

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 081**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2018 PCT/US2018/061592**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2019 WO19099882**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2018 E 18878248 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3713964**

54 Título: **Una biblioteca de anticuerpos de presentación de ARNm y métodos**

30 Prioridad:

20.11.2017 US 201762588914 P

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

16.05.2024

73 Titular/es:

**NANTBIO, INC. (100.0%)
9920 Jefferson Boulevard
Culver City, California 90232, US**

72 Inventor/es:

OLSON, ANDERS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 969 081 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

Una biblioteca de anticuerpos de presentación de ARNm y métodos

Campo de la invención

5 El campo de la invención son las composiciones y métodos para bibliotecas de anticuerpos de diversidad ultraalta, especialmente en lo que se refiere a bibliotecas de presentación de ARNm y al uso de las bibliotecas de presentación de ARNm para generar aglutinantes recombinantes de alta afinidad.

Antecedentes de la invención

La descripción de antecedentes incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención.

10 Se ha demostrado que atacar antígenos tumorales o neoepítomos con anticuerpos específicos de alta afinidad o moléculas de unión es un método eficaz para tratar a pacientes con cáncer. A medida que se identifican cada vez más antígenos tumorales y/o neoepítomos específicos de pacientes y/o de cáncer *in vivo*, *in vitro* o *in silico* a través del análisis de datos ómicos, ha crecido la demanda para crear una biblioteca de anticuerpos o una biblioteca de presentación que proporcione altas probabilidades de seleccionar anticuerpos o aglutinantes que sean estables, solubles, funcionales y adaptables. Si bien se pueden identificar anticuerpos o moléculas de unión específicos de alta
15 afinidad entre grupos de anticuerpos naturales o derivados de ellos, dichos anticuerpos o aglutinantes naturales identificados o derivados pueden no ser eficaces o específicos ya que la diversidad de dichos anticuerpos naturales puede estar limitada dependiendo de la frecuencia o intensidad de la exposición a dichos antígenos o neoepítomos.

20 En un planteamiento para resolver dicho problema, se pueden utilizar bibliotecas de presentación en fagos recombinantes. Si bien este planteamiento permite la generación de bibliotecas con una diversidad razonablemente alta, a menudo se requieren muchas rondas de enriquecimiento para los aglutinantes, lo que requiere mucha mano de obra y tiempo. Además, a pesar de la diversidad relativamente grande, los aglutinantes tienden a tener afinidades y estabilidad inferiores a las ideales. Aún más, la diversidad suele estar limitada por consideraciones prácticas como el volumen de la biblioteca, la eficacia de la transfección, etc. Estos y otros planteamientos se pueden optimizar aún más, por ejemplo, utilizando múltiples presiones de selección artificial como se describe en el documento WO
25 2006/072773. Si bien dichos métodos pueden mejorar las características de estabilidad, se requieren cantidades significativas de tiempo y la manipulación de la biblioteca.

30 En otro planteamiento más, se puede realizar la presentación de ARNm. Aquí, las secuencias de ARNm que codifican moléculas de unión candidatas (típicamente scFv) se acoplan con una molécula de puromicina en su extremo 3', y los péptidos codificados por las secuencias de ARNm se generan mediante traslación *in vitro* para producir un producto de fusión que acopla el ARNm directamente a la proteína codificada por el ARNm. Sin embargo, aunque la tecnología actual de presentación de ARNm evita ventajosamente los problemas asociados con los límites de transfección y por lo menos conceptualmente permite una mayor diversidad, todavía persisten problemas con la integridad o estabilidad estructural, la afinidad relativamente baja y/o la reactividad cruzada. Para mejorar aún más por lo menos las características de unión seleccionadas de scFv a partir de la presentación de ARNm, se realizó un análisis de tipo
35 espectral en CDR3 de V_H (véase Protein Engineering, Design & Selection, 2015, vol. 28 núm. 10, págs. 427-435). Sin embargo, dicho proceso requirió un análisis iterativo y puede no ser productivo para todos los antígenos.

40 Así, aunque se conocen métodos para crear e identificar aglutinantes candidatos usando presentación de ARNm y otros métodos, las bibliotecas de alta diversidad con aglutinantes que tienen alta integridad/estabilidad estructural, baja afinidad y/o baja reactividad cruzada siguen siendo difíciles de alcanzar. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de composiciones, métodos y usos mejorados de bibliotecas de presentación de ARNm para la generación rápida de aglutinantes recombinantes estables de alta afinidad.

Compendio de la invención

45 El objeto de la invención está dirigido a diversas composiciones, métodos y uso de una biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad que codifica una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que permiten la identificación fiable y eficaz de anticuerpos o aglutinantes estables, solubles y funcionales contra diversas biomoléculas, y especialmente a antígenos o neoepítomos del cáncer. Así, un aspecto de la materia objeto incluye un método para generar una biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad que codifica una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. En este método, se generan o se proporcionan tres subbibliotecas: (1) una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H, (2) una pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y (3) una subbiblioteca de V_L, teniendo cada una, una
50 pluralidad de miembros. Cada miembro de las tres subbibliotecas comprende por lo menos un casete aleatorio que tiene una pluralidad de posiciones base degeneradas. Por lo menos porciones de por lo menos dos miembros de las tres bibliotecas se recombinan para formar un miembro de biblioteca de expresiones en una biblioteca de expresiones, que tiene una pluralidad de miembros de biblioteca de expresiones. Cada miembro de la biblioteca de expresiones codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo distinto. En una realización preferida, el miembro de la biblioteca de expresiones se transcribe en un fragmento de ARNm, que luego se acopla con una molécula de puromicina en el
55 extremo 3'.

5 En otro aspecto de la materia objeto de la invención, los autores de la invención contemplan una composición que tiene una pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos. La pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos incluye (1) una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H , (2) una pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y (3) una subbiblioteca de V_L . Cada una de las subbibliotecas (1)-(3) comprende una pluralidad de miembros y cada miembro de las subbibliotecas comprende por lo menos un casete aleatorio que tiene una pluralidad de posiciones base degeneradas.

En otro aspecto más de la materia objeto de la invención, los autores de la invención contemplan el uso de la composición anterior para generar una biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad.

10 En otro aspecto más de la materia objeto de la invención, los autores de la invención contemplan una composición de biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad que tiene una pluralidad de miembros de biblioteca. El miembro de la biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad incluye un ácido nucleico recombinante que comprende una pluralidad de casetes aleatorios, teniendo cada uno de ellos una pluralidad de posiciones de bases degeneradas. La pluralidad de casetes aleatorios se deriva de por lo menos dos miembros de cualquiera de las dos bibliotecas de las siguientes: (1) una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H , (2) una pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y (3) una subbiblioteca de V_L .

15 En otro aspecto más de la materia objeto de la invención, los autores de la invención contemplan el uso de la biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad para generar un anticuerpo terapéutico recombinante contra un neoepitopo del cáncer.

20 En otro aspecto más de la materia objeto de la invención, los autores de la invención contemplan un método para generar un anticuerpo recombinante. En este método, se generan o se proporcionan tres subbibliotecas: (1) una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H , (2) una pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y (3) una subbiblioteca de V_L , teniendo cada una, una pluralidad de miembros. Cada miembro de las tres subbibliotecas comprende por lo menos un casete aleatorio que tiene una pluralidad de posiciones base degeneradas. Por lo menos porciones de por lo menos dos miembros de las tres bibliotecas se recombinan para formar un miembro de biblioteca de expresiones en una biblioteca de expresiones, que tiene una pluralidad de miembros de biblioteca de expresiones. Cada miembro de la biblioteca de expresiones codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo distinto. A continuación, el método continúa generando el anticuerpo recombinante o fragmento del mismo usando el miembro de la biblioteca de expresiones.

En otro aspecto más de la materia objeto de la invención, los autores de la invención contemplan un fragmento de ácido nucleico recombinante generado usando un oligonucleótido seleccionado de la Tabla 1 o la Tabla 2 que se proporcionan a continuación.

30 En otro aspecto más del objeto de la invención, los autores de la invención contemplan una mezcla de ácidos nucleicos sintéticos que tiene una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de la Tabla 1 o la Tabla 2 que se proporcionan a continuación.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 ilustra una estrategia de aleatorización ejemplar que utiliza pares $VH3/Vk1$.
- 35 La figura 2 ilustra ubicaciones ejemplares para la aleatorización de secuencias en CDR1 y CDR2 de cadena pesada.
- La figura 3 ilustra una aleatorización de secuencia ejemplar en CDR3 de cadena pesada.
- La figura 4 ilustra una aleatorización de secuencia ejemplar en CDR3 de cadena ligera con secuencias de ácido nucleico a la izquierda y opciones de aminoácidos a la derecha.
- 40 La figura 5 ilustra una generación ejemplar de elementos de ácido nucleico híbridos aislando y combinando casetes aleatorios de múltiples segmentos de ácido nucleico recombinantes.
- La figura 6 muestra un resultado de cromatografía de exclusión por tamaño que muestra un único pico que indica una expresión proteica estable de $\alpha B7-H4_{801}$.
- 45 La figura 7 muestra datos de electroforesis capilar de dodecilsulfato de sodio (CE-SDS) que indican un comportamiento molecular parecido a $\alpha B7-H4_{801}$ en comparación con los anticuerpos comerciales.
- La figura 8 muestra gráficos que indican la unión de anticuerpos $\alpha B7-H4$ seleccionados *in vitro* a B7-H4.
- La figura 9 muestra gráficos de análisis funcional de aglutinantes de $\alpha B7-H4$ y aglutinantes de $\alpha PD-L1$ seleccionados *in vitro*.
- La figura 10 muestra gráficos que indican las afinidades de unión de $\alpha B7-H4$ scFv y $\alpha B7-H4$ IgG1.
- 50 La figura 11 muestra un ensayo de actividad de la IL-8 y su resultado midiendo los cambios en el tamaño de los neutrófilos.

La figura 12 muestra gráficos de barras que indican el efecto de neutralización del anticuerpo αIL-8 frente a la actividad de la IL-8 al aumentar el tamaño de los neutrófilos.

5 La figura 13 muestra el ensayo de actividad de la IL-8 y sus resultados mostrados en un gráfico de barras que indica el efecto de neutralización de un anticuerpo de la IL-8 frente a la actividad de la IL-8 mediante la inhibición de la migración de neutrófilos.

La figura 14 muestra resultados ejemplares utilizando composiciones de bibliotecas de presentación de ARNm presentadas en la presente memoria con respecto a dianas de antígenos seleccionadas.

10 La figura 15 muestra un gráfico ejemplar que representa las afinidades de aglutinantes seleccionados configurados como scFv frente a IgG donde los aglutinantes se identificaron usando composiciones de bibliotecas de presentación de ARNm presentadas en la presente memoria.

Descripción detallada

15 Los autores de la invención han descubierto que se pueden generar o identificar anticuerpos recombinantes específicos y eficaces o fragmentos de los mismos mediante la construcción de una biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad usando la diversificación dirigida de dominios seleccionados de los anticuerpos o fragmentos de los mismos codificados por miembros de la biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad. Para lograr dicho objetivo, los autores de la invención han descubierto que se pueden preseleccionar uno o más dominios o subdominios de anticuerpo/aglutinante y se pueden generar una pluralidad de subbibliotecas de ácidos nucleicos usando casetes aleatorios en un dominio o subdominio preseleccionado. Los autores de la invención descubrieron además que los miembros de las subbibliotecas se pueden recombinar para construir la biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad que permite una alta diversidad entre los miembros de la biblioteca, incluso proporciona mayores probabilidades de identificar anticuerpos/aglutinantes que sean estables, solubles, funcionales y adaptable cuando se usa *in vivo* contra los antígenos o neoepítomos del cáncer (preferiblemente neoepítomos o neoantígenos específicos del cáncer, específicos del paciente).

25 De hecho, y como se muestra con más detalle a continuación, las bibliotecas presentadas en la presente memoria permiten el aislamiento de por lo menos un aglutinante a cualquier antígeno arbitrario, típicamente en un enriquecimiento de paso único o de dos, donde el aglutinante tiene una Kd igual o menor que 100 nM y más típicamente igual o menor que 10 nM. Además, los sistemas y métodos contemplados permiten bibliotecas de scFv que tienen una diversidad de por lo menos 10⁹, por lo menos 10¹⁰, por lo menos 10¹¹, por lo menos 10¹², por lo menos 10¹³, por lo menos 10¹⁴, por lo menos 10¹⁵, o por lo menos 10¹⁶ miembros distintos de la biblioteca, todo ello en un período de tiempo significativamente reducido en comparación con la construcción de las bibliotecas convencionales. Así, debería tenerse en cuenta que la velocidad de detección de anticuerpos aumenta sustancialmente.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "tumor" se refiere y se usa de forma intercambiable con una o más células cancerosas, tejidos cancerosos, células tumorales malignas o tejido tumoral maligno, que pueden colocarse o encontrarse en una o más ubicaciones anatómicas en un cuerpo humano.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "unir" se refiere a, y puede usarse de forma intercambiable con el término "identificar" y/o "detectar", una interacción entre dos moléculas con una alta afinidad con una K_D igual o menor que 10⁻⁶M, o igual o menor que 10⁻⁷M.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "proporcionar" o "que proporciona" se refiere e incluye cualquier acción de fabricación, generación, colocación, habilitación para el uso o preparación para el uso.

40 Construcción de subbibliotecas de ácidos nucleicos

En general, los componentes estructurales (cadena pesada, cadena ligera, dominios constantes, dominios variables) de los anticuerpos están estrechamente relacionados con sus funciones. Por ejemplo, los dominios variables en la cadena pesada (V_H) y cadena ligera (V_L) constituyen, en conjunto, el dominio de unión al epítipo, que proporciona especificidad a los anticuerpos. Cada uno de los V_H y V_L Incluye tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR, CDR1-3) con secuencias de aminoácidos únicas basadas en su especificidad hacia un antígeno. Así, se había contemplado previamente que se puede crear una biblioteca de ácidos nucleicos recombinantes para generar o identificar anticuerpos aleatorizando las secuencias que codifican las CDR de V_H y V_L. Sin embargo, los autores de la invención encontraron que, si bien la aleatorización completa de todas las CDR de V_H y V_L puede proporcionar una gran diversidad a la biblioteca, también crea ineficacia al generar todas las combinaciones de secuencias aleatorias y cribar todas las combinaciones aleatorias ya que no todos los V_H y V_L aleatorios pueden ser solubles o expresarse de forma estable cuando se recombinan para formar un anticuerpo (p. ej., IgG1, etc.). Además, cubrir todo el espacio de diversidad no es práctico debido al número extremadamente grande de posibles miembros de la biblioteca.

55 Así, los autores de la invención contemplan que los subdominios de V_H y V_L se pueden dividir en dos categorías: una región marco que en general es común entre los V_H o V_L de diferentes anticuerpos (o genes que codifican los anticuerpos) y una región de diversificación dirigida que puede ser por lo menos parcial o completamente aleatorizada sin afectar significativamente la estabilidad y/o solubilidad del producto peptídico final (p. ej., scFv, IgG1, etc.).

Preferiblemente, la región de diversificación objetivo de V_H incluye por lo menos una porción de CDR1, CDR2-n (extremo N-terminal de CDR2), CDR2-c (extremo C-terminal de CDR2) y CDR3. En otros aspectos preferidos, la región de diversificación objetivo de V_L incluye por lo menos una porción de CDR3.

5 Como tal, en un aspecto ejemplar y especialmente preferido de la materia objeto de la invención, se puede crear una biblioteca de ácidos nucleicos al generar ácidos nucleicos recombinantes que incluyen uno o más casetes de secuencias aleatorias en una o más regiones de diversificación dirigida de V_H y/o V_L . En una realización preferida, los autores de la invención contemplan tres subbibliotecas diferentes que tienen diferentes conjuntos de casetes de secuencias aleatorias en diferentes regiones de diversificación objetivo de modo que cada subbiblioteca conserve la diversidad dentro de regiones de diversificación dirigida aleatorias al mismo tiempo que se evitan demasiadas secuencias recombinantes aleatorias en una única subbiblioteca que puede hacer que el volumen de la subbiblioteca única sea poco práctico o ineficaz para manejar cribados rápidos y puntuales. Además, las áreas conservadas entre las regiones de diversificación objetivo se seleccionan o diseñan para lograr la máxima estabilidad y solubilidad.

15 En una realización, las subbibliotecas incluyen una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H . La subbiblioteca de CDR1/2 de V_H comprende una pluralidad de ácidos nucleicos recombinantes (p. ej., ADN recombinante) que tienen uno o más casetes de secuencias aleatorias correspondientes a por lo menos una porción de CDR1 de V_H y/o una porción de CDR2 de V_H . Tal como se usa en la presente memoria, el casete aleatorio correspondiente a una porción de CDR1 de V_H significa que el casete aleatorio está ubicado en un área del ácido nucleico recombinante, en la que deben estar presentes secuencias que codifican la porción CDR1 para codificar una porción de dominio V_H que es por lo menos estructural o funcionalmente parecida a los dominios V_H de los anticuerpos naturales. Por ejemplo, los ácidos nucleicos recombinantes en una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H puede tener una estructura como la siguiente (la región aleatoria está subrayada y la región secuenciada fija está entre paréntesis):

5'- (Promotor -5' UTR - FW1) + CDR1 + (FW2) + CDR2 + (FW3 - CDR3 - FW4)

25 Tal como se usa en la presente memoria, UTR se refiere a una región no traducida y FW se refiere a una región marco (p. ej., FW1 es la primera región marco que puede ser distinta de la segunda región marco (FW2)). En esta estructura, los casetes de secuencias aleatorias se pueden insertar en áreas de CDR1 o CDR2, o preferiblemente, tanto CDR1 como CDR2. En algunas realizaciones, se pueden insertar más de un casete de secuencia aleatoria, preferiblemente dos casetes de secuencias aleatorias en el área de CDR2: CDR2-n (en el lado del extremo 5' de CDR2) y CDR-c (en el lado del extremo 3' de CDR2).

30 Las subbibliotecas también pueden incluir una pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H . Cada una de las subbibliotecas de CDR3 de V_H comprende una pluralidad de ácidos nucleicos recombinantes (p. ej., ADN recombinante) que tienen uno o más casetes de secuencias aleatorias correspondientes a por lo menos una porción de CDR3 de V_H . De forma parecida a la subbiblioteca CDR1/2 de V_H , los ácidos nucleicos recombinantes en la subbiblioteca CDR1/2 de V_H pueden tener una estructura como la siguiente (la región aleatoria está subrayada y la región secuenciada fija está entre paréntesis):

35 5'- (Promotor - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3) - CDR3 - (FW4)

40 Preferiblemente, las secuencias fijas (p. ej., Promotor - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3, FW4) de los ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H y/o la subbiblioteca CDR3 de V_H se seleccionan para utilizar las secuencias más comunes y/o conservadas entre los anticuerpos naturales (p. ej., IgG1 contra diversos antígenos) de modo que las secuencias fijas sean más expresables y adaptables a múltiples formatos, incluidos péptidos expresados como un fragmento variable de cadena única (scFv), una forma modificada de scFv, inmunoglobulina de longitud completa o una porción de inmunoglobulina. Así, en realizaciones preferidas, las secuencias fijas de los ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H y de los ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de CDR3 de V_H son por lo menos el 70 %, preferiblemente por lo menos el 80 %, más preferiblemente por lo menos el 90 % idénticas (compartidas) entre sí.

45 Las subbibliotecas también pueden incluir una subbiblioteca de V_L . La subbiblioteca de V_L comprende una pluralidad de ácidos nucleicos recombinantes (p. ej., ADN recombinante) que tienen uno o más casetes de secuencias aleatorias correspondientes a por lo menos una porción de CDR3 de V_L . De forma parecida a la subbiblioteca CDR1/2 de V_H , los ácidos nucleicos recombinantes en la subbiblioteca CDR1/2 de V_H pueden tener una estructura como la siguiente (la región aleatoria está subrayada y la región secuenciada fija está entre paréntesis):

50 5'- (Promotor - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3) - CDR3 - (FW4)

Preferiblemente, las secuencias fijas de los ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de V_L son por lo menos el 70 %, preferiblemente por lo menos el 80 %, más preferiblemente por lo menos el 90 % idénticas (compartidas) a las de los ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H o la subbiblioteca de CDR3 de V_H .

55 Si bien se puede considerar cualquier secuencia aleatoria para generar los casetes de secuencias aleatorias, los autores de la invención contemplan que los casetes de secuencias aleatorias estratificados para CDR1, CDR2, CDR3 del dominio V_H y CDR3 del dominio V_L producirían una alta complejidad y una gran superficie de unión potencial cuando se expresan como un péptido de unión (p. ej., scFv, etc.). Por ejemplo, los casetes de secuencias aleatorias

estratégicos para CDR1, CDR2 de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H pueden ser casetes de secuencias semialeatorias que tienen 3 o menos, preferiblemente 2 o menos, o más preferiblemente, una secuencia aleatoria (que codifica 3 o menos, 2 o menos, o un aminoácido aleatorio por casete) por casete. La ubicación de la secuencia aleatoria en el casete aleatorio puede variar dependiendo del aminoácido aleatorio en el casete. En otro ejemplo, los casetes de secuencias aleatorias estratificados para CDR3 de la subbiblioteca de CDR3 de V_H puede incluir más secuencias aleatorias de modo que 4 o más, preferiblemente 5 o más, o más preferiblemente 6 o más secuencias aleatorias (que codifican 4 o más, preferiblemente 5 o más, o más preferiblemente 6 o más aminoácidos aleatorios por casete) están presentes por casete. Aún en otro ejemplo, los casetes de secuencias aleatorias estratificados para CDR3 de la subbiblioteca de V_L puede incluir más secuencias aleatorias de modo que 4 o más, preferiblemente 5 o más, o más preferiblemente 6 o más aminoácidos aleatorios por casete) están presentes por casete.

En un aspecto especialmente preferido de la materia objeto de la invención, los autores de la invención contemplan que se pueden generar casetes de secuencias aleatorias preferidos para subbibliotecas usando los oligonucleótidos presentados en la Tabla 1 (para la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H y la subbiblioteca de CDR3 de V_H), y la Tabla 2 (para la subbiblioteca de V_L). Como se muestra en las Tablas 1 y 2, cada oligonucleótido incluye secuencias aleatorias (resaltadas) que tienen un código degenerado, que se muestra como códigos de ambigüedad IUPAC. Por ejemplo, un oligonucleótido para el casete de secuencia aleatoria CDR1 incluye una secuencia aleatoria "RVT", que representa "A/G,A/C/G,T", cuya combinación puede codificar uno de treonina (T), alanina (A), asparagina (N), ácido aspártico (D), serina (S) o glicina (G). La elección de los aminoácidos codificados por los codones degenerados se muestra a la derecha y se indica con una X.

Además, y preferentemente, los casetes de secuencias aleatorias para la subbiblioteca de CDR3 de V_H puede incluir secuencias de ácidos nucleicos de diferente longitud. Por ejemplo, los casetes de secuencias aleatorias para la subbiblioteca de CDR3 de V_H puede tener cualquier longitud entre 10 y 30 aminoácidos, preferiblemente entre 10 y 25 aminoácidos, más preferiblemente entre 10 y 20 aminoácidos. Así, como se muestra en la Tabla 1, los oligonucleótidos para generar el casete de secuencia aleatoria para la subbiblioteca de CDR3 de V_H puede incluir diversas repeticiones (p. ej., de 4 a 10 repeticiones) de "NNK" (que representa G/A/T/C, G/A/T/C, G/T) entre secuencias que codifican D/G-R/L y A/G (véase también la figura 3). La generación y diversidad de secuencias de cadena ligera se muestran a modo de ejemplo en la figura 4.

CDR1 de V _H	SEQ ID NO.1: GGCTTAGGTCTCATTTCRVTAGTTACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGT CTGAACGG	X=T,A,N,D,S,G
	SEQ ID NO.2: GGCTTAGGTCTCATTTCRVE TACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGT CTGAACGG	X=T,A,N,K,D,E, S,R,G
	SEQ ID NO.3: GGCTTAGGTCTCATTTC TAGTTACKKGATGCATTGGGCGAGACGAGGT CTGAACGG	X=G,W,L,V
	SEQ ID NO.4: GGCTTAGGTCTCATTTC TAGTTACWMTATGCATTGGGCGAGACGAGGT CTGAACGG	X=S,Y,T,N
	SEQ ID NO.5: GGCTTAGGTCTCATTTC TAGTTACGCTATGAVTTGGGCGAGACGAGGT CTGAACGG	X=S,T,N
CDR2-n de V _H	SEQ ID NO.6: GGCTTAGGTCTCGTTCATHCATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGA ACGG	X=Y,F,S
	SEQ ID NO.7: GGCTTAGGTCTCGTTC AVKTATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGA ACGG	X=V,G,I,S,L,R
	SEQ ID NO.8: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATT YGGGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGA ACGG	X=W,R
	SEQ ID NO.9:	X=Y,N,D+N53

ES 2 969 081 T3

	GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTDAATGGTAATGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.101: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTWMTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,S,T,N
	SEQ ID NO.11: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTKGGAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,G
	SEQ ID NO.12: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTGGIKKTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,S,N

CDR2-c de V _H	SEQ ID NO.13: GGCTTAGGTCTCGTGGARVKAGTACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,T,G,A,N,K,D,E
	SEQ ID NO.14: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGTNATACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,N,D,H
	SEQ ID NO.15: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGTRVAACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,K,R,E,A,G
	SEQ ID NO.16: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGTAGTACTVRETACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,N,S,H,R
CDR3 de V _H	SEQ ID NO.17: GGCTTAGGTCTCTCCGTGRTCKC(NNK) _n GSTTTCGCGAGACGAGGTCTGAACGG	(D,G)-(R,L)-(Xaa=4-10)-(A,G)

Tabla 1

CDR3 de V _L	SEQ ID NO.18: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVTDSGCCTTWC ACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	Q-X ₁ -X ₂ -X ₃ -X ₄ -P-X ₅ X ₁ =Y,D,L,A,H,S,F,R,T,W,G X ₂ =Y,N,D,S,T,A X ₃ =S,N,T,A,D,G X ₄ =Y,F,A,L,T,S,H,W,I,N,R,V,D,G X ₅ =L,Y,W,F,R
	SEQ ID NO.19: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTDSGCCTTWC ACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.20: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVTNWTCTTWC ACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.21: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTNWTCTTWC ACTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.22: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVTDSGCCTYKGA CTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.23: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTDSGCCTYKGA CTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	SEQ ID NO.23: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTDSGCCTYKGA CTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	

SEQ ID NO.24: GGCTTAGGTCTCTGCAGDSGDMTRVTNWTCTCTYKGA CTGAACGG
SEQ ID NO.25: GGCTTAGGTCTCTGCAGBWTDMTRVTNWTCTCTYKGA CTGAACGG

Tabla 2

- Lo más típico es que los oligonucleótidos presentados en las Tablas 1 y 2 se proporcionen en un ADN monocatenario, que puede convertirse usando ADN polimerasa I (fragmento de Klenow) en un fragmento de ADN bicatenario para insertarse así en un esqueleto que comprende la región secuenciada fija (p. ej., 5'-(Promotor - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3) - (FW4) para ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de V_L, etc.). Aun así, también se contempla que los oligonucleótidos presentados en las Tablas 1 y 2 también estén presentes con los oligonucleótidos complementarios para formar ácidos nucleicos bicatenarios sin utilizar enzimas polimerasas.
- En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes de las subbibliotecas también incluyen una secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta proteica de modo que el péptido codificado por los ácidos nucleicos recombinantes pueda aislarse usando el aglutinante contra la etiqueta proteica. Por ejemplo, la etiqueta de proteínas preferida incluye una etiqueta FLAG (con un motivo de secuencia DYKDDDDK), una etiqueta Myc (con un motivo de secuencia EQKLISEEDL) y una etiqueta HA. En algunas realizaciones, las etiquetas de proteínas se pueden repetir para fortalecer la señal o aumentar la detección (p. ej., tres repeticiones de la etiqueta FLAG (3× FLAG), etc.).
- Se contempla que algunos casetes de secuencias aleatorias insertados en los ácidos nucleicos recombinantes de las subbibliotecas pueden introducir cambios del marco, mutaciones sin sentido y secuencias que desestabilizan la estructura del péptido codificado por los ácidos nucleicos recombinantes. Así, en algunas realizaciones, los autores de la invención contemplan que los ácidos nucleicos recombinantes de las subbibliotecas se prueben *in vitro* de modo que cualquier ácido nucleico recombinante que codifique péptidos inestables o mal plegados pueda eliminarse de la biblioteca. Por ejemplo, los ácidos nucleicos recombinantes de las subbibliotecas CDR3 de V_H o la subbiblioteca de V_L se puede probar para determinar su afinidad de unión a la proteína A del *Staphylococcus aureus* o la proteína L del *Finogoldia magna*, que se une a epítomos estructurados del dominio V_H3 o el dominio V_L (Vk) de la inmunoglobulina independientemente de las secuencias CDR, respectivamente.
- Se contempla cualquier método adecuado para seleccionar los ácidos nucleicos recombinantes por sus afinidades de unión a la proteína A o la proteína L. En una realización ejemplar, los ácidos nucleicos recombinantes de subbibliotecas se transcriben en ARNm mediante transcripción *in vitro* y el extremo 3' de los ARNm están acoplados (unidos de forma covalente) a puomicina. Los ARNm acoplados a puomicina se traducen *in vitro* de modo que los péptidos transcritos a partir de los ARNm acoplados a puomicina se acoplan con los ARNm por medio de la puomicina. A continuación, los péptidos se ponen en contacto con la proteína A o la proteína L para identificar los péptidos que se unen eficazmente a la proteína A o la proteína L. Preferiblemente, los péptidos que se unen a la proteína A o la proteína L con una afinidad con una K_D igual o menor que 10⁻⁶M, preferiblemente igual o menor que 10⁻⁷M se seleccionan y se aíslan. Una vez que se aíslan los péptidos con alta afinidad a la proteína A o la proteína L, se pueden generar ADNc de los péptidos aislados por medio de la transcripción inversa *in vitro* de los ARNm acoplados con la puomicina y los péptidos. Los ADNc así generados de los péptidos aislados pueden insertarse luego como casetes de secuencias aleatorias para generar ácidos nucleicos recombinantes seleccionados de las subbibliotecas de CDR3 de V_H o la subbiblioteca de V_L. De forma alternativa, también se contempla que los ácidos nucleicos recombinantes de las subbibliotecas puedan estar presentes en forma de ARNm, que opcionalmente está preacoplado con una molécula de puomicina de modo que la etapa de transcripción *in vitro* de los ácidos nucleicos recombinantes (en formato de ADN) puede que no sea necesario.
- Construcción de la biblioteca scFv a partir de las subbibliotecas
- Los autores de la invención contemplan además que por lo menos dos ácidos nucleicos (miembros) recombinantes de las subbibliotecas pueden recombinarse para formar ácidos nucleicos scFv recombinantes. En una realización preferida, cada uno de los por lo menos dos ácidos nucleicos (miembros) recombinantes se selecciona de diferentes subbibliotecas. Por ejemplo, se puede seleccionar un ácido nucleico recombinante de cada uno de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H, la pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y la subbiblioteca de V_L. En otro ejemplo, se puede seleccionar un ácido nucleico recombinante de cada una de dos subbibliotecas de CDR1/2 de V_H, la pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y la subbiblioteca de V_L. Preferiblemente, por lo menos uno de, más preferiblemente todos, los ácidos nucleicos recombinantes seleccionados de las subbibliotecas se preseleccionan por medio de cribado de unión por afinidad como se describe anteriormente.
- Lo más habitual es que los ácidos nucleicos scFv recombinantes se puedan construir recombinando una porción de los ácidos nucleicos recombinantes de subbibliotecas. En esta realización, la porción de los ácidos nucleicos

5 recombinantes incluye los casetes de secuencias aleatorias insertados en los ácidos nucleicos recombinantes. Así, por ejemplo, como primera etapa, la porción de los ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H puede ser 5'-[CDR1 + (FW2) + CDR2]-3' (los casetes de secuencias aleatorias están subrayados), preferiblemente 5'-(porción de FW1)[CDR1 + (FW2) + CDR2]-3', más preferiblemente 5'- (Promotor -5' UTR - FW1) + CDR1 + (FW2) + CDR2 + (porción de FW3)-3' o 5'- (Promotor -5' UTR - FW1) + CDR1 + (FW2) + CDR2 + (una pequeña porción conectora)-3'. De forma similar, por ejemplo, la porción de los ácidos nucleicos recombinantes de las subbibliotecas de CDR3 de V_H puede ser 5'- [CDR3] - 3' (los casetes de secuencias aleatorias están subrayados), preferiblemente 5'- (porción de FW3) - CDR3 - (porción de FW4)-3', más preferentemente, 5'- (porción de FW3) -CDR3 - (FW4)-3', o 5'- (una pequeña porción conectora) - CDR3 - (FW4)-3'. A continuación, las porciones de los ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H y las subbibliotecas de CDR3 de V_H se aíslan (p. ej., mediante PCR) y se pueden recombinar (p. ej., fusionarlas por medio de métodos de restricción de ligamiento, generarse por medio de una PCR recombinante, etc.) para formar un ácido nucleico recombinante de dominio V_H . Así, típicamente, el ácido nucleico recombinante de dominio V_H estaría en una estructura de 5'- Promotor - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3 - CDR3 - FW4 -3' (los casetes de secuencias aleatorias están subrayados). Opcionalmente, el ácido nucleico recombinante de dominio V_H también puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta proteica (p. ej., etiqueta FLAG, etiqueta Myc, etiqueta HA, etc.) en su extremo 3' como se describe anteriormente. Además, dichos ácidos nucleicos recombinantes de dominio V_H se pueden colocar en una biblioteca de dominio V_H como miembros de la biblioteca del dominio V_H .

Los ácidos nucleicos recombinantes del dominio V_H así formados se pueden recombinar adicionalmente con ácidos nucleicos recombinantes de la subbiblioteca de V_L para formar los ácidos nucleicos scFv recombinantes. La figura 5 muestra un método ejemplar de recombinación de secuencias de subbibliotecas. Como se muestra, y también típicamente, una porción del ácido nucleico recombinante de dominio V_H y una porción del ácido nucleico recombinante de la subbiblioteca de V_L se fusionan en uno de los ácidos nucleicos scFv recombinantes. Por ejemplo, la porción del ácido nucleico recombinante de dominio V_H puede incluir 5'- Promotor - [5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3 - CDR3 - FW4 - 3' (preferiblemente sin ningún ácido nucleico que codifique una etiqueta proteica en su extremo 3'), y la porción del ácido nucleico recombinante de la subbiblioteca de V_L puede incluir FW1' + CDR1 + FW2' + CDR2 + FW3' - CDR3 - FW4' (sin promotor y 5'-UTR) de modo que el ácido nucleico recombinante de la subbiblioteca de V_L se puede fusionar con el extremo 3' de la porción del ácido nucleico recombinante de dominio V_H . Así, el ácido nucleico scFv recombinante típico estaría en una estructura de 5'- Promotor - [5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3 - CDR3 - FW4] V_H - [FW1' + CDR1 + FW2' + CDR2 + FW3' - CDR3 - FW4'] V_L -3'. Es muy preferido que la porción del ácido nucleico recombinante de dominio V_H y la porción del ácido nucleico recombinante de la subbiblioteca de V_L se estén situadas en el mismo marco de lectura de modo que codifiquen un único polipéptido.

Preferiblemente, la porción del ácido nucleico recombinante de dominio V_H y la porción del ácido nucleico recombinante de la subbiblioteca de V_L se fusionan mediante un ácido nucleico que codifica una porción conectora (un fragmento espaciador peptídico corto) entre dos porciones. Puede usarse cualquier longitud y orden adecuados de secuencia peptídica para la porción conectora o el espaciador. Sin embargo, se prefiere que la longitud del péptido de la porción conectora esté entre 3 y 30 aminoácidos, preferiblemente entre 5 y 20 aminoácidos, más preferiblemente entre 5 y 15 aminoácidos. Por ejemplo, los autores de la invención contemplan que se emplean secuencias ricas en glicina (p. ej., Gly-Gly-Ser-Gly-Gly, etc.) para proporcionar flexibilidad de scFv entre los dominios de V_H y V_L .

Opcionalmente, los ácidos nucleicos scFv recombinantes también pueden incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta proteica (p. ej., etiqueta FLAG, etiqueta Myc, etiqueta HA, etc.) en su extremo 3' como se describe anteriormente. Además, dichos ácidos nucleicos scFv recombinantes generados se pueden colocar en una biblioteca de expresiones como miembros de la biblioteca de expresiones.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos scFv recombinantes así formados se analizan y/o clasifican adicionalmente en función de sus afinidades de unión a uno o más ligandos de interés (p. ej., antígenos de cáncer, neopítopos, etc.), estabilidad, sensibilidad al pH y/o reactividad cruzada entre especies. Por ejemplo, la estabilidad de los péptidos scFv codificados por los ácidos nucleicos scFv recombinantes se puede analizar mediante cromatografía de exclusión por tamaño midiendo el tamaño del péptido a lo largo del tiempo. Por otro ejemplo, la sensibilidad al pH y la afinidad de unión de los péptidos scFv codificados por los ácidos nucleicos de scFv recombinantes se pueden analizar poniendo en contacto los péptidos scFv con uno o más ligandos en diferentes condiciones de tampón (pH, temperatura, etc.).

Para esos análisis y aislamiento adicional de los ácidos nucleicos scFv recombinantes deseados de la biblioteca de expresiones, los autores de la invención contemplan que los ácidos nucleicos scFv recombinantes pueden estar presentes en una forma de ARNm, que opcionalmente está preacoplado con una molécula de puromicina en el extremo 3' de los ARNm. Los ARNm acoplados a puromicina pueden luego traducirse *in vitro* de modo que los péptidos transcritos a partir de los ARNm acoplados a puromicina se acoplan con los ARNm por medio de la puromicina. A continuación, los péptidos se ponen en contacto con uno o más ligandos, opcionalmente en diferentes condiciones de tampón (pH, temperatura, etc.). Preferiblemente, los péptidos que se unen al ligando con una afinidad con una K_D igual o menor que $10^{-6}M$, preferiblemente igual o menor que $10^{-7}M$, pH entre 5,0 y 8,0, preferiblemente pH entre 6,0 y 8,0, más preferiblemente pH entre 6,5 y 8,0, se seleccionan y aíslan. Una vez que se aíslan los péptidos con alta afinidad al ligando o ligandos, se pueden generar ADNc de los péptidos aislados por medio de transcripción inversa *in vitro* de los ARNm acoplados con la puromicina y los péptidos.

5 Además, los ADNc así generados de los péptidos aislados codificados por ácidos nucleicos scFv recombinantes pueden injertarse y sustituirse en la porción de la inmunoglobulina para formar una inmunoglobulina recombinante o fragmentos de la misma. Por ejemplo, el ADNc así generado puede fusionarse con el esqueleto de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de modo que la región variable de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina pueda sustituirse con el scFv formado por el péptido aislado. De forma alternativa, los autores de la invención también contemplan que la porción de V_H (o derivada del ácido nucleico recombinante de dominio V_H) y la porción de V_L (o derivada del ácido nucleico scFv recombinante) de los ácidos nucleicos scFv recombinantes se puede injertar y sustituir en la porción de la inmunoglobulina para formar una inmunoglobulina recombinante o fragmentos de la misma. Por ejemplo, la porción de V_H (o derivada del ácido nucleico recombinante de dominio V_H) y una porción de V_L (o derivada del ácido nucleico scFv recombinante) de los ácidos nucleicos scFv recombinantes se fusiona con el esqueleto de la región constante de la cadena pesada o la región constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina, respectivamente, para formar una inmunoglobulina con regiones variables específicas del ligando deseado.

En estos ejemplos, se contempla que la inmunoglobulina puede incluir cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) y cualquier clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de cadena pesada o dominio constante para constituir diferentes tipos de inmunoglobulina. Además, el "anticuerpo" puede incluir, entre otros, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal. En este contexto, debería observarse que los sistemas y métodos contemplados permiten la generación de anticuerpos específicos de especie mediante el injerto de dominios de V_H y V_L aislados en el resto del anticuerpo de una especie deseada (p. ej., humana). En otro ejemplo, el ADNc así generado puede fusionarse con ácidos nucleicos que codifican otra porción de la inmunoglobulina para formar un fragmento de la inmunoglobulina. En este ejemplo, se contempla que el fragmento de la inmunoglobulina puede ser fragmentos Fab, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fv unidos por disulfuro (sdFv) y Fv. Los autores de la invención contemplan además que una porción del ADNc así generado puede fusionarse con ácidos nucleicos que codifican otra porción de la inmunoglobulina para formar cualquier fragmento que comprenda ya sea un segmento de V_H y/o un segmento de V_L.

Además, los autores de la invención contemplan que las porciones scFv también pueden usarse como entidades de direccionamiento para diversas proteínas y moléculas no proteicas. Por ejemplo, las porciones scFv pueden acoplarse (típicamente como proteína quimérica) a una molécula de tipo ALT-803 para formar una entidad TxM que tiene capacidad de direccionamiento específica (véase, por ejemplo, J. Biol Chem. 11 de noviembre de 2016; 291(46):23869-23881). En otro ejemplo, la porción scFv puede acoplarse a una proteína portadora (p. ej., albúmina) para permitir la administración específica de uno o más fármacos a una ubicación específica en un microambiente tumoral donde los fármacos están acoplados al excipiente.

Los autores de la invención contemplan además que mediante la construcción de las subbibliotecas por medio de la diversificación dirigida de secuencias aleatorias y/o la preselección de los miembros de las subbibliotecas, la biblioteca de expresiones puede lograr aproximadamente una complejidad de 10¹² con un sacrificio mínimo de la diversidad mediante la eliminación de secuencias inestables, no vinculantes o mal plegadas. Así, el planteamiento descrito anteriormente para generar una biblioteca de expresiones proporciona un tamaño significativo de complejidad de secuencia, pero es práctico para el cribado de aglutinantes/anticuerpos en un volumen pequeño. Además, el planteamiento descrito anteriormente para generar una biblioteca de expresiones simplificó el procedimiento de cribado de los aglutinantes/anticuerpos. Tradicionalmente, la validación *in vitro* de cualquier secuencia de ácido nucleico (p. ej., secuencias aleatorias) que codificara un dominio (o motivo) de unión requería que las secuencias de ácido nucleico se convirtieran en un dominio Fab, luego la afinidad de unión podía someterse a prueba por medio de un ensayo desplegable con el ligando de interés. Los métodos presentados en la presente memoria permiten la validación *in vitro* de secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio (o motivo) de unión mediante clasificación por afinidad (p. ej., valor K_d), sensibilidad al pH y reactividad cruzada entre especies (p. ej., mediante ensayo de resonancia de los plasmones superficiales, etc.) sin convertir las secuencias de ácido nucleico en el dominio F_{ab}. Además, la preselección de miembros de cada biblioteca en función de la estabilidad y la sensibilidad reduce el conjunto que se va a someter a prueba en la biblioteca, de modo que los dominios de aglutinantes/scFv/anticuerpos deseados se pueden identificar más rápida y eficazmente. Por lo tanto, los autores de la invención también contemplan métodos para el aislamiento de aglutinantes de alta afinidad (p. ej., con K_d nanomolar y picomolar) de un conjunto de alta diversidad usando técnicas de presentación de ARNm en las que los miembros de la biblioteca después de la traslación *in vitro* se seleccionan contra un antígeno unido a fase sólida. Una vez que se identifican los aglutinantes, se pueden caracterizar adicionalmente mediante espectroscopia de resonancia de los plasmones superficiales con respecto a la afinidad y las características de K_{on}/K_{off} como se describe con más detalle a continuación. Visto desde una perspectiva diferente, los sistemas y métodos contemplados permiten la detección rápida de aglutinantes y la generación de scFv o anticuerpos en un proceso que es completamente independiente de un sistema inmunitario *in vivo*.

60 Ejemplos

Si bien se puede contemplar cualquier esquema de diversificación adecuado para identificar regiones de diversificación dirigida para maximizar la diversidad al mismo tiempo que se mantiene la eficacia, los autores de la invención encontraron que VH3/Vk1 puede ser una de las buenas regiones candidatas para la aleatorización entre los diversos dominios de inmunoglobulina, el VH3 se considera de lejos el dominio V_H más estable y soluble, y el Vk1 de la cadena ligera es estable y soluble. Así, se contempla que los pares aleatorios VH3/Vk1 se convertirán en una inmunoglobulina de tamaño completo más eficazmente. En consecuencia, los autores de la invención desarrollaron una estrategia de

5 preselección utilizando los marcos VH3 y Vk1. La figura 1 muestra una estrategia de aleatorización ejemplar utilizando pares VH3/Vk1. Se comparan y se analizan secuencias de proteínas de por lo menos 14 moléculas de inmunoglobulina específicas de un antígeno. Las secuencias más estables y conservadas entre 14 moléculas de inmunoglobulina se usan como estructuras y se analizan el grado de aleatorización y los locos de secuencias variables para usarlas como secuencias aleatorias y el grado de aleatorización (p. ej., completamente aleatorio, parcialmente aleatorio, etc.).

10 Basándose en la estrategia de aleatorización, los autores de la invención generaron además secuencias diversificadas específicas (secuencias aleatorizadas, oligos aleatorios) para CDR1, CDR2-n, CDR2-c del dominio V_H (véase la figura 2) y para CDR3 de dominio V_H (véase la figura 3). El proceso de generación de ácidos nucleicos scFv recombinantes utilizando los oligos aleatorios de CDR1, CDR2-n, CDR2-c, CDR3 del dominio V_H, y CDR3 del dominio V_L se describe anteriormente y también se muestra en el diagrama esquemático de la figura 4. Se construyó una biblioteca de alta
15 diversidad como se muestra a modo de ejemplo en la figura 5 y se analizó con más detalle anteriormente.

Usando el esquema de diversificación dirigida y los métodos para generar ácidos nucleicos scFv recombinantes como se describe en las figuras 1-5, los autores de la invención generaron una biblioteca de alta diversidad y aislaron de ella un aglutinante de α-B7-H4₈₀₁ recombinante (α-B7-H4, número de clon 801). La estabilidad del α-B7-H4₈₀₁ recombinante se determinó mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño durante 15 minutos para evaluar cualquier degradación o deformación del anticuerpo. Como se muestra en la figura 6, el eluato de α-B7-H4₈₀₁ muestra un solo pico sin picos más pequeños significativos, lo que indica el aglutinante de α-B7-H4₈₀₁ generado mediante los métodos descritos anteriormente podría producir scFv o un anticuerpo con alta estabilidad.

Los autores de la invención encontraron que el recombinante α-B7-H4₈₀₁ comprende componentes de anticuerpo sustancialmente parecidos a otros anticuerpos α-B7-H4 disponibles comercialmente (Rituxan®, LEAF®). Los fragmentos del α-B7-H4₈₀₁ recombinante y dos anticuerpos α-B7-H4 disponibles comercialmente (Rituxan®, LEAF®) se analizaron por medio de electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio (CE-SDS). Como se muestra en la figura 7, la separación CE-SDS del anticuerpo B7-H4₈₀₁ recombinante y dos fragmentos de anticuerpos α-B7-H4 disponibles comercialmente (Rituxan®, LEAF®) muestran dos picos profundos, cada uno de los cuales corresponde a la cadena ligera (pico medio) y a la cadena pesada glicosilada (pico derecho). El pico izquierdo indica la ubicación de un marcador estándar de 10 Kd para el análisis CE-SDS.

Los autores de la invención encontraron además que diversos anticuerpos α-B7-H4 recombinantes pueden mostrar diferentes caracteres de unión (p. ej., afinidades, especificidades, etc.) al ligando diana. La figura 8 muestra dos anticuerpos α-B7-H4 recombinantes, α-B7-H4₈₀₁ y α-B7-H4₈₁₇ que se someten a prueba para determinar su unión con células 293T que expresan B7-H4, medidas con la intensidad de fluorescencia media (MFI). Los resultados muestran que los anticuerpos α-B7-H4₈₀₁ tienen una mayor afinidad de unión a las células 293T que expresan B7-H4 en comparación con los anticuerpos α-B7-H4₈₁₇, que indican dominios CDR aleatorizados de manera diferente, pueden generar diferentes afinidades de unión al ligando. Los paneles situados más a la derecha muestran el experimento de control con IgG1 humana no específica (hlgG1).

Los anticuerpos α-B7-H4 recombinantes se sometieron a prueba adicionalmente para determinar la unión específica y eficaz a los ligandos (B7-H4) expresados en las células presentadoras de antígeno (APC) mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 9, los anticuerpos α-B7-H4 recombinantes podrían unirse específicamente a ligandos B7-H4 (separando el pico de la unión de isotipo no específico), lo que indica que los anticuerpos α-B7-H4 recombinantes son completamente funcionales.

Los autores de la invención también encontraron que el péptido scFv frente al B7-H4 (scFv B7-H4₈₀₁) y los anticuerpos α-B7-H4 recombinantes (IgG α-B7-H4₈₀₁) generados por el mismo péptido scFv con el scFv B7-H4₈₀₁ son funcionalmente compatibles utilizando el ensayo de resonancia de los plasmones superficiales. En este ensayo, los scFv B7-H4₈₀₁ etiquetados con Flag se inmovilizan en la superficie por medio de un anticuerpo biotinilado con Flag, que se acopla con neutravidina unida a la superficie. A continuación, los péptidos scFv B7-H4₈₀₁ inmovilizados en la superficie se ponen en contacto con el analito que incluye B7-H4. Se realizó un ensayo parecido con anticuerpos α-B7-H4. Como se muestra en la figura 10 y la Tabla 3, el scFv B7-H4₈₀₁ e IgG α-B7-H4₈₀₁ muestran afinidades y características de unión sustancialmente parecidas al B7-H4, lo que indica que son funcionalmente compatibles. Además, como la afinidad vinculante del péptido traducido *in vitro* (scFv) se puede medir directamente sin inyectar el péptido en la estructura principal de un anticuerpo, se pueden cribar más ácidos nucleicos scFv recombinantes eficazmente en la biblioteca de expresiones.

	Ka	Kd	KD	Res sd
IgG	1,2e ⁶	2,0e ⁻⁴	175 pm	0,391
scFv	1,2e ⁶	1,7e ⁻⁴	141 pm	0,353

Tabla 3

55 Entre una pluralidad de péptidos scFv contra B7-H4 con diversos casetes de secuencias aleatorias en CDR1-3 de V_H y CDR3 de V_L, los autores de la invención examinaron si las similitudes en dominios específicos (casetes de secuencias aleatorias específicos) pueden hacer que los péptidos scFv tengan características de unión parecidas al

5 ligando. Se examinaron cinco péptidos scFv (801, 802, 905, 906 y 817) para determinar sus afinidades de unión al B7-H4. Entre ellos, como se muestra en la Tabla 4, cuatro péptidos scFv (clon 801, 802, 905, 906) tienen secuencias de CDR3 parecidas. Esos cuatro péptidos scFv que tienen casetes de secuencias aleatorias parecidas en la CDR3 de V_H muestran afinidades de unión parecidas al B7-H4 (como se muestra en la Tabla 5) tanto a 25 °C como a 37 °C, lo que indica que por lo menos en los péptidos scFv contra B7-H4, las secuencias en CDR3 de V_H pueden ser críticas en la unión con el ligando.

Clon	CDR1	CDR2	CDR3	CDR L3
801	NSYAMH (SEQ ID NO:26)	AISGNGGSTR (SEQ ID NO:27)	DRFRKVHG (SEQ ID NO:28)	DATFPL (SEQ ID NO:29)
802	GSYAMH (SEQ ID NO:30)	AISGSGGSTR (SEQ ID NO:31)	DLYRRVHG (SEQ ID NO:32)	DYGFPL (SEQ ID NO:33)
905	SSYLMH (SEQ ID NO:34)	VISGSGGSTR (SEQ ID NO:35)	DLYRRVAG (SEQ ID NO:36)	DYALPL (SEQ ID NO:37)
906	SNYAMH (SEQ ID NO:38)	AISGNGGSTH (SEQ ID NO:39)	DRFRRVYG (SEQ ID NO:40)	DYTFPL (SEQ ID NO:41)
817	SSYAIVIH (SEQ ID NO:42)	AISGSGGSTR (SEQ ID NO:43)	GRWSKWG (SEQ ID NO:44)	TDNFPY (SEQ ID NO:45)

Tabla 4

Temp.	scFv	ka	kd	KD
25 °C	801	1,20E+06	2,00E-04	174 pM
	802	4,50E+05	2,40E-05	54 pM
	905	4,10E+05	1,20E-04	290 pM
	906	1,70E+05	1,00E-05	59 pM
37 °C	801	6,10E+05	7,30E-04	1,2 nM
	802	5,70E+05	5,50E-04	1,0 nM
	905	5,80E+05	9,70E-04	1,7 nM
	906	2,80E+05	3,80E-04	1,4 nM

Tabla 5

15 Los autores de la invención también generaron una pluralidad de péptidos scFv que se unen a la interleucina-8 (IL-8) (scFv IL-8) usando las subbibliotecas y la biblioteca de expresiones, y examinaron la afinidad a la IL-8 en diferentes condiciones (temperaturas y pH). En la Tabla 6 se muestran ejemplos de péptidos scFv IL-8 y sus afinidades de unión medidas en diversas condiciones. Entre los clones mostrados en la Tabla 6, los clones 49-7, 49-1 y 49-12 contienen secuencias de CDR3 de V_H parecidas, y los clones 49-19, 49-37 y 49-25 contienen secuencias de CDR3 de V_H parecidas. Además, los clones 49-3 y 43-2 contienen secuencias de CDR3 de V_H parecidas. A diferencia de los péptidos scFv contra B7-H4, los autores de la invención encontraron que la afinidad de unión de los péptidos scFv IL-8 puede no depender críticamente de las similitudes en secuencias aleatorias de CDR3 de V_H. Por ejemplo, mientras los clones 49-18, 49-37 y 49-25 contienen secuencias de CDR3 de V_H parecidas, la afinidad de unión (unidad medida en K_D × 10⁻⁹ M) de esas secuencias varía entre 0,894 × 10⁻⁹ M y 25 × 10⁻⁹ M.

clon	recuento	25 °C	pH 6	25 °C	pH 6	37 °C
49-31	1/36	0,012	0,0025			
49-22	3/36	0,113	0,328			
49-7	1/36	0,166	0,462			
49-32	1/36	0,239	0,714			
49-34	1/36	0,618	0,342			
49-18	1/36	0,894	2,23			
49-3	4/36	1,26	6,68	2,14	3,14	9,19
43-2	5/16	1,41	1,3	0,79	0,96	0,89

49-37	1/36	1,46	4,01			
43-12	3/16	1,5	11,04			
49-10	6/36	1,65	8,58	2,21	8,7	3,45
49-1	1/36	2,66	6,13			
49-6	1/36	4,8	17,6			
49-12	3/36	10,1	11,9			
49-25	2/36	25	7,26			

Tabla 6

5

Los autores de la invención sometieron a prueba además si el scFv IL-8 puede captar eficazmente la IL-8 para neutralizar de ese modo el efecto de la IL-8 midiendo el tamaño de los neutrófilos. En general, los neutrófilos aumentan de tamaño (p. ej., tienen un diámetro mayor, etc.) tras ser estimulados por la IL-8 (como se muestra en la figura 11). Los autores de la invención encontraron que dicho efecto de la IL-8 sobre el agrandamiento de los neutrófilos podría eliminarse en gran medida tras la adición del anticuerpo α -IL-8 recombinante (mAb α IL-8₂₀₁, como se muestra en la figura 12, gráfico superior izquierdo) o varios péptidos scFv IL-8 (α IL-8_{#2}, α IL-8₄₉₋₃, α IL-8₄₉₋₁₀, como se muestra en la figura 12, gráficos de la parte inferior), lo que indica que los péptidos scFv IL-8 podrían neutralizar eficazmente el efecto de la IL-8 uniéndose a la IL-8 libre en los medios.

10

La IL-8 es un factor quimiotáctico de los neutrófilos que hace que los neutrófilos migren hacia el sitio de liberación de la IL-8 (p. ej., el sitio de la infección). Para evaluar el efecto funcional de los péptidos scFv IL-8, se colocaron neutrófilos en la parte inferior del inserto que tenía una membrana porosa y se colocaron en medios que incluían diversas concentraciones de la IL-8 de modo que los neutrófilos atraídos por la IL-8 pudieran transmigrar fuera del inserto a través de la membrana porosa hacia los medios. Como se muestra en la figura 13, el número de neutrófilos migrados aumentó al aumentar la concentración de la IL-8 en los medios. Curiosamente, dicho efecto de la IL-8 se ha abolido casi por completo tras la adición del péptido scFv IL-8 (α IL-8₄₃₋₂) o el anticuerpo IL-8 recombinante derivado de un péptido scFv IL-8 (mAb α IL-8₂₀₁).

15

20

La figura 14 representa datos experimentales adicionales para una variedad de scFv aislados utilizando la biblioteca de presentación de ARNm tal como se presenta en la presente memoria. Más específicamente, cada punto de datos representa un scFv para la diana indicada en la parte inferior y se determinaron los valores de afinidad para cada scFv. Como se puede ver fácilmente, la (misma) biblioteca produjo múltiples aglutinantes de alta afinidad para una variedad de dianas distintas, con todos los aglutinantes en el intervalo de afinidad submicroM y muchos en el intervalo de afinidad subnanoM. Además, los autores de la invención también estudian si la afinidad de los scFv podría conservarse tras el injerto de CDR en una IgG humana. La figura 15 representa resultados ejemplares de 29 experimentos de injerto de CDR para scFv seleccionados que se injertaron en una estructura de IgG1 humana. Como se puede observar en los resultados de la figura 15, los anticuerpos IgG1 humanizados conservaron una alta especificidad y afinidad (típicamente dentro de un orden de magnitud).

25

30

En particular, los términos "comprende" y "que comprende" deben interpretarse como referidos a elementos, componentes o etapas de manera no exclusiva, indicando que los elementos, componentes o etapas a los que se hace referencia pueden estar presentes, utilizados o combinados con otros elementos, componentes o etapas a los que no se hace referencia expresamente. Tal como se utiliza en la descripción de la presente memoria y en las reivindicaciones siguientes, el significado de "un", "una" y "el" incluye una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, tal como se utiliza en la descripción de la presente memoria, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cuando las reivindicaciones de la memoria descriptiva se refieren a por lo menos uno de algo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C... y N, el texto debe interpretarse como que requiere solo un elemento del grupo, no A más N, o B más N, etc.

35

40

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad que codifica una pluralidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, en el que los miembros de dicha biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad comprenden cada uno de forma independiente una pluralidad de casetes aleatorios derivados de (1) una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H, (2) una pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y (3) una subbiblioteca de V_L, en el que cada uno de dichos casetes aleatorios tiene independientemente una pluralidad de posiciones base degeneradas, comprendiendo el método:

generar o proporcionar (1) la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H, (2) la pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y (3) la subbiblioteca de V_L, en la que cada una de las subbibliotecas (1)-(3) comprende una pluralidad de miembros;

en el que cada miembro de las subbibliotecas comprende por lo menos uno de dichos casetes aleatorios que tiene una pluralidad de posiciones base degeneradas; y

recombinar por lo menos porciones de por lo menos dos miembros de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H, la pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y la subbiblioteca de V_L para formar un miembro de la biblioteca de expresiones en una biblioteca de expresiones, en el que la biblioteca de expresiones comprende una pluralidad de miembros de la biblioteca de expresiones, codificando cada miembro de la biblioteca de expresiones un anticuerpo o fragmento de anticuerpo distinto.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:

(i) la pluralidad de miembros de las subbibliotecas tiene secuencias comunes; o

(ii) el anticuerpo o fragmento de anticuerpo distinto comprende un scFv

y, opcionalmente, el método comprende además subclonar el miembro de la biblioteca de expresiones para construir una IgG1 que tiene el scFv;

(iii) el procedimiento además comprende:

transcribir el miembro de la biblioteca de expresiones en un fragmento de ARNm, y

acoplar una molécula de puromicina en el extremo 3' del fragmento de ARNm.

3. Un método para generar un anticuerpo recombinante, que comprende el método de la reivindicación 1 y además la etapa de:

generar el anticuerpo recombinante o fragmento del mismo usando el miembro de la biblioteca de expresiones.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que:

(i) el anticuerpo recombinante o fragmento del mismo se genera subclonando el miembro de la biblioteca de expresiones en un vector de anticuerpo que, opcionalmente, comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un dominio constante de IgG1 humana,

(b) un dominio constante de IgG2 humana,

(c) un dominio constante de IgG3 humana,

(d) un dominio constante de IgG4 humana, y

(e) un dominio constante de IgA humana; o

(ii) el anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona entre un grupo que consiste en:

(a) una molécula de inmunoglobulina completa,

(b) un scFv,

(c) un anticuerpo monoclonal,

(d) un anticuerpo humano,

(e) un anticuerpo humanizado,

(f) un anticuerpo quimérico,

- 5 (g) un fragmento Fab,
- (h) un fragmento Fab',
- (i) un F(ab')₂,
- (j) un Fv, y
- (k) un Fv unido por disulfuro.

10 5. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que:

- (i) cada uno de los miembros de la biblioteca de expresiones comprende una pluralidad de casetes aleatorios; o
- (ii) la recombinación comprende aislar por lo menos porciones de los miembros de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H y una de la pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y fusionarlos para formar un miembro de la biblioteca de dominio V_H en una biblioteca de dominio V_H,

15 en el que la biblioteca de dominio V_H comprende una pluralidad de miembros de la biblioteca de dominio V_H,

y, opcionalmente, el método comprende además aislar por lo menos una porción del miembro de la subbiblioteca de V_L y fusionar la porción del miembro de la subbiblioteca de V_L con uno de los miembros de la biblioteca de dominio V_H para formar el miembro de la biblioteca de expresiones, en el que, preferiblemente, la porción del miembro de la subbiblioteca de V_L está acoplada mediante una secuencia que codifica una porción conectora, en particular una porción conectora que es un péptido rico en glicina; o

20 (iii) la recombinación comprende aislar por lo menos porciones de los miembros de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H y una de la pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y fusionarlas para formar un primer grupo de miembros de la biblioteca de expresiones.

y, opcionalmente, el método comprende además un segundo grupo de miembros de la biblioteca de expresiones, en el que el segundo grupo comprende por lo menos porciones de los miembros de la subbiblioteca de V_L; y, preferiblemente, comprende además subclonar un miembro de cada uno de los grupos primero y segundo para formar una IgG1 que tiene un dominio V_H y un dominio V_L recombinantes; o

25 (iv) el método de la reivindicación 1, que comprende además seleccionar un subconjunto de los miembros de la biblioteca de expresiones basándose en por lo menos uno de los siguientes: afinidad por un ligando, sensibilidad al pH y reactividad cruzada entre especies,

y, opcionalmente, comprende además seleccionar un subconjunto de los miembros de la biblioteca de expresiones que codifican scFv que se unen al ligando a una K_d inferior a 50 nM.

6. Una composición que tiene una pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos, que comprende:

35 (1) una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H, (2) una pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y (3) una subbiblioteca de V_L;

en el que cada una de las subbibliotecas (1)-(3) comprende una pluralidad de miembros; y

en el que cada miembro de las subbibliotecas comprende por lo menos un casete aleatorio que tiene una pluralidad de posiciones base degeneradas.

7. La composición de la reivindicación 6, en el que:

40 (i) la composición comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción conectora peptídica flexible; o

(ii) por lo menos una de las subbibliotecas (1)-(3) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción conectora peptídica flexible; o

45 (iii) una primera de la pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H tienen una longitud que es diferente de una segunda de la pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H; o

(iv) la pluralidad de posiciones base degeneradas es por lo menos dos posiciones base degeneradas; o

50 (v) la composición comprende además una biblioteca de dominio V_H que tiene una pluralidad de miembros de la biblioteca de dominio V_H, en el que cada uno de los miembros de la biblioteca de dominio V_H incluye por lo menos una porción de un miembro de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H y por lo menos una porción de un miembro de una de las subbibliotecas de CDR3 de V_H.

- 5 8. Una composición de biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad que tiene una pluralidad de miembros de biblioteca, en la que cada miembro de biblioteca comprende:
- un ácido nucleico recombinante que comprende una pluralidad de casetes aleatorios, teniendo cada uno una pluralidad de posiciones de bases degeneradas;
- 10 en el que la pluralidad de casetes aleatorios se deriva de por lo menos dos miembros de cada uno de (1) una subbiblioteca de CDR1/2 de V_H , (2) una pluralidad de subbibliotecas de CDR3 de V_H y (3) una subbiblioteca de V_L ; y
- en el que cada una de las subbibliotecas comprende una pluralidad de miembros.
9. La composición de la reivindicación 8, en el que:
- 15 (i) la pluralidad de miembros de la biblioteca comprende una porción conectora entre dos de la pluralidad de casetes aleatorios; o
- (ii) cada miembro de la biblioteca codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo distinto; o
- (iii) la pluralidad de miembros de la biblioteca se clasifica basándose en por lo menos uno de los siguientes: afinidad por un ligando, sensibilidad al pH y reactividad cruzada entre especies; o
- 20 (iv) los miembros de la biblioteca son fragmentos de ARNm, cada uno de los cuales está acoplado con puromicina en el extremo 3'.
10. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o la composición de la reivindicación 6 o la reivindicación 8, en el que:
- (i) la pluralidad de miembros de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H comprende un casete aleatorio correspondiente a por lo menos uno de: una porción de CDR1 de V_H y una porción de CDR2 de V_H ; o
- 25 (ii) la pluralidad de miembros de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H comprende una pluralidad de casetes aleatorios correspondientes a por lo menos uno de: una porción de CDR1 de V_H y una porción de CDR2 de V_H , preferiblemente a por lo menos la porción de CDR2 de V_H ; o
- (iii) la pluralidad de miembros de las subbibliotecas de CDR3 de V_H comprende un casete aleatorio correspondiente a por lo menos una porción de CDR3 de V_H ; o
- 30 (iv) por lo menos dos casetes aleatorios de miembros de las subbibliotecas de CDR3 de V_H codifican péptidos con diferentes longitudes, preferiblemente en un intervalo de 10-20 aminoácidos; o
- (v) la pluralidad de miembros de la subbiblioteca de V_L comprende un casete aleatorio en una porción de CDR3 de V_H .
11. El método de la reivindicación 3, o la composición de la reivindicación 6 u 8, en el que la pluralidad de miembros de las subbibliotecas comprende una secuencia consenso.
- 35 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los casetes aleatorios comprendidos por los miembros de la subbiblioteca de CDR1/2 de V_H se han generado usando oligonucleótidos seleccionados entre los establecidos en la SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:16, los casetes aleatorios comprendidos por los miembros de las subbibliotecas de CDR3 de V_H se han generado utilizando oligonucleótidos seleccionados entre los establecidos en la SEQ ID NO:17, y los casetes aleatorios comprendidos por los miembros de la subbiblioteca de V_L se han generado utilizando oligonucleótidos seleccionados entre los establecidos en la SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO:25.
- 40 13. Uso de la composición que tiene una pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 y 10 a 12 para generar una biblioteca de ácidos nucleicos de alta diversidad.

POS#	tipo VH	CDR1	CDR2	CDR43	longitud H3	tipo k	CDRL2	k55
396c	3-24	FNFSSYVMM	SAISSDGETY	RNYNAFOY	14	k1-30	QQYQMLGQLSF	Q55
429	3-20	FQFSHYAMN	AVISYDGETY	RNSYGMDOY	14	k1-33	QQYQNLPLTF	Q55
428b	3-11	FSLSLYYMM	AVISSSSCYN	RNSDGYNNH	12	k1-33	QQYQKLPTF	Q55
193m	3-23	FTFNIFYMS	SCWFGSGGNTD	KHLYTGFDS	12	k1-30	QQYQNLPLTF	Q55
168b	3-9	FTFMZYAMH	SSISWSSSSG	KQNDVAFQI	17	k1-6	QQYMSYSP	Q55
468s	3-20	FTFSSYGMH	AVMYTDSNKD	RNDYGLDQY	10	k1-17	LQMSNPALTF	Q55
418y	3-13	FTFSSQDMH	GGTAGACTY	RNYKGMDOY	14	k1-5	KQYADYN-TF	Q55
146e	3-30	FTFSCYGMH	ALISYDSEKTY	KVVFAPNDY	12	k1-30	QQYSAPARTF	Q55
2-58	3-23	FTFRMHGNT	ASLSSGSKNTH	KAMRQYEDL	12	k1-10	QQYHSYPAVTF	Q55
282b	3-43	FTFSTFSRN	SYISRTSKTY	RGSYFQY	6	k1-30	QQYVMPMTF	Q55
103j	3-30	FTFSSYAMH	AVISDGGNKY	RGNP-GKSDY	14	k1-33	QDMSHW-TF	Q55
499b	3-20	FTFRNYATH	ALISYDGGNKY	RNLGGMDOY	13	k1-12	QQMSFFLTF	Q55
30x	3-30	FTFRNYAMH	ALIKYDGRNKY	RNSYQFDY	19	k1-33	QQYQNLPLTF	Q55
462z	3-20	FTFQSYATH	AFISYNGSSSKY	RAPO-QAFOY	18	k1-20	QNYDDFPMSF	A65
Esquema de aleatorización:		FTFSSYVMS	SAISSDGETY	RNSHW-SEY	10-15	k1-33	QQYQNLPLTF	Q55

Consenso de línea germinal VH3/entropía de secuencia

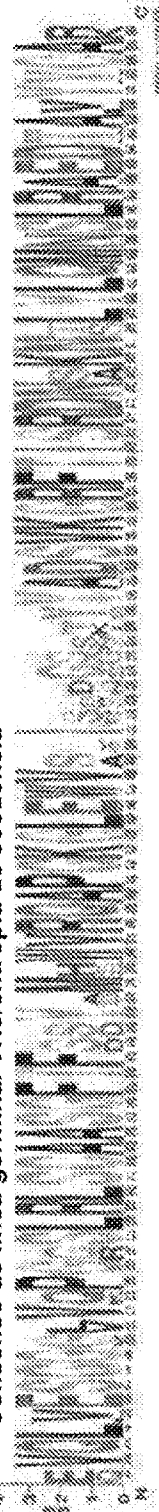
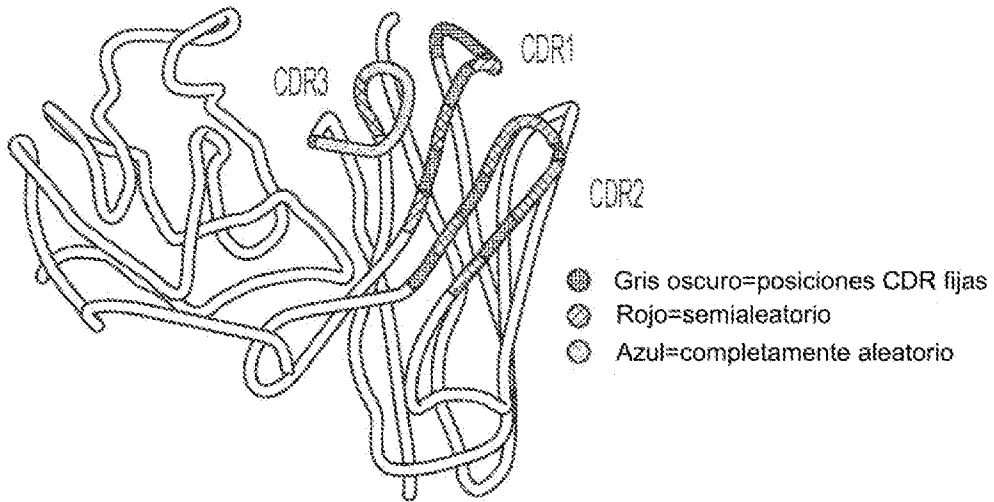


