(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 313 867**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **00107845 .0**
(96) Fecha de presentación : **02.12.1992**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1024191**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2000**

(54) Título: **Producción de anticuerpos anti-auto de repertorios de segmentos de anticuerpo expresados en la superficie de fagos.**

(30) Prioridad: **02.12.1991 GB 9125579**
02.12.1991 GB 9125582
24.03.1992 GB 9206318
24.03.1992 GB 9206372
23.09.1992 WO PCT/GB92/01755

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

(73) Titular/es: **Medical Research Council**
20 Park Crescent
London W1B 1AL, GB
MEDIMMUNE LIMITED

(72) Inventor/es: **Griffiths, Andrew David;**
Hoogenboom, Hendricus Renerus Jacobus Mattheus;
Marks, James David;
McCafferty, John;
Winter, Gregory Paul y
Grigg, Geoffrey Walter

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Producción de anticuerpos anti-auto de repertorios de segmentos de anticuerpo expresados en la superficie de fagos.

Esta invención hace referencia al aislamiento de moléculas de anticuerpo dirigidas contra auto-antígenos, en particular anticuerpos humanos dirigidos contra auto-antígenos humanos. La tecnología de la expresión en fagos para la selección de moléculas de anticuerpo se describió en la patente internacional WO92/01047, PCT/GB92/00883, PCT/GB92/01755 y GB92/0206372.6. Los solicitantes demuestran que los anticuerpos dirigidos contra auto-antígenos pueden aislarse mediante tecnología de expresión en fagos.

Los autoanticuerpos humanos son de particular valor para propósitos terapéuticos y diagnósticos *in vivo*, ya que evitan problemas que sobrevienen de la antigenicidad de anticuerpos foráneos, por ejemplo de ratón. Los anticuerpos más utilizados para la terapia son aquellos que se dirigen a moléculas efectoras de superficie celular, como los receptores, adhesinas e integrinas, y los que se dirigen contra moléculas efectoras biológicas circulantes, como las hormonas, los factores de crecimiento y las citoquinas. Ha sido extremadamente difícil obtener anticuerpos humanos dirigidos contra auto-antígenos. Esta invención proporciona una vía potente de obtención de dichos anticuerpos.

Existe una demanda para aislar un fragmento de anticuerpo con especificidad contra auto-antígenos. Los animales no producen anticuerpos normalmente contra auto-antígenos, un fenómeno denominado tolerancia (G.J. Nossal Science 245, 147-153, 1989). Las enfermedades autoinmunes pueden resultar de la rotura de la tolerancia. Por lo general, la vacunación con un auto-antígeno no resulta en la producción de anticuerpos circulantes. Por ello es difícil de generar anticuerpos contra auto-antígenos, en particular en humanos. Es posible generar anticuerpos que reconozcan antígenos humanos en un animal como el ratón, especialmente si el antígeno humano no está estrechamente relacionado con cualquier equivalente en el animal. Si se requiere un anticuerpo humano, entonces es necesario "humanizar" el anticuerpo, por ejemplo mediante trasplante de CDR (patente GB2188638B).

La tecnología de anticuerpos de fagos tal como se describe en la patente internacional W092701047 ofrece la posibilidad de aislar anticuerpos humanos directamente. En esta solicitud, se demuestra por primera vez que los anticuerpos contra auto-antígenos pueden aislarse de librerías de fagos derivadas, por ejemplo, de fuentes no inmunizadas y de librerías preparadas por recombinación sintética de secuencias de genes-V, preferiblemