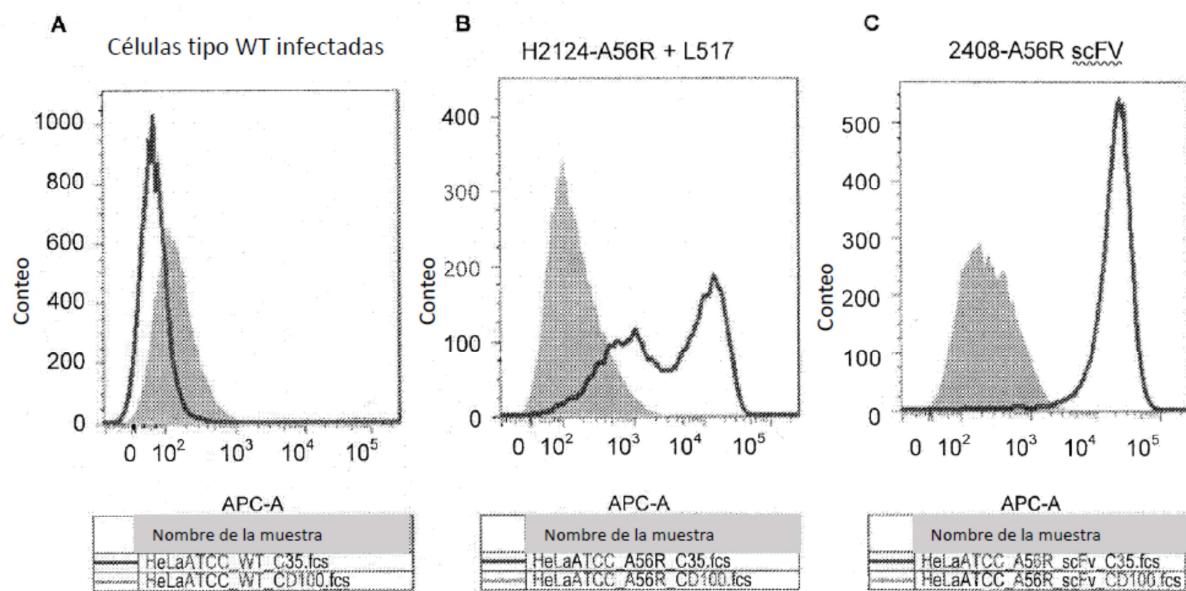


\*Para IMV: recolectar células, homogeneizar, retirar los restos y proceder

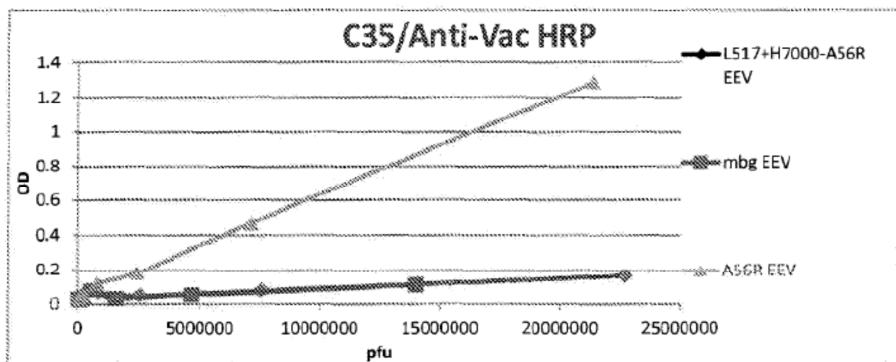
\*\*Se puede usar una etapa de agotamiento

\*\*\*Se podría agregar la calificación de células como etapa final

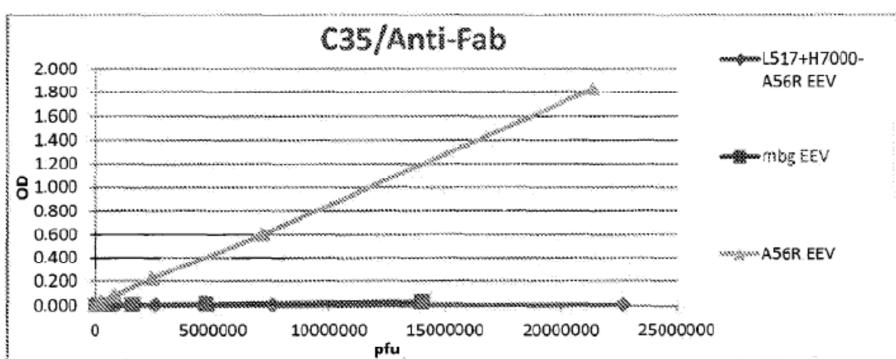
FIG. 2

**FIG. 3**

A

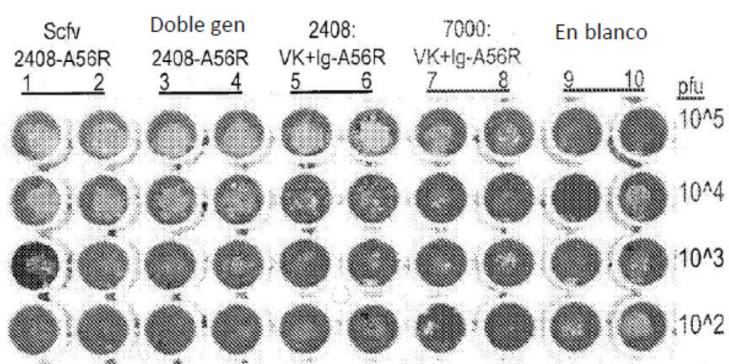


B

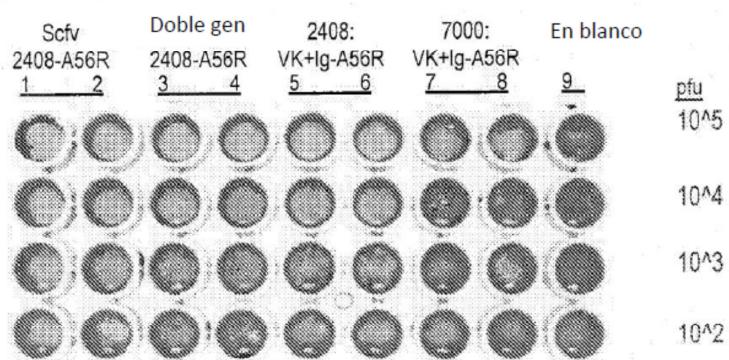


**FIGURA 4**

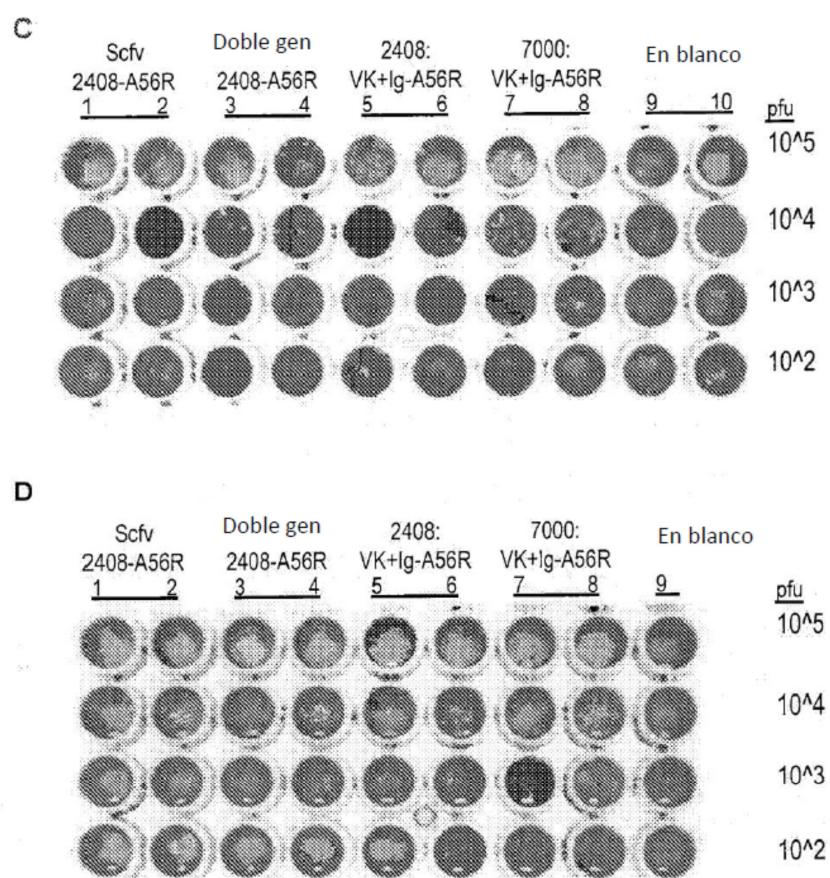
**A**



**B**



**FIG. 5**



**FIG. 5**  
**(Continuación)**

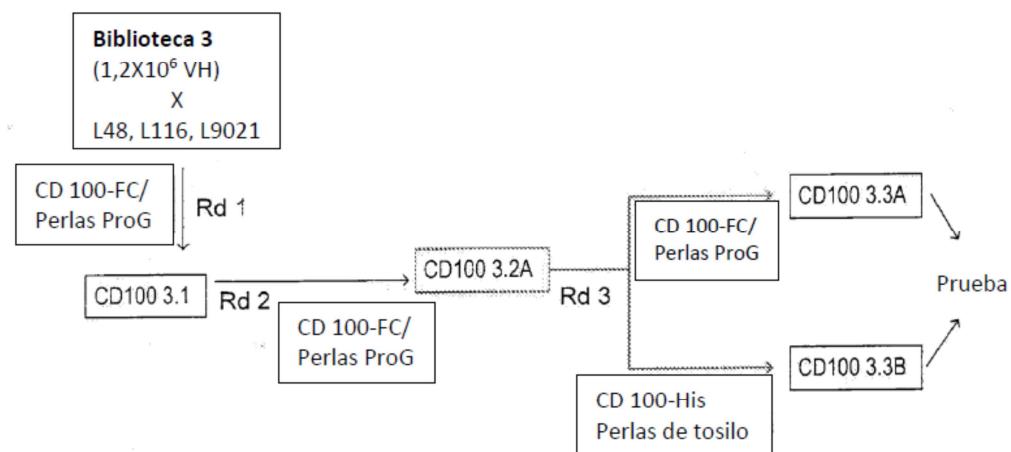


FIG. 6

## Alineación:

>VH3-11

Identidades = 81/98 (82 %), Positivos = 88/98 (89 %)

C. 20: 1 EQLVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFTDYYLWIRQAFKGKPEWLSYISSYSRYINY 60  
+VQLVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF F+DYYLWIRQAFKGK EW+SYISS Y  
VH311: 1 QVQLVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGTFSDYIYNLSWIRQAFKGKLENSYIISSSGTLIXX 60

C. 20: 61 ADSVKGRTISRDNRNTSIYLQMNHLRVEDTAVYYCAR 98 (SEQ ID NO: 19)  
VH311: 61 ADSVKGRTISRDNRNKSILYQMNHLRAEDTAVYYCAR 98

**FIG. 7**

# ES 2 725 673 T3

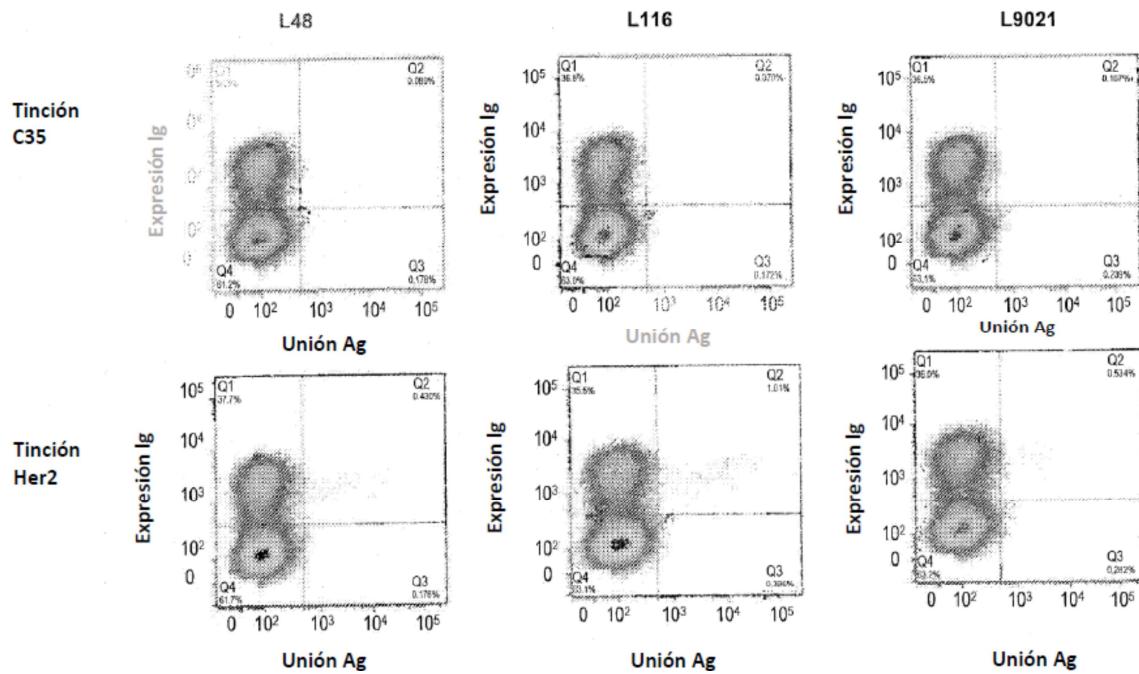
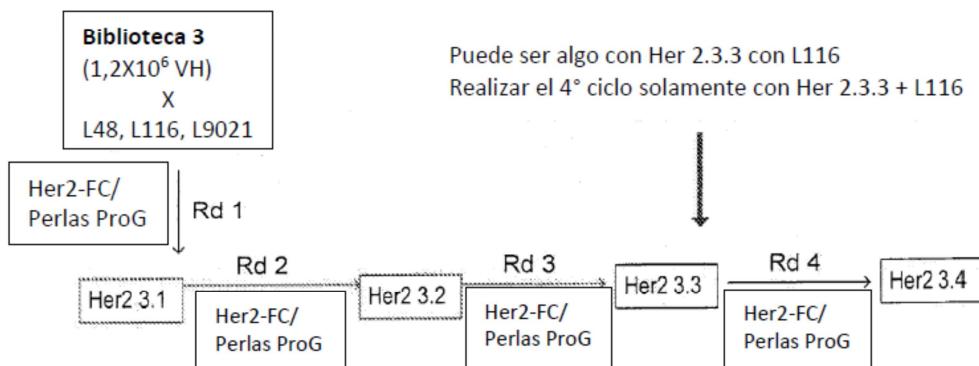


FIG. 8



**FIG. 9**

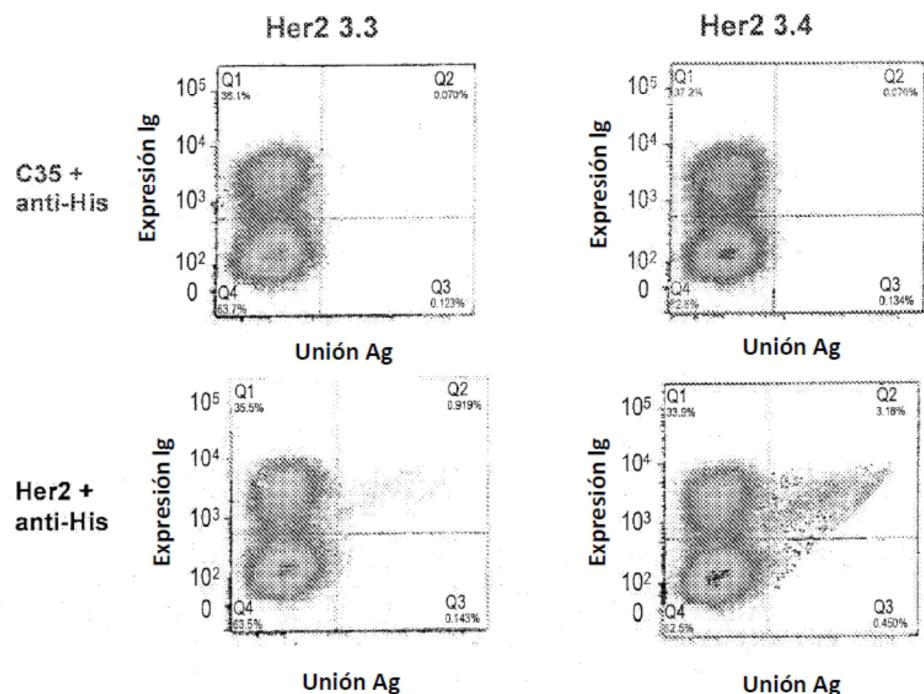


FIG. 10

ES 2 725 673 T3

### Secuencia del clon Her2 B10

EVQLLESGGGVQPGGSLRLSCAASGFNFYALSWVRQAPGRGLKWWVAISPDGD  
YfYYADSVKGRflFSRDNRSNIVJLSLQMDSLGAEDTALYYCARQNNVRDGA VAGPLD  
HWGQGTLVT

>IGHV3-23\*01

Identidades = 77/98 (78 %), Positivos = 85/98 (86 %)

B10: 1	EVQLLESGGGFVQPQGGSLRLSCAASGFAFNNYALSWVRQAPGRGLKVVSAISPDGDYIYY 60 EVQLLESGGG VQPQGGSLRLSCAASGfI F++YA+SWVRQAPG+GL+WVSAIS G YY
VH323: 1	EVQLLESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY 60
B10: 61	ADSVKGRFIFSRDNSRNMLSLQMITSLGAEDTALYYCAR 98 (SEQ ID NO: 20) ADSVKGRF SRDNS+N L LQM SL AEDTA+YYCA+
VH323: 61	ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK 98

## FIGURA 11

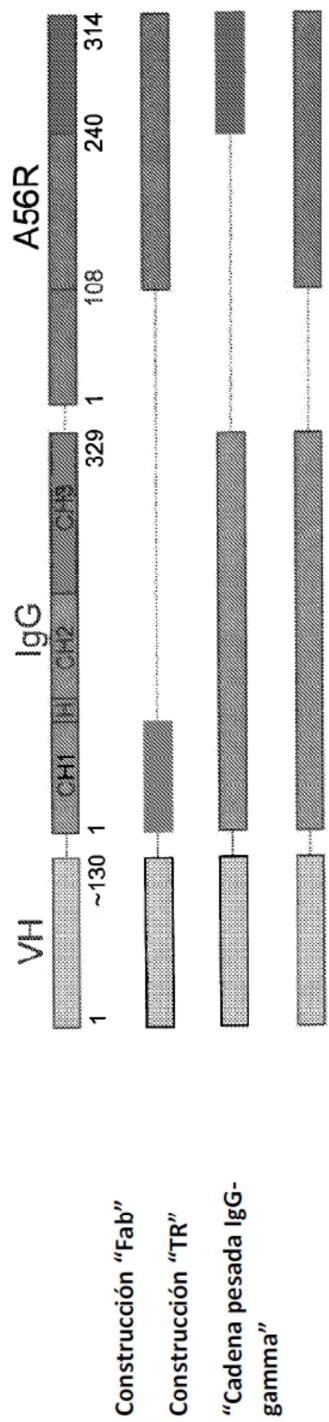


FIG. 12

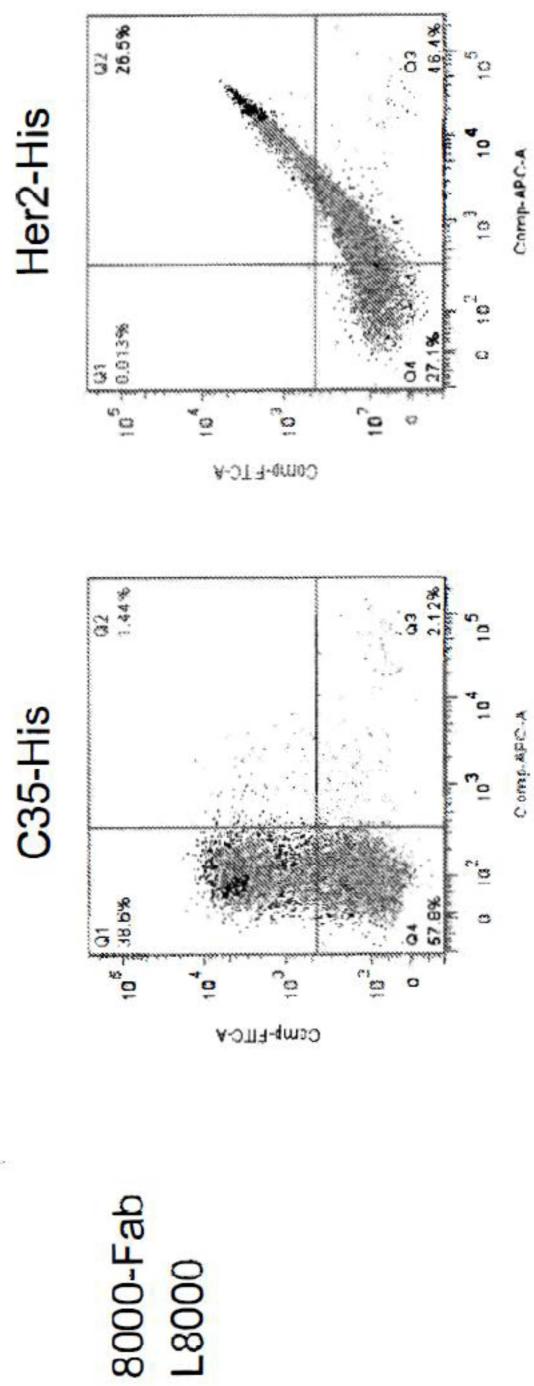
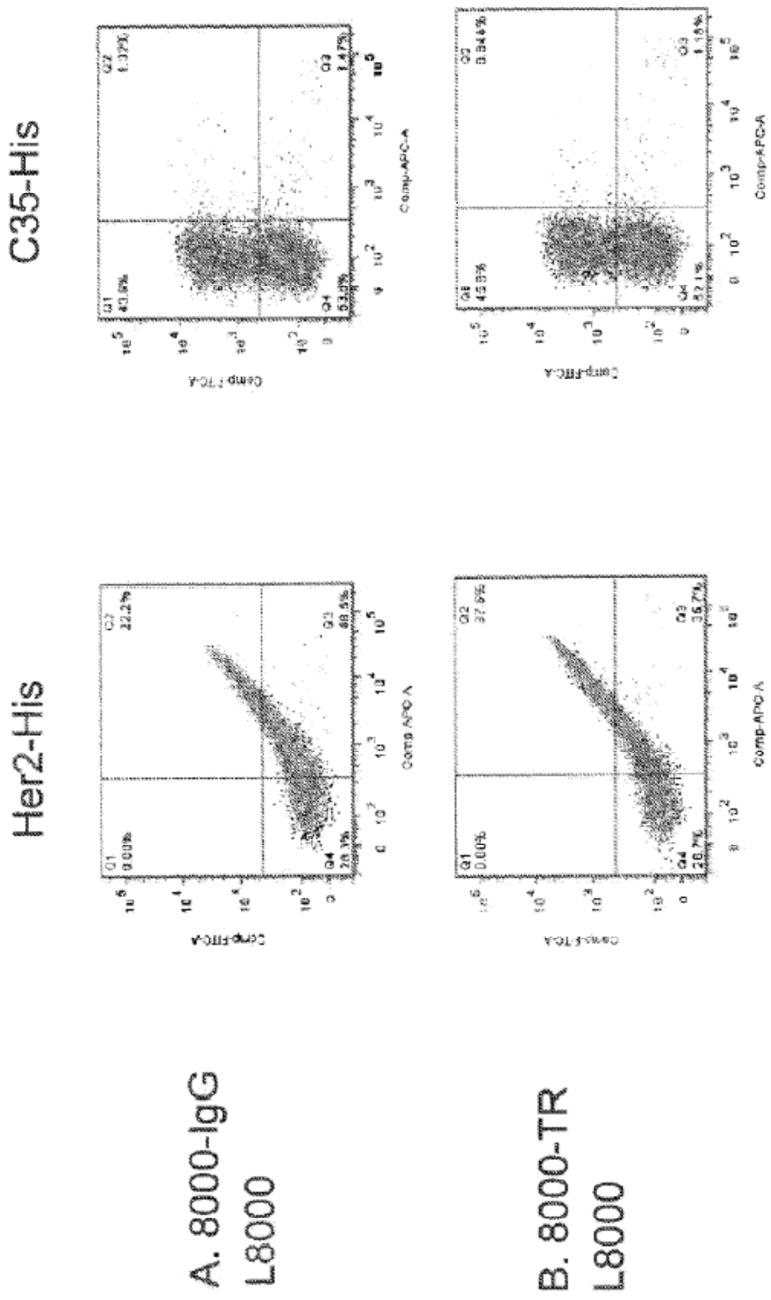
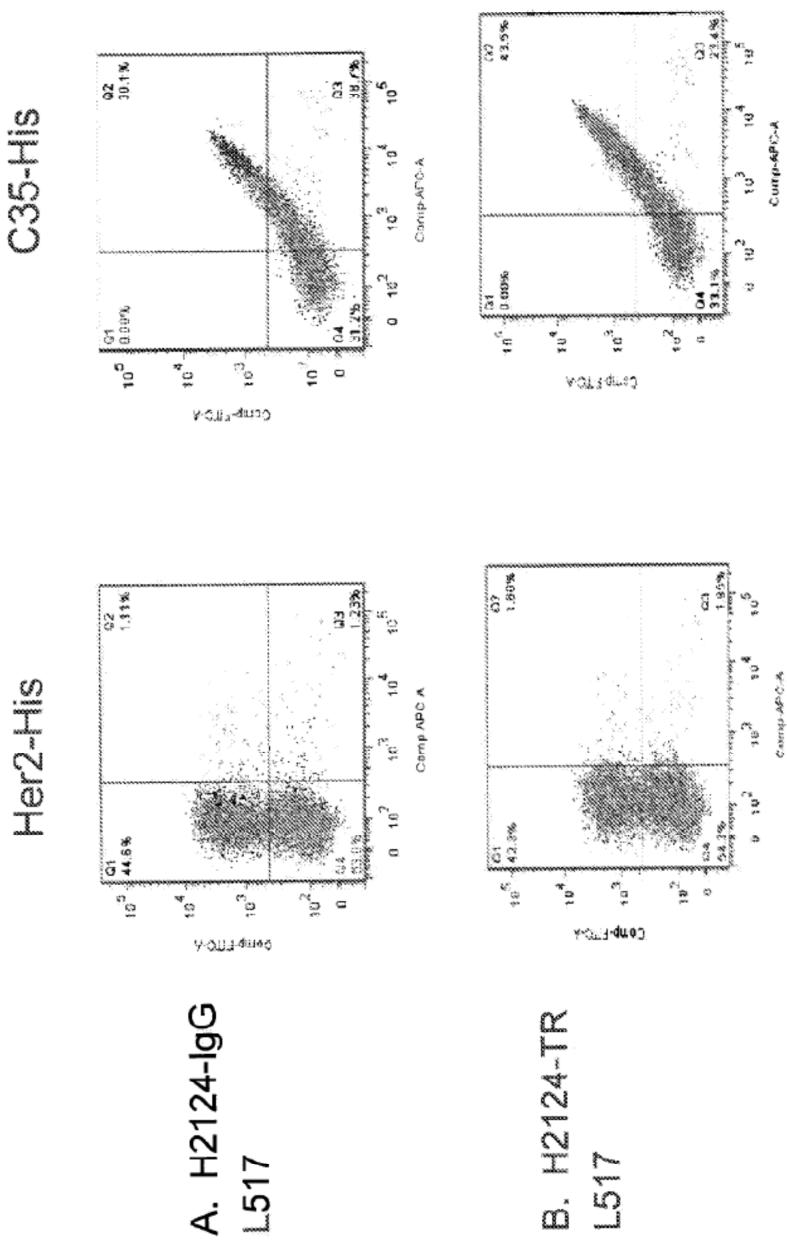


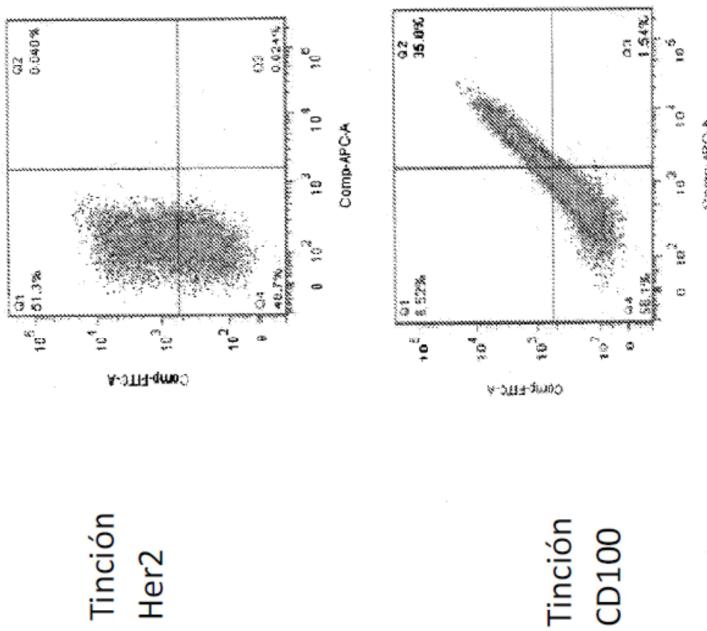
FIG. 13

**FIG. 14**

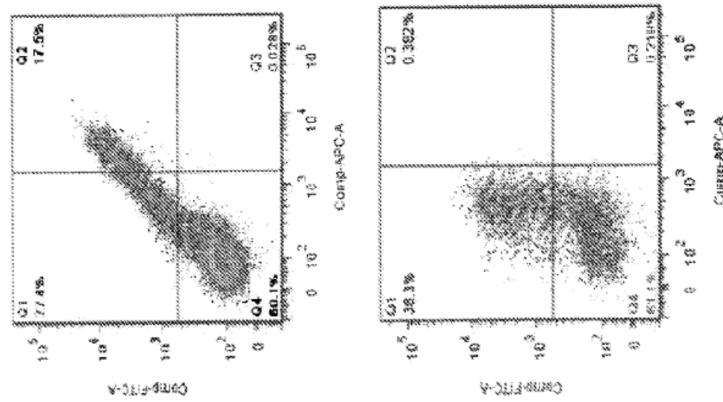
**FIG. 15**

# ES 2 725 673 T3

**A. 2368**



**B. 8000**



**FIG. 16**

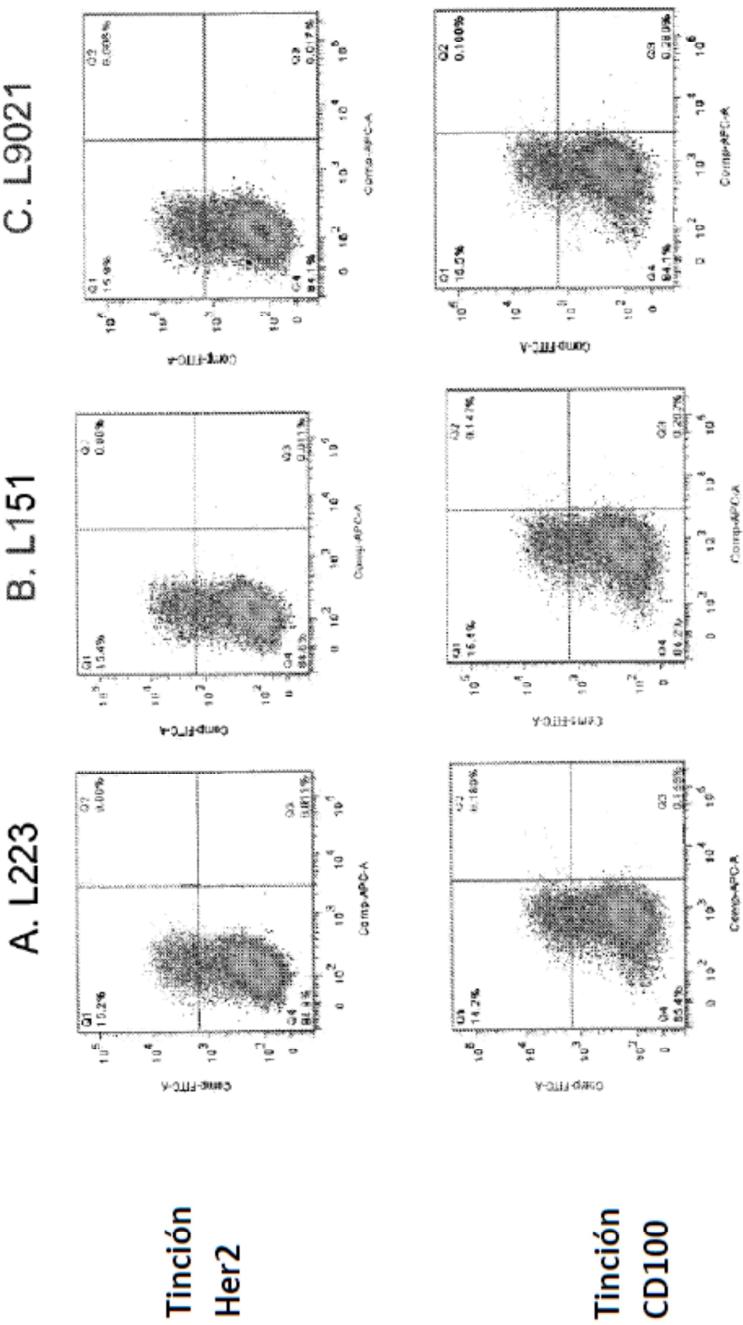