Fig. 1



CDR1 y 2

	GGCTTA GGTCTC A TTTC RVT AGTTAAGCTATGCAAT TGGG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=TANDGG
	GGCTTA GGTCTC A TTTC TCT SVKFAAGCTATGCAAT TGGG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=TANKDESRG
• CDR1	GGCTTA GGTCTC A TTTC TCT ACTTAA TKG ADGCAAT TGGG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=GNLV
	GGCTTA GGTCTC A TTTC TCT AGTTA MT ADGCAAT TGGG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=SYTN
	GGCTTA GGTCTC A TTTC TCT AGTTA GC TAUG AVT TGGG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=STN
	GGCTTA GGTCTC G TTCA THC TTAGTGGTAGTGGCA C GAGACG AGGCTCGAACGG X=YFS
	GGCTTA GGTCTC G TTCA VXT ATYAGTGGTAGTGGCA C GAGACG AGGCTCGAACGG X=VGISLR
• CDR2-n	GGCTTA GGTCTC G TTCA GCT ATTY GG GTAGTGGCA C GAGACG AGGCTCGAACGG X=WR
	GGCTTA GGTCTC G TTCA GCT ATTD AT GGTAATGGCA C GAGACG AGGCTCGAACGG X=YND-N53
	GGCTTA GGTCTC G TTCA GCT ATT AGT GGTAGTGGCA C GAGACG AGGCTCGAACGG X=YSTN
	GGCTTA GGTCTC G TTCA GCT ATT AGT KGGAGTGGCA C GAGACG AGGCTCGAACGG X=WC
	GGCTTA GGTCTC G TTCA GCT ATT AGT GCT ERT GGCA C GAGACG AGGCTCGAACGG X=DGSN
	GGCTTA GGTCTC G TCGA EYK AGTACTTAC TACG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=STCANKDE
• CDR2-c	GGCTTA GGTCTC G TCGA GG INATACTTAC TACG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=YNDH
	GGCTTA GGTCTC G TCGA GG IRVACTTAC TACG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=TKREAG
	GGCTTA GGTCTC G TCGA GG TAGTAC IVYH TACG C GAGACG AGGCTCGAACGG X=DGNSHR

TCAGCTATTAGTGGTAGTGGAGGTTAGTACTTACTAC
 210 220 230 240

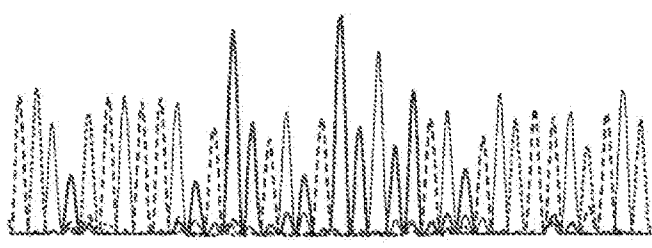


Fig. 2

Productos de PCR secuenciados de 7 bibliotecas de scFV
 construidas a partir de regiones preseleccionadas

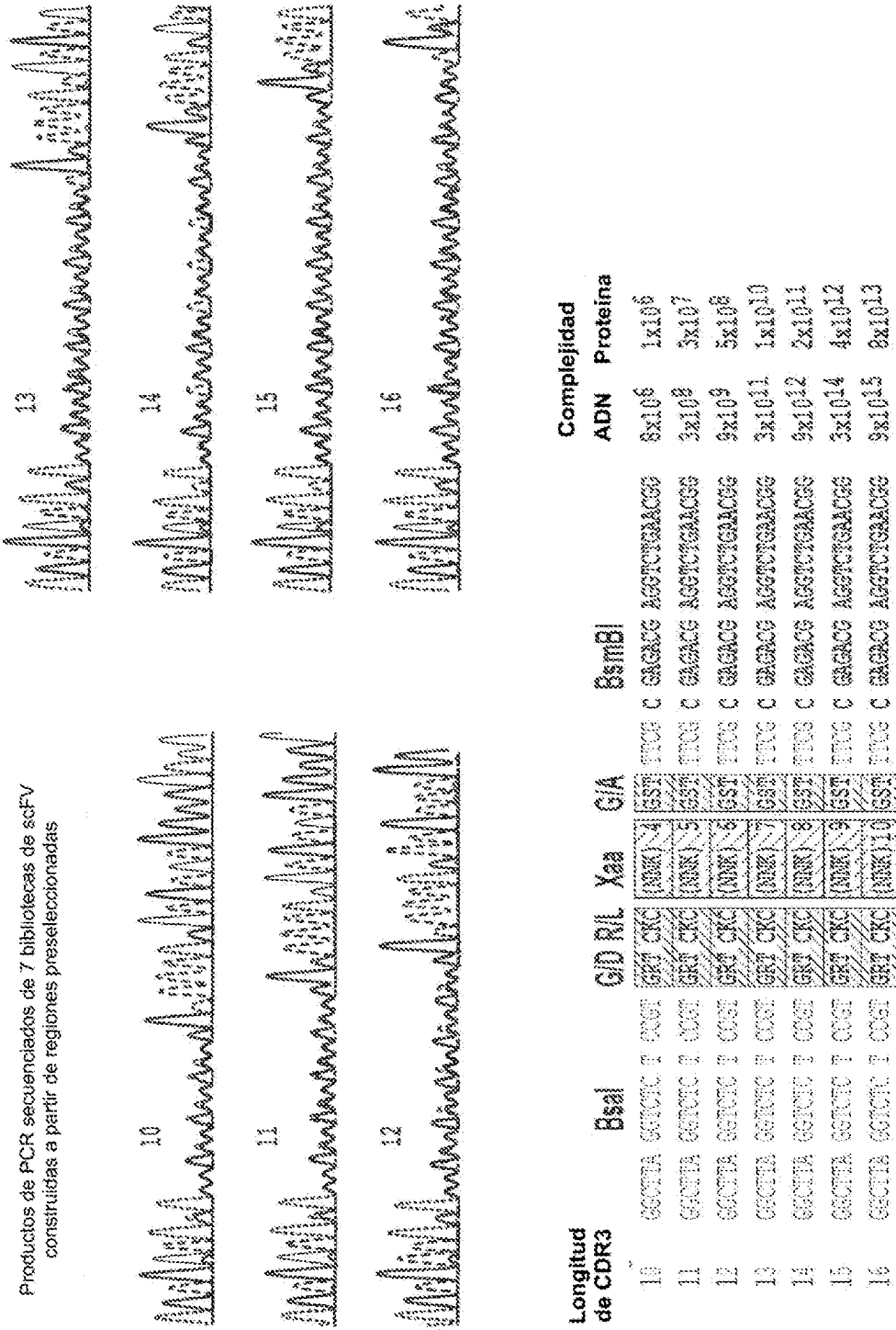


Fig. 3

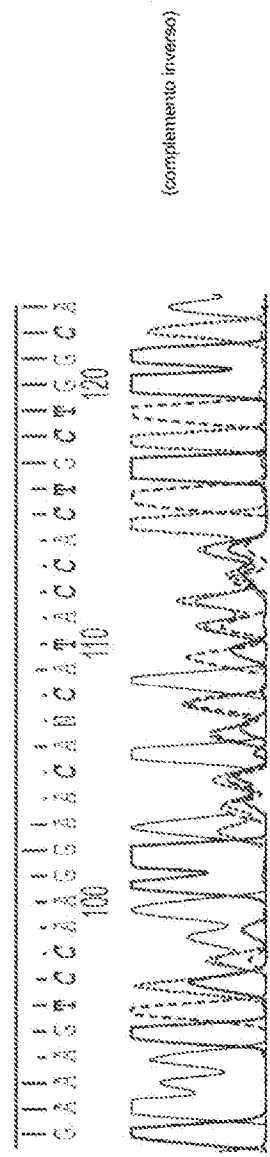
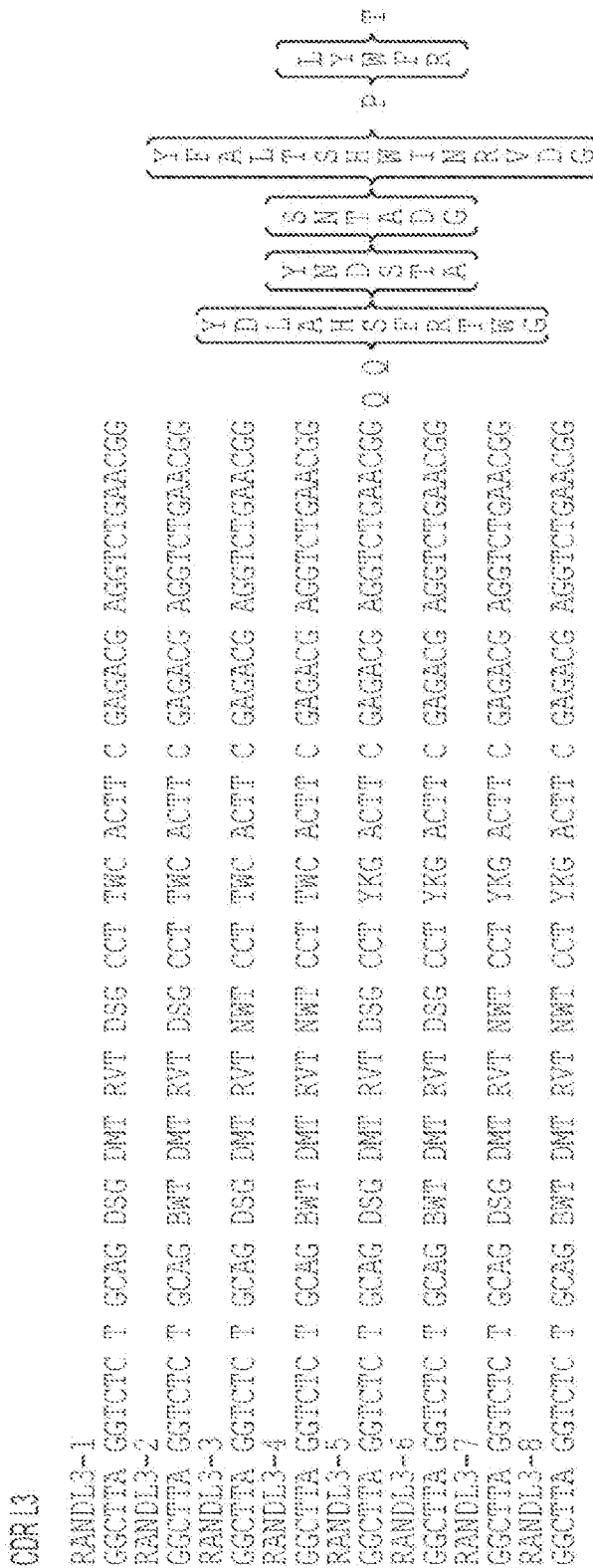


Fig. 4

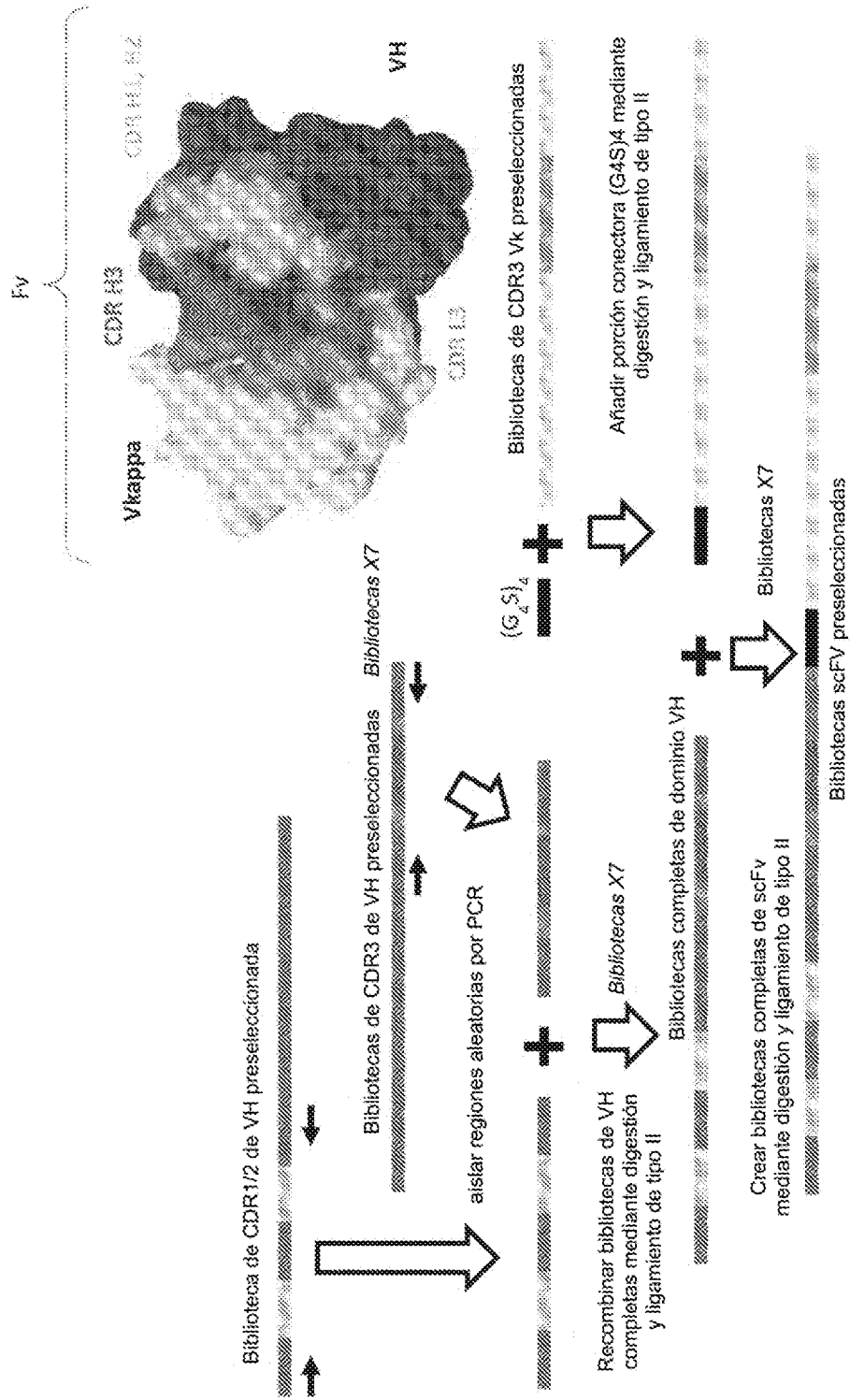
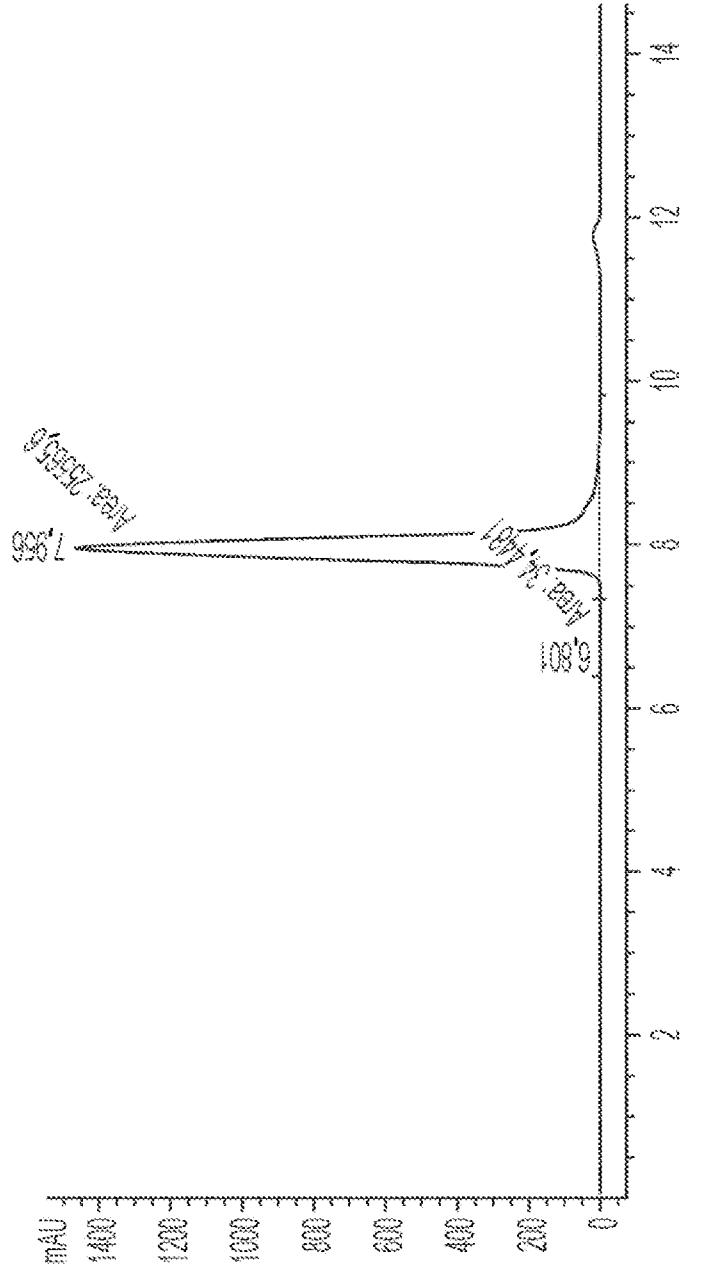