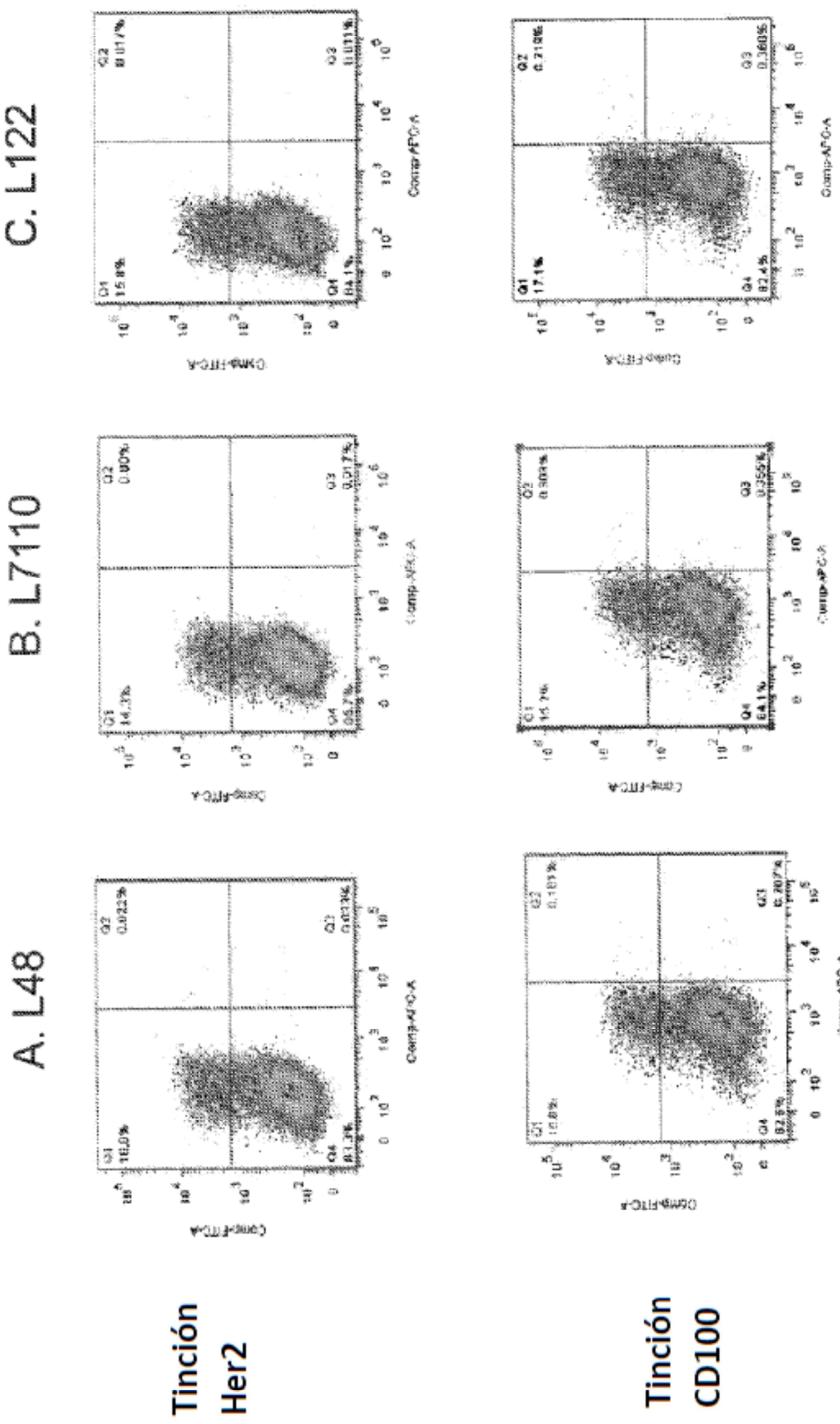
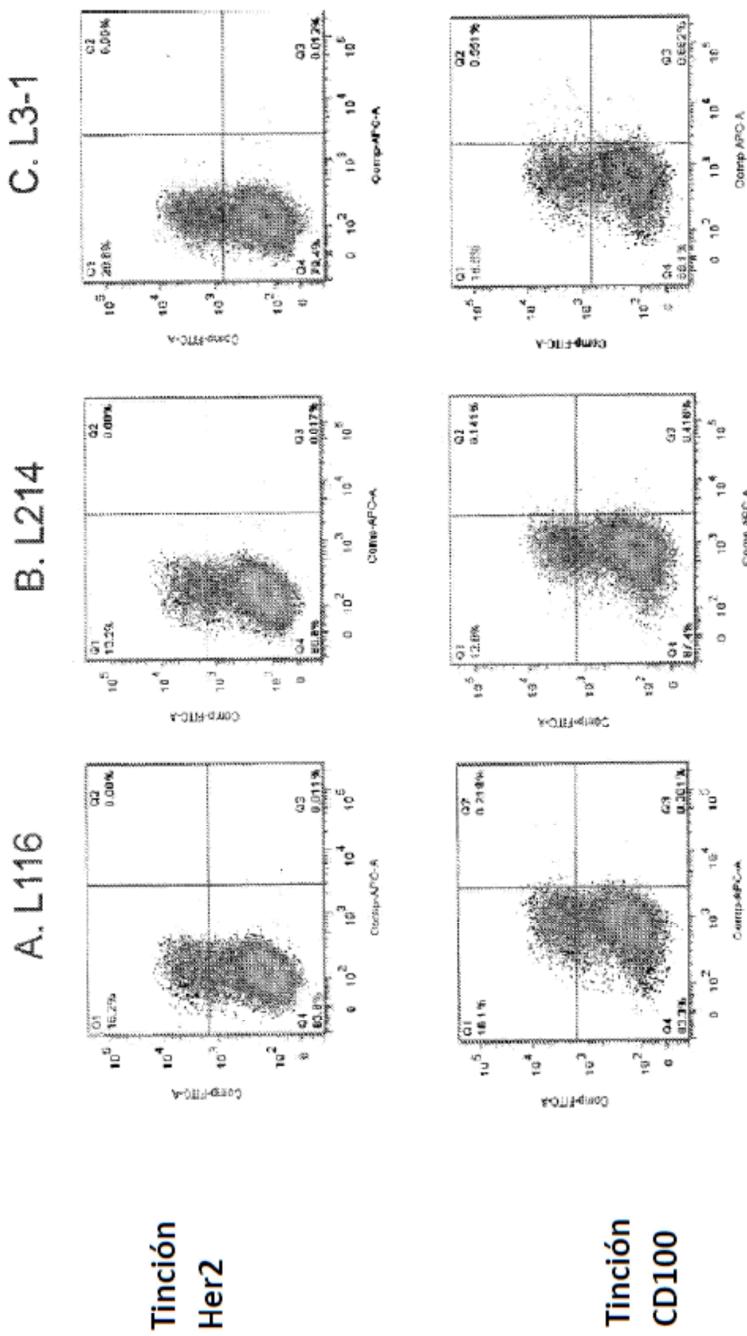
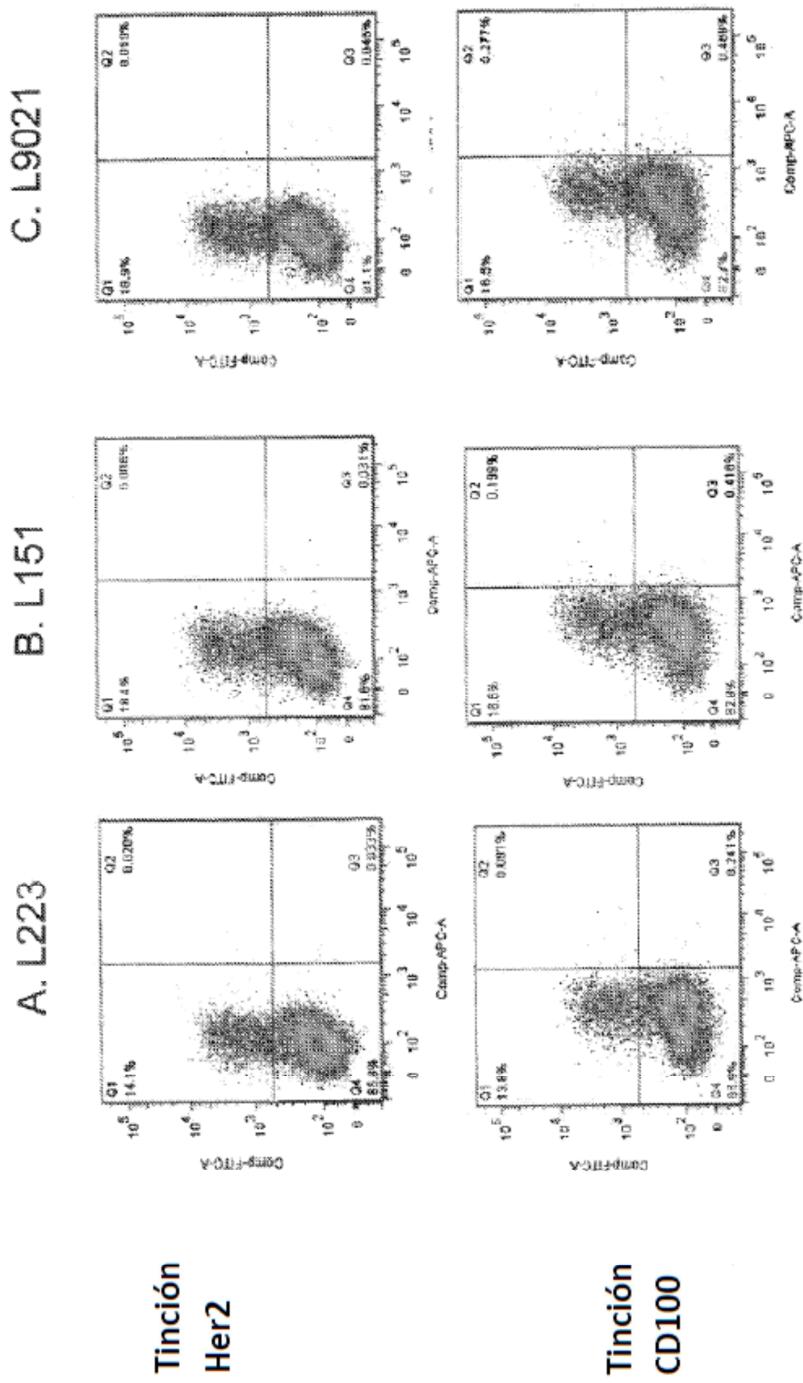
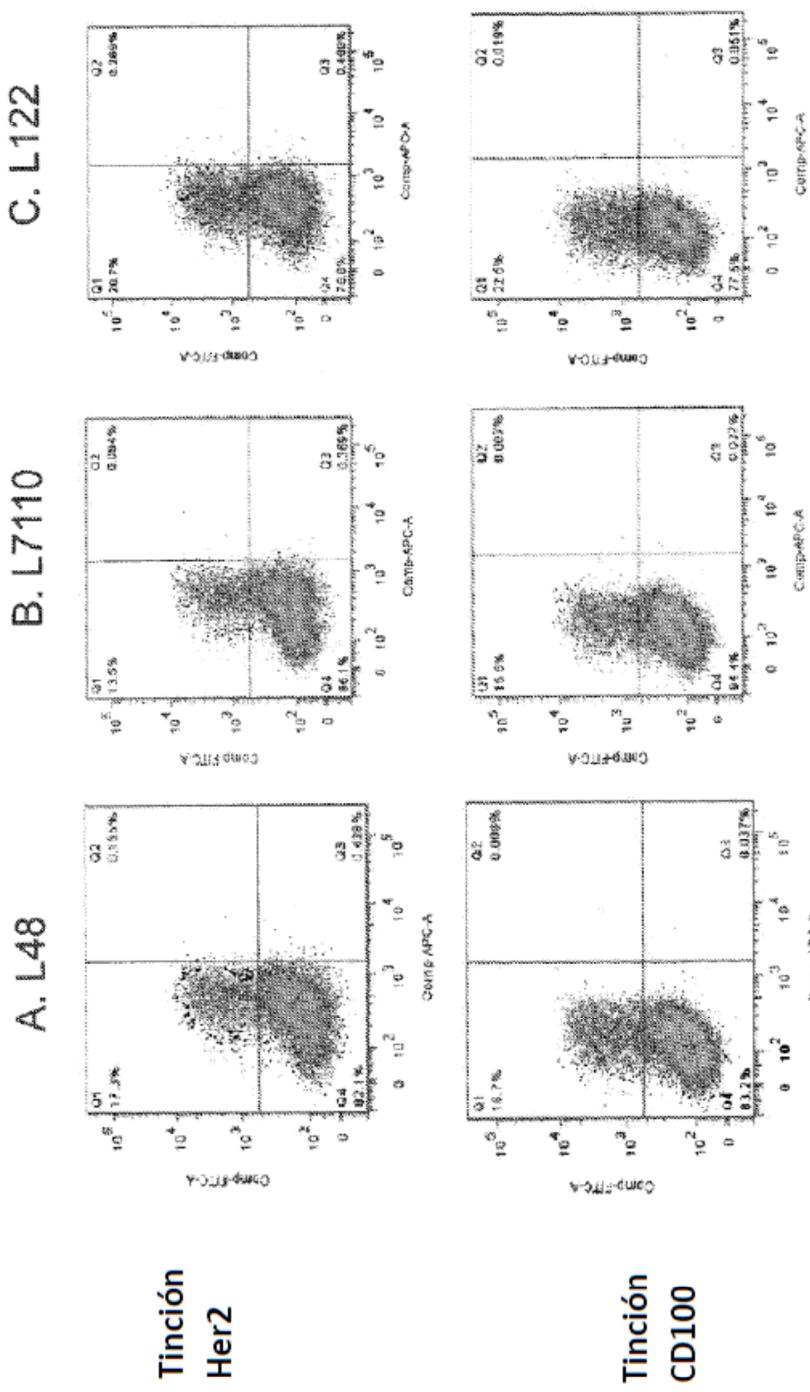