Fig. 5

DAD1 B, Sig=214.4 Ref=360, 100 (MGUIDO ANTIBODIES ANDERS 071417MSG071417-MSG 1002-1001.D)



PICO #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Area [mAU*s]	Altura [mAU]	Area %
1	6,719	MF	0,4504	49,97571	1,84921	0,1062
2	7,911	FM	0,3160	2,478,48833	2,478,48833	99,8938

Fig. 6

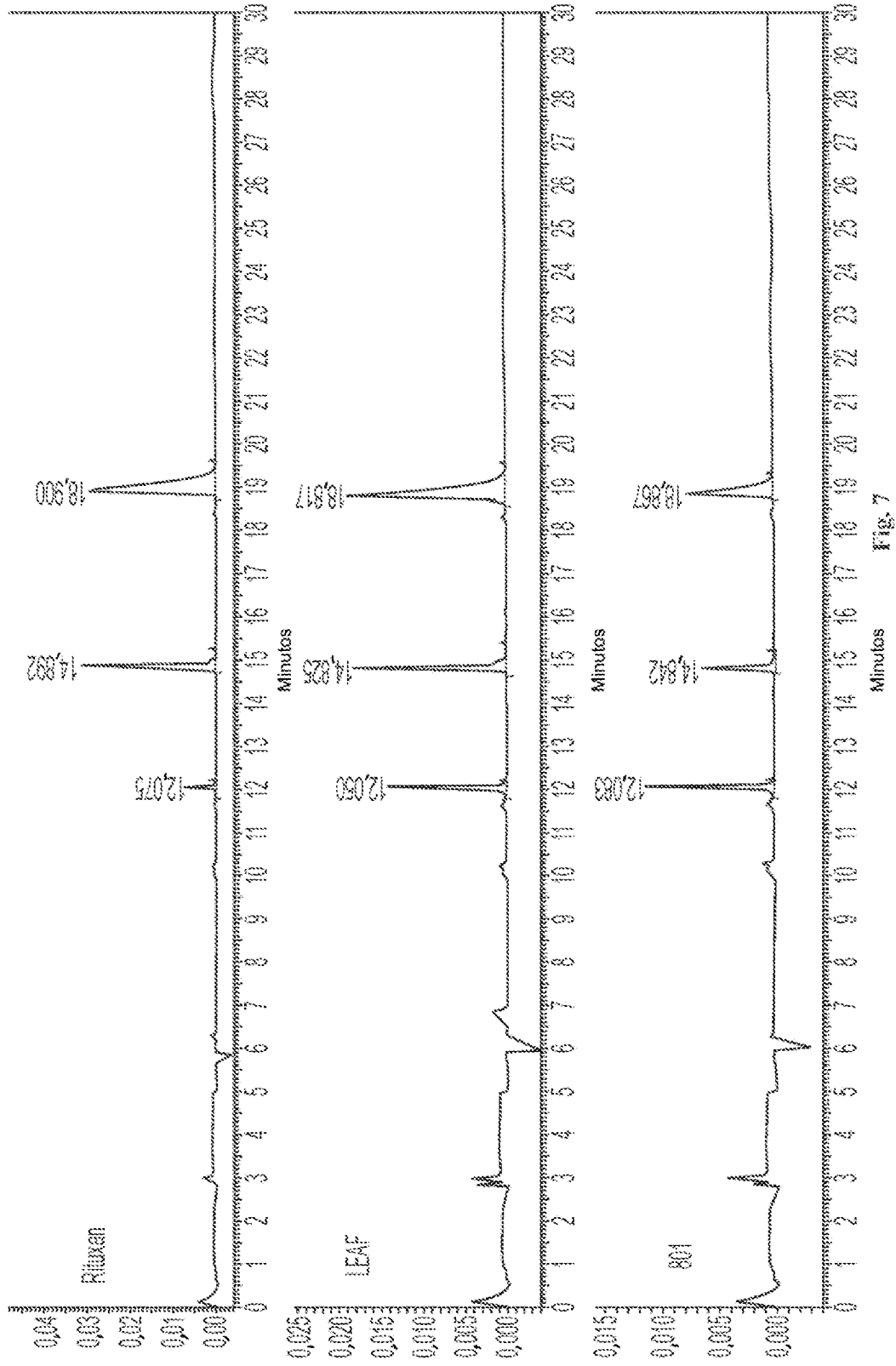


Fig. 7

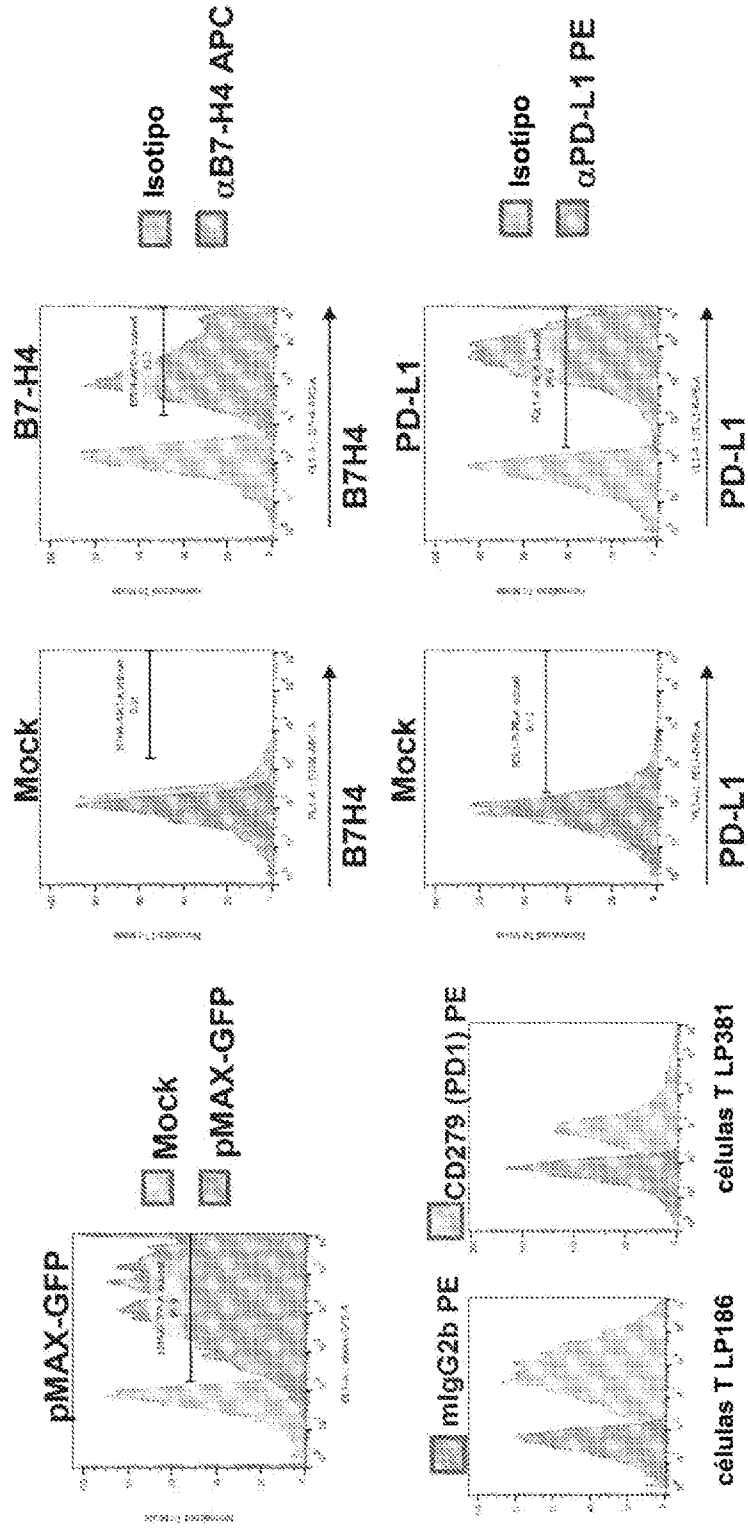


Fig. 9

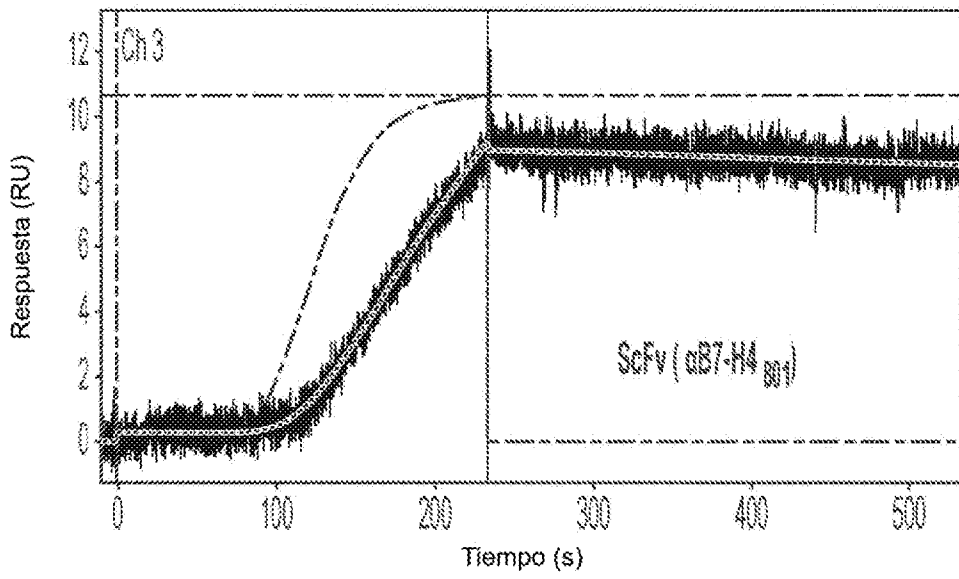
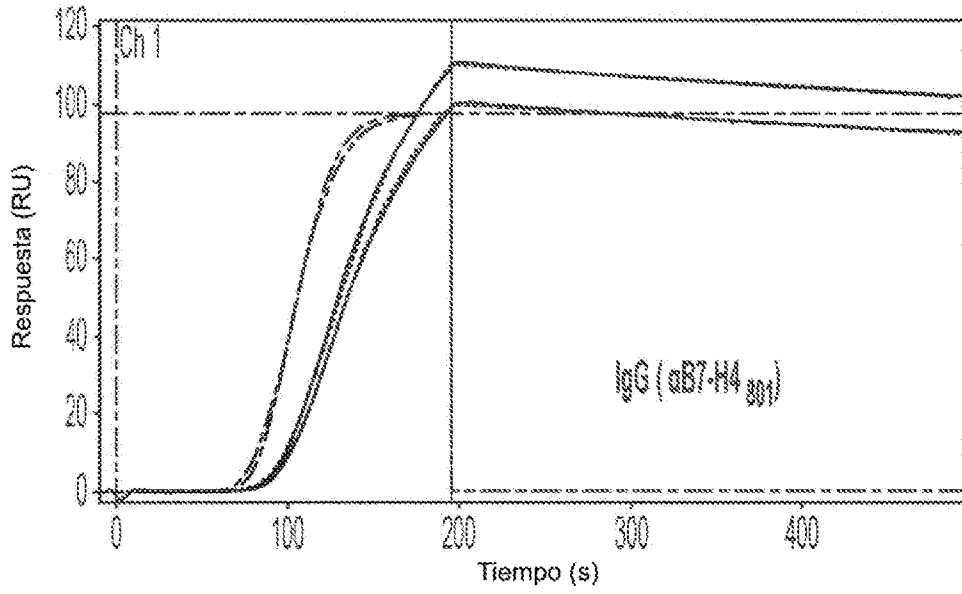


Fig. 10

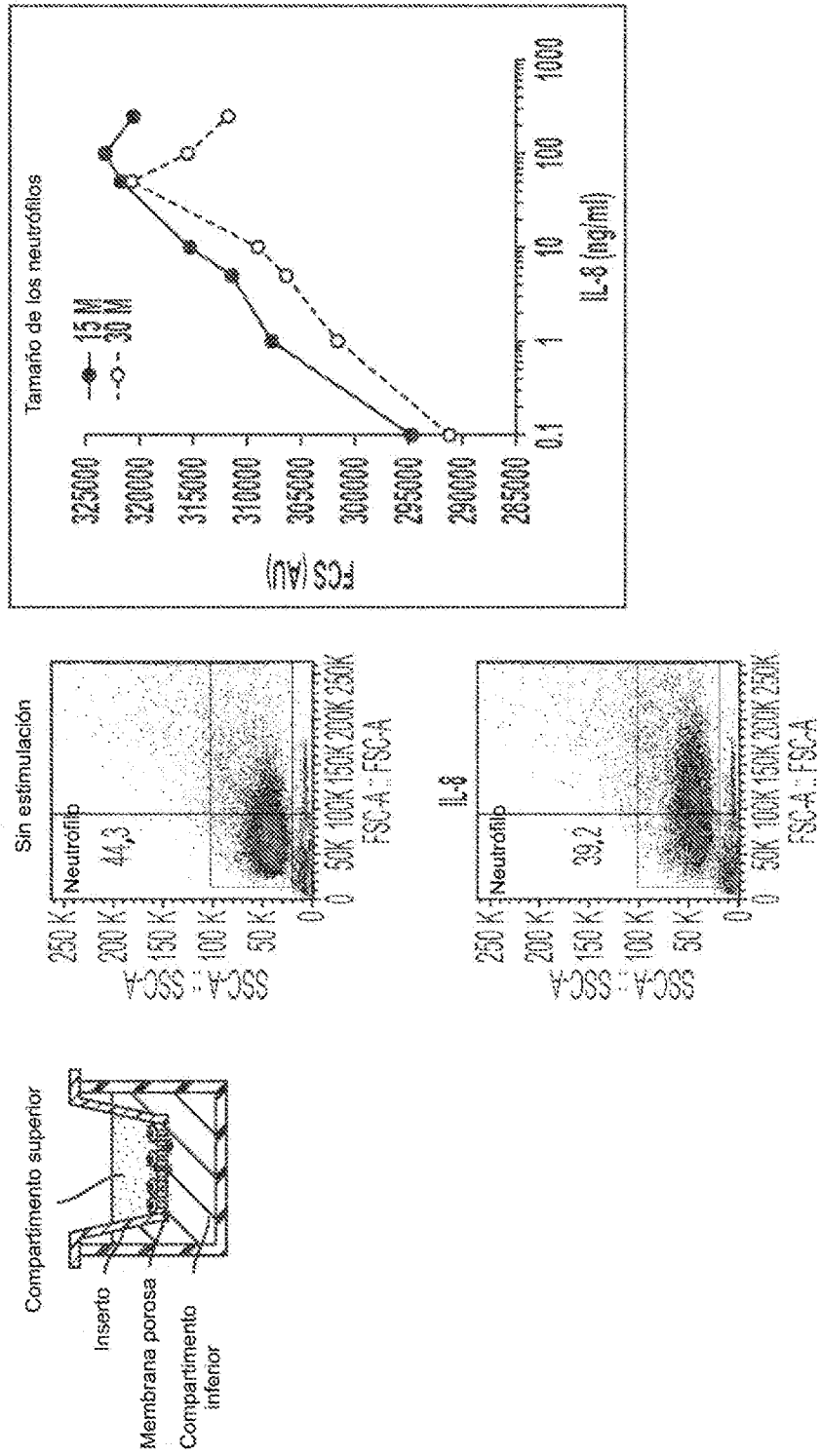


Fig. 11

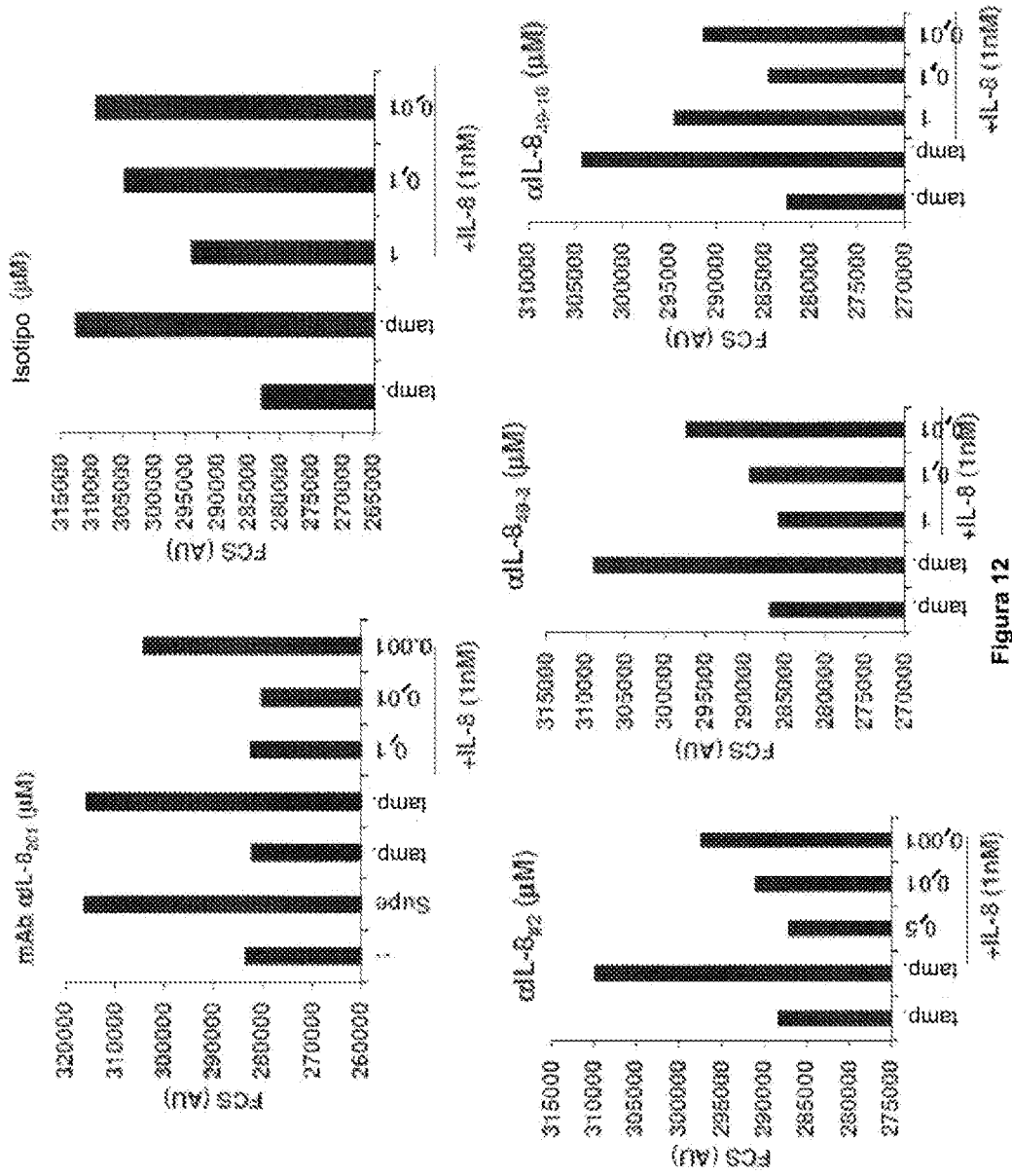


Figure 12

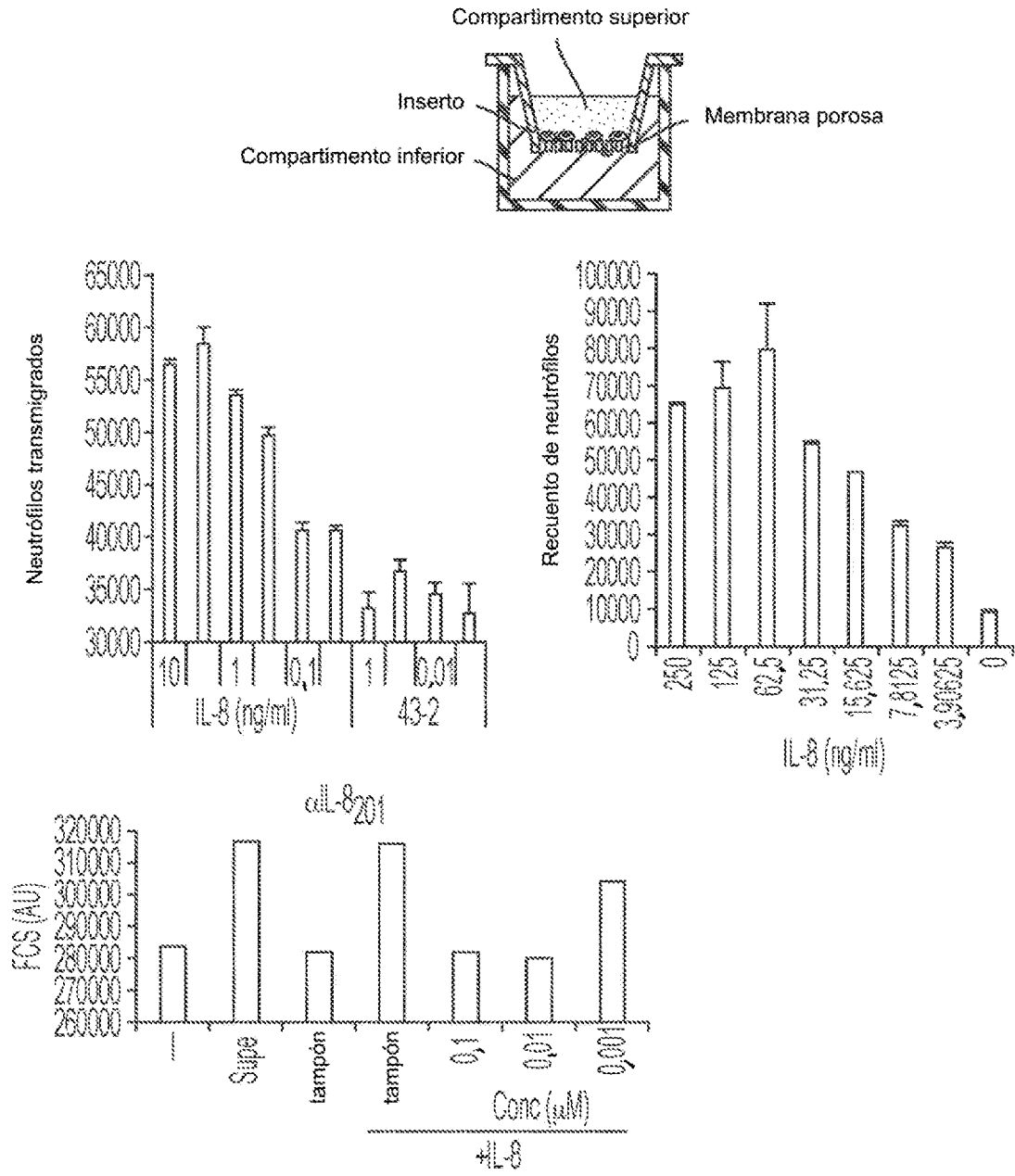


Fig. 13

Cribado K_D mediante SPR a partir de la expresión scFv *in vitro*

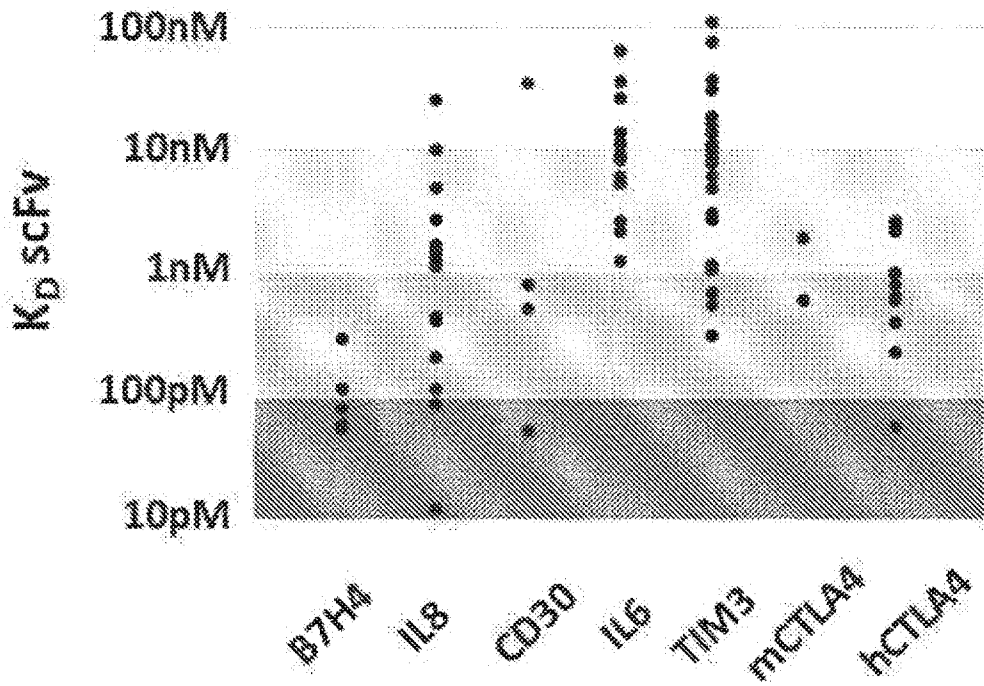


Fig. 14

Conversión con IgG1: todos los 29 puntos probados hasta la fecha son funcionales

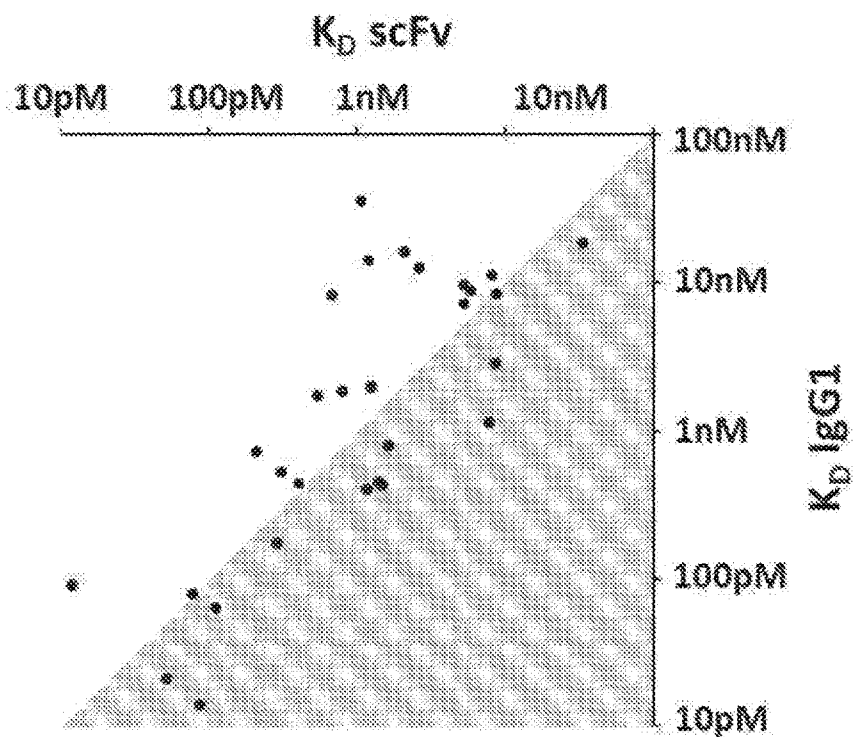


Fig.15