FIG. 17

**FIG. 18**

**FIG. 19**

**FIG. 20**

**FIG. 21**

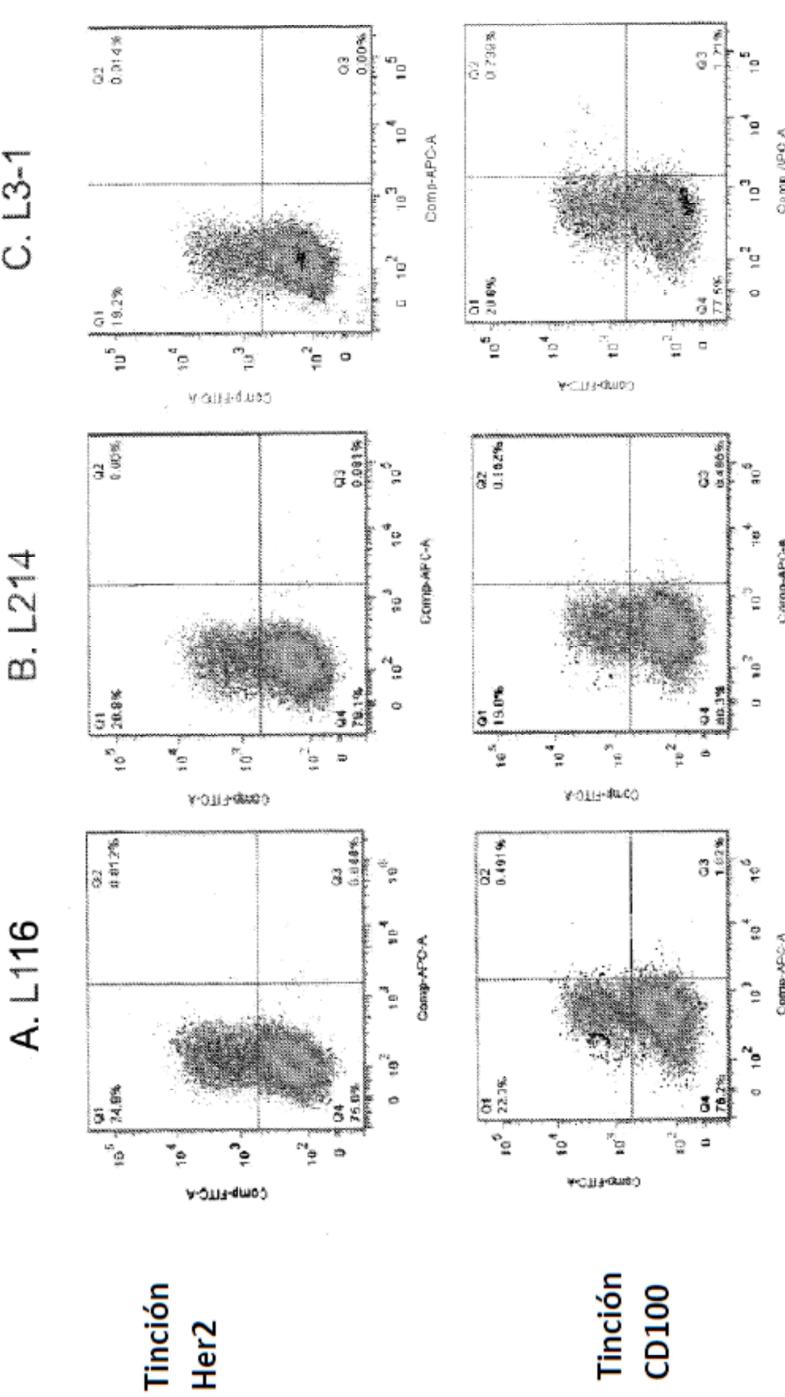
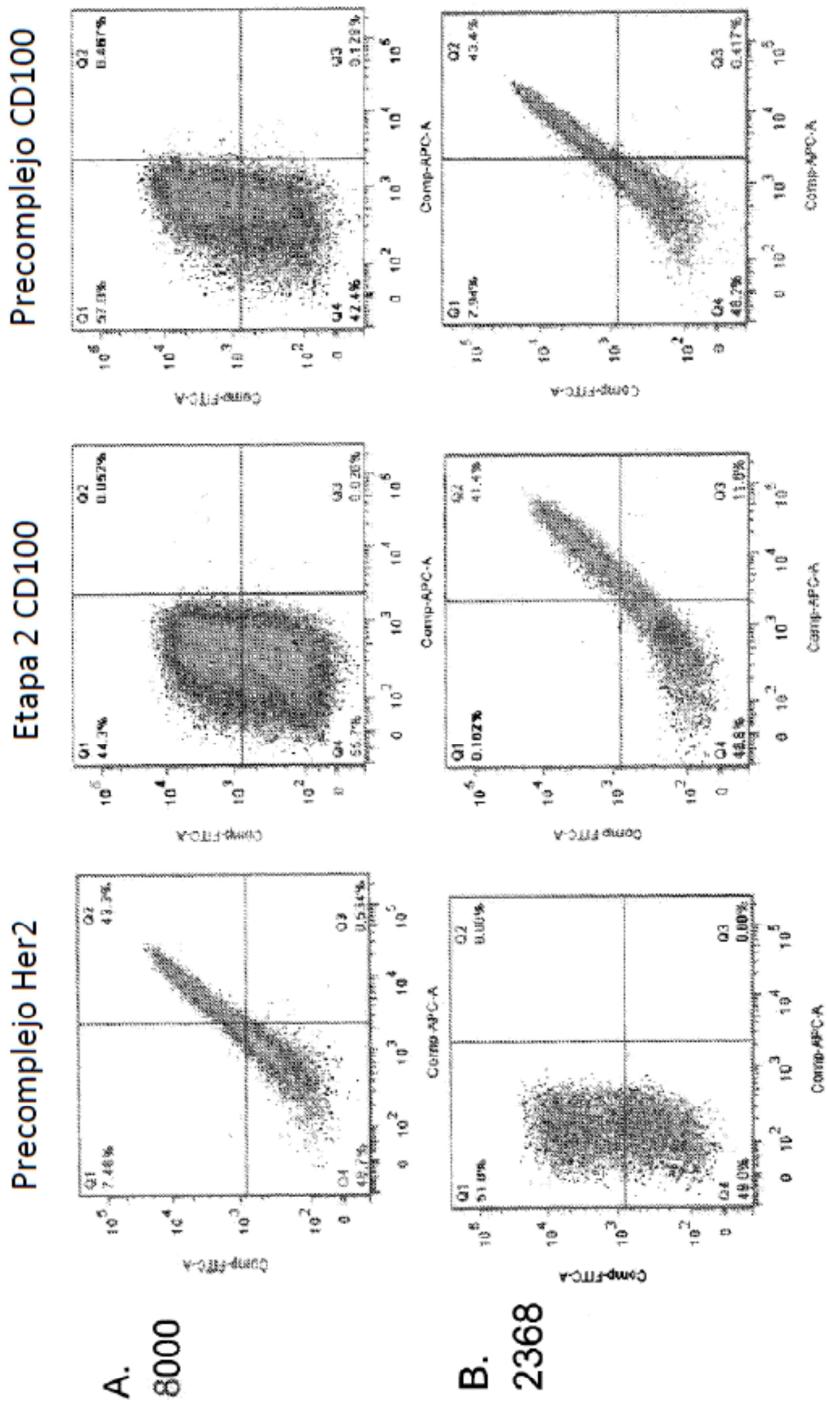
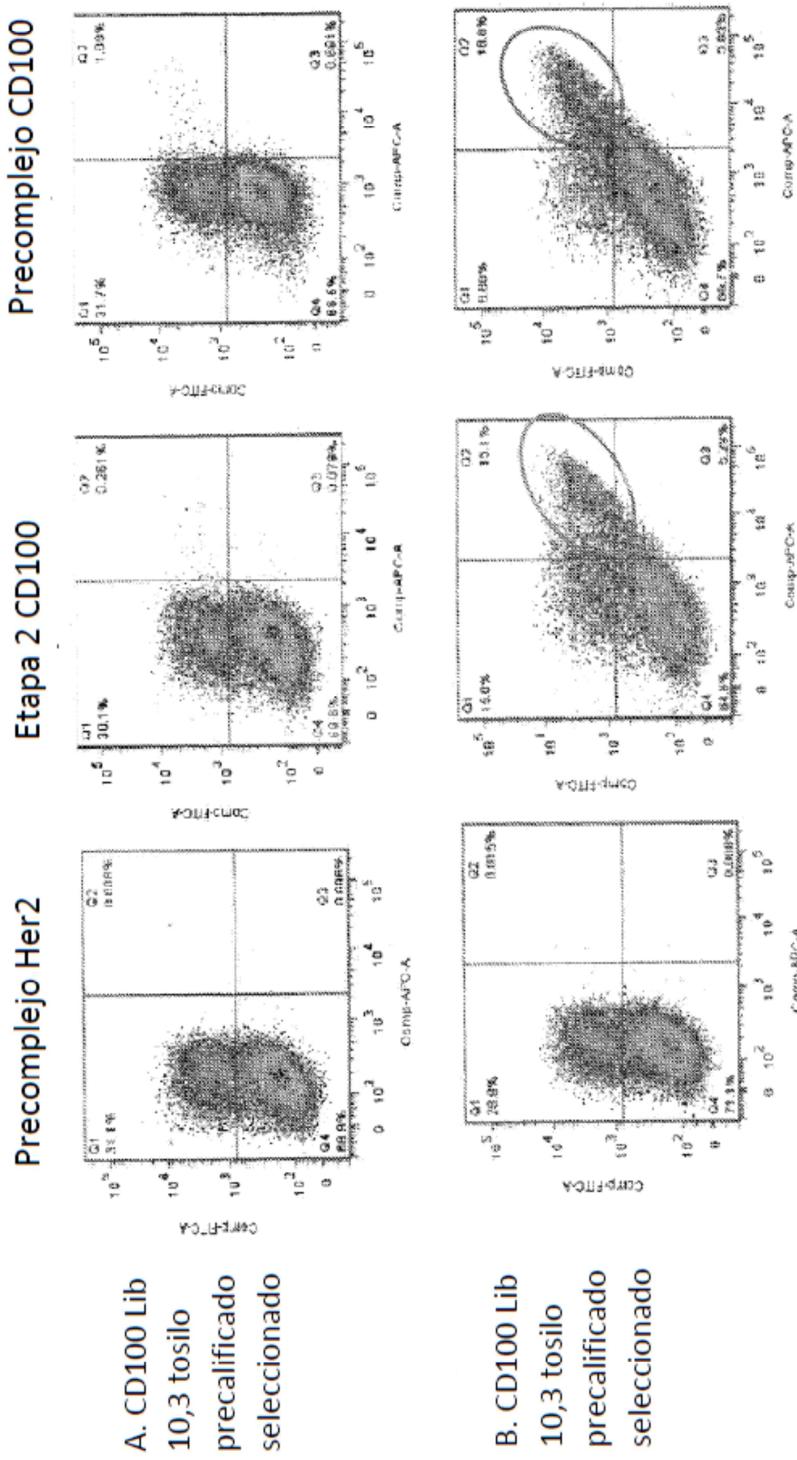
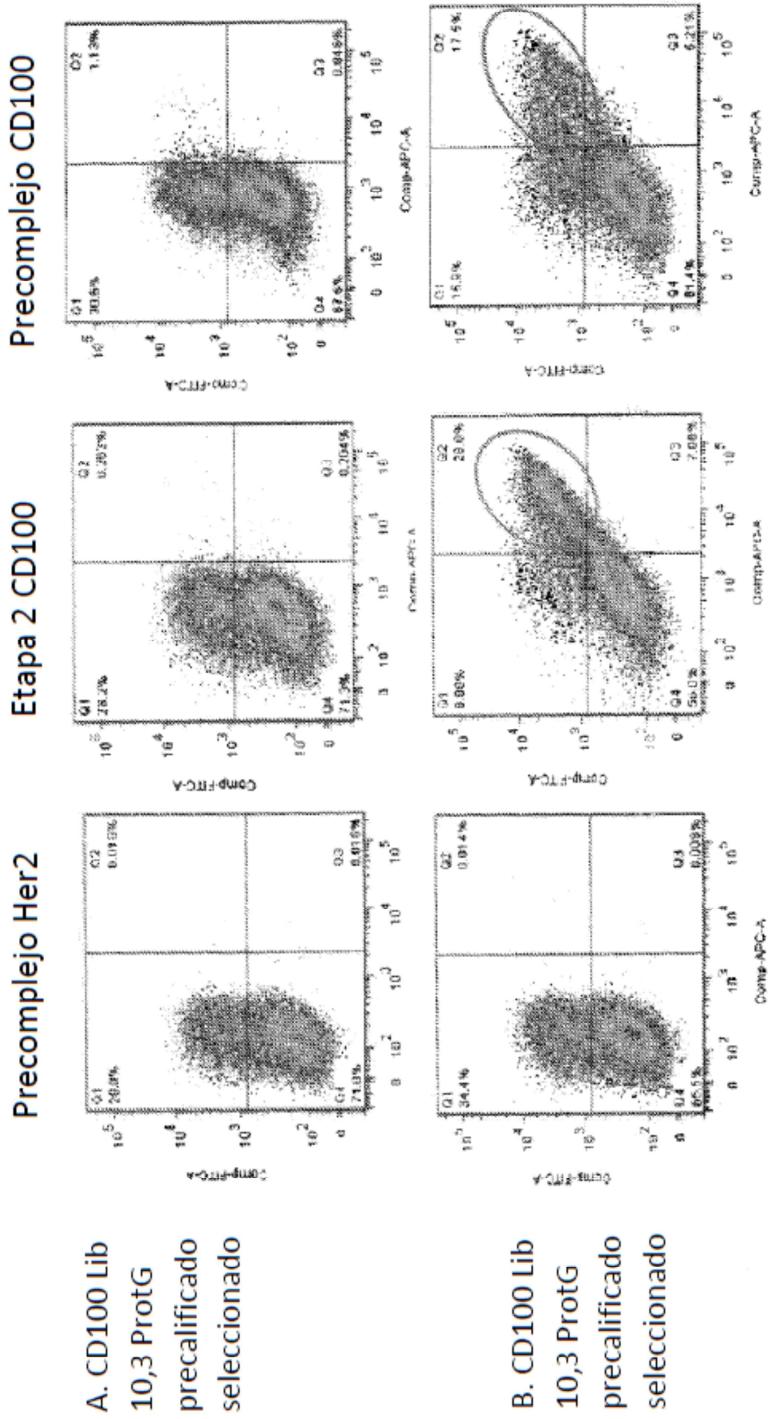


FIG. 22

**FIG. 23**



**FIG. 24**

**FIG. 25**

- mAb 2050 VH5-51 sintético
- mAb 2063 VH3-30 nativo
- mAb 2110 VH3-7 nativo
- CD100 específico a nativo en células Jurkat con baja unión al entorno sobre

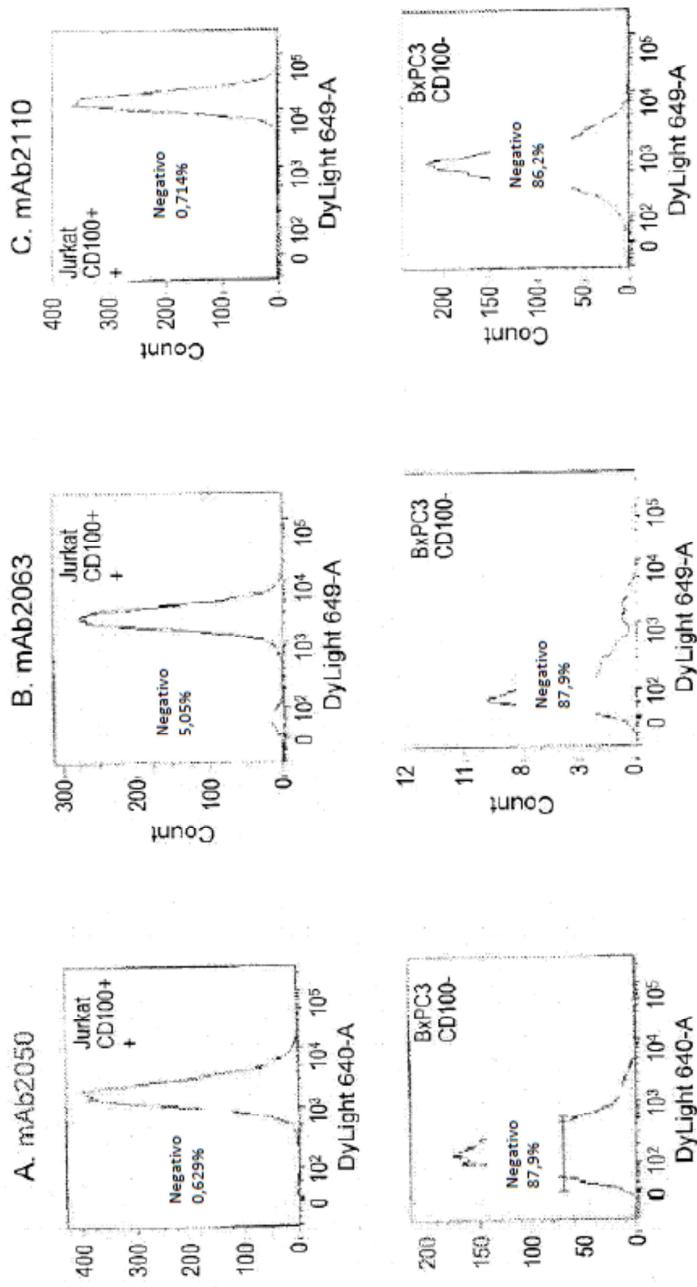
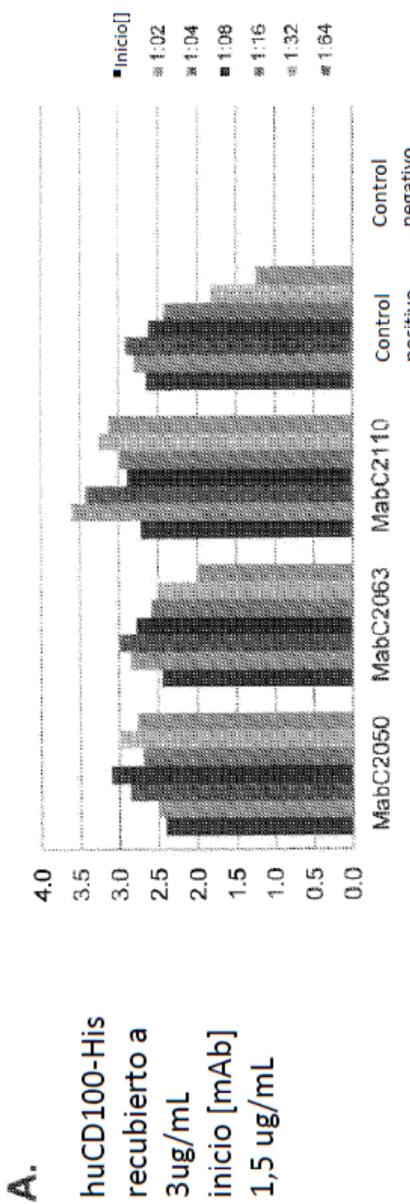
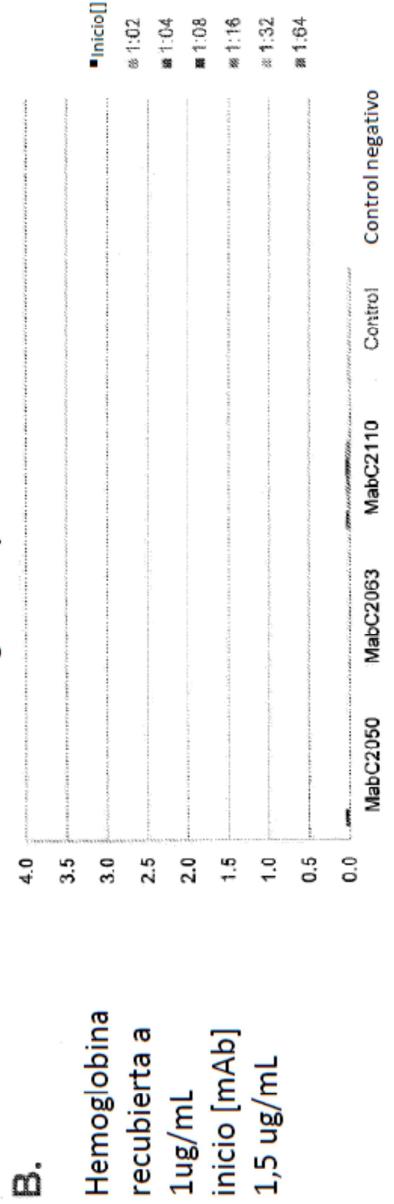
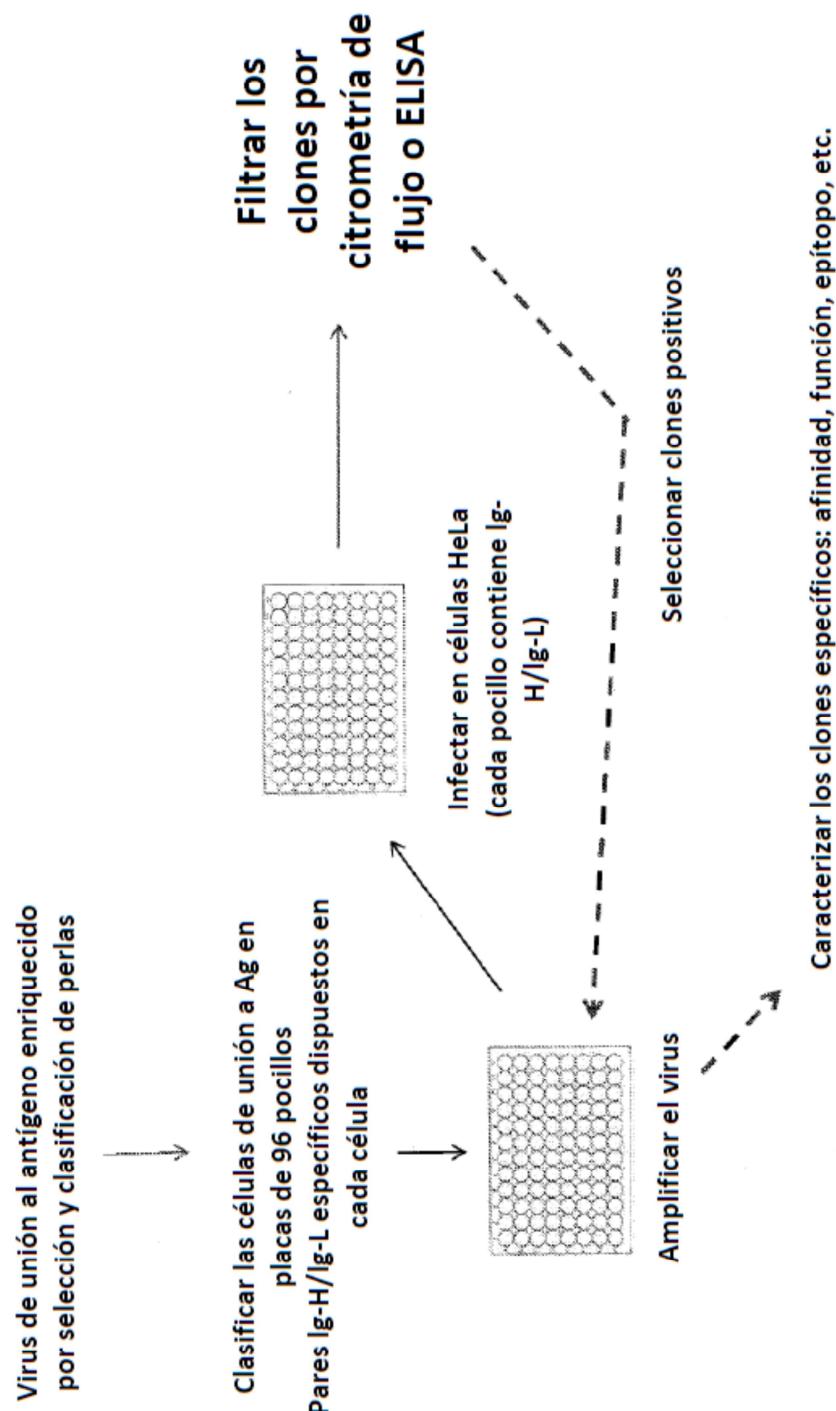
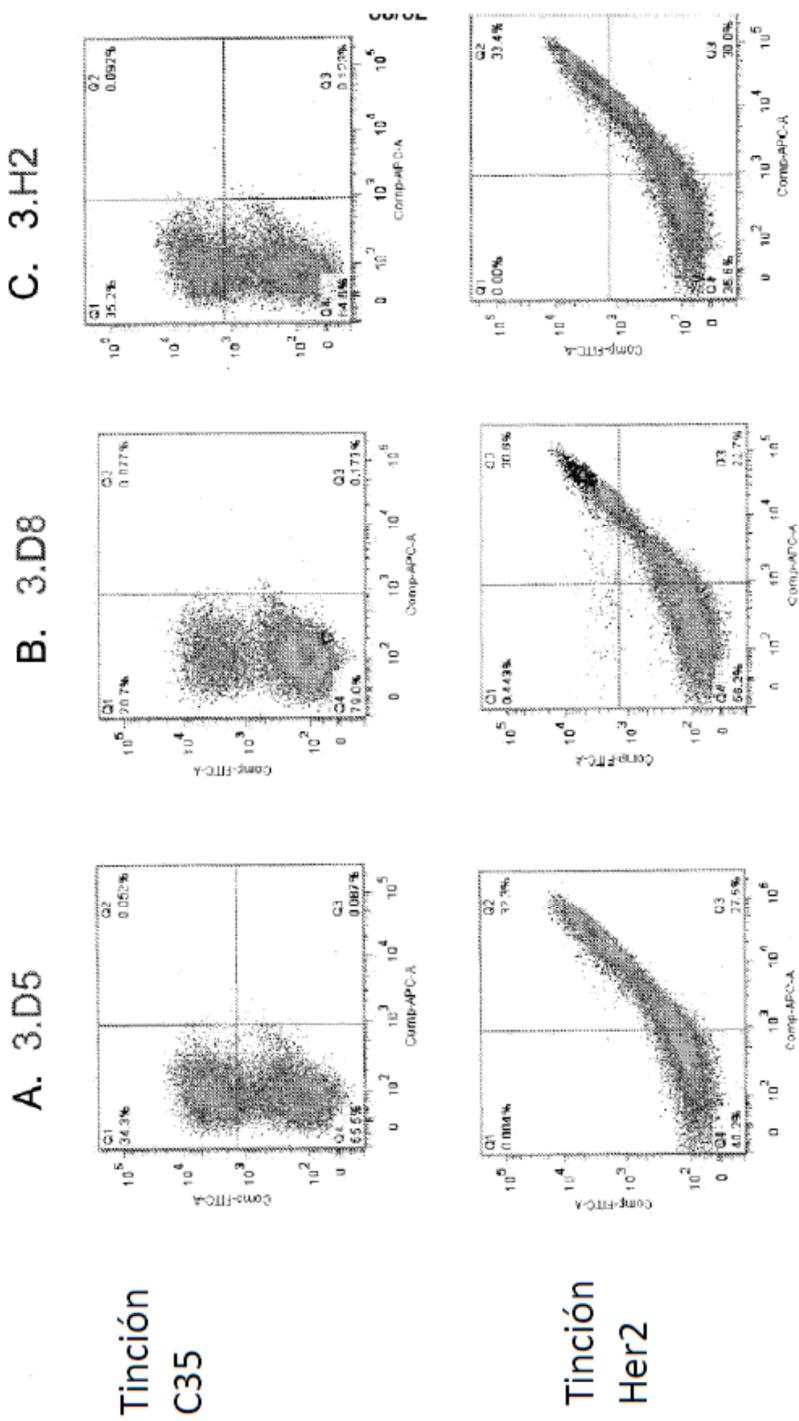


FIG. 26

**huCD100-His que une AVEOD450-570****Hemoglobina que une AVEOD450-570****FIG. 27**

**FIG. 28**

**FIG. 29**

### Especificidad de unión de Her2

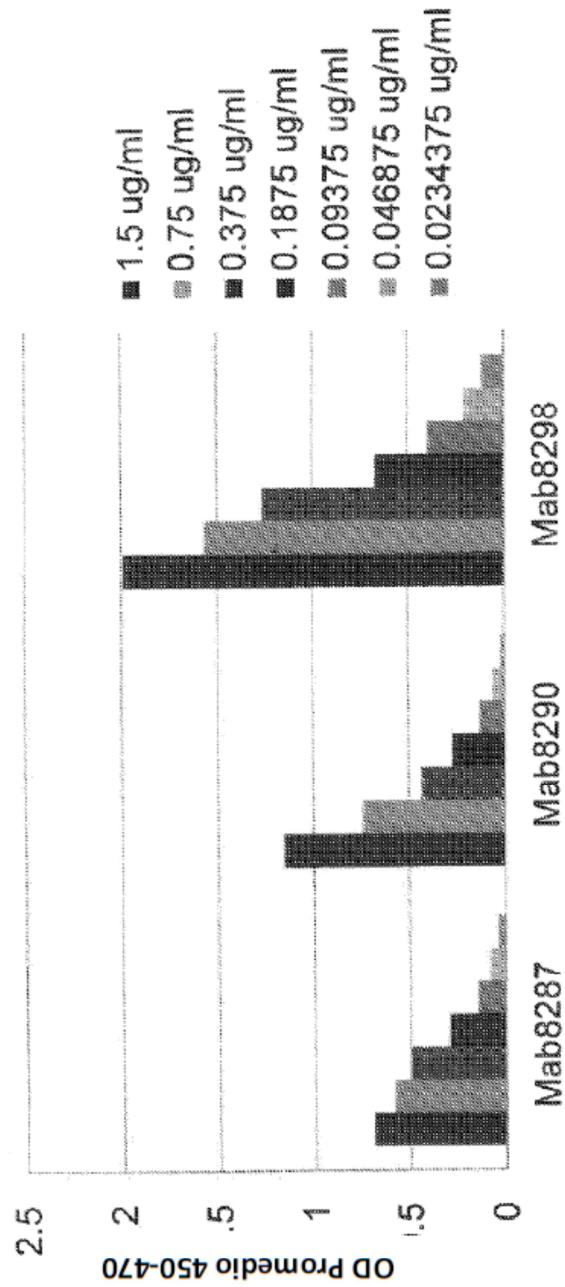
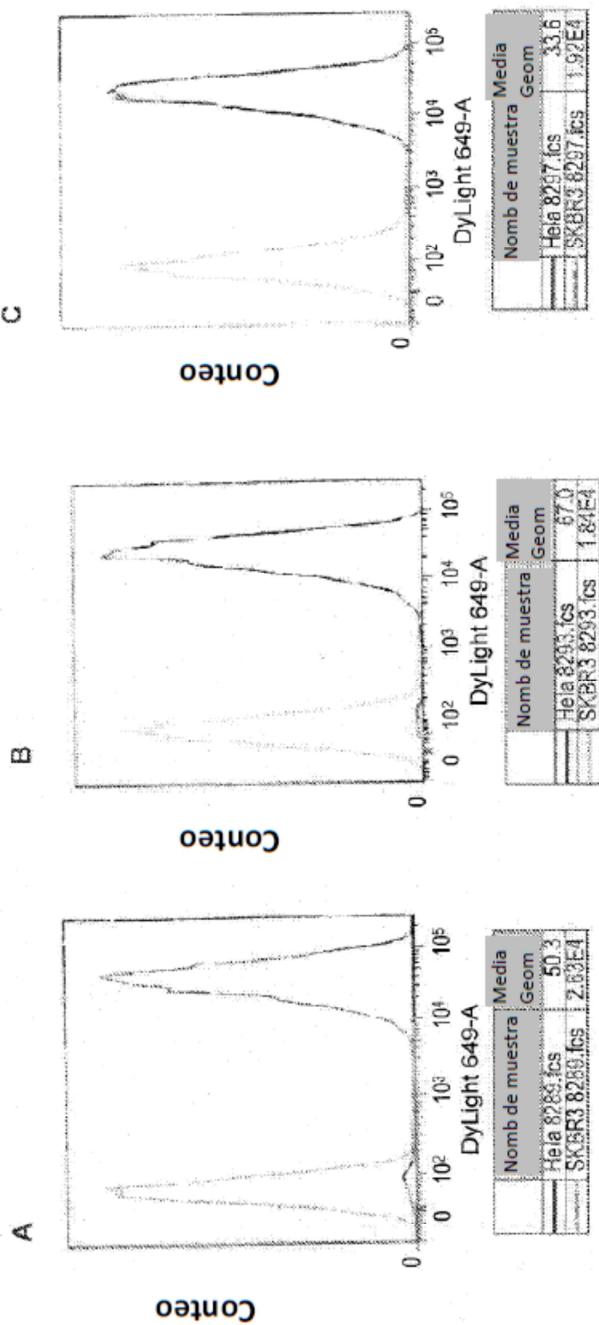


FIG. 30

**FIG. 31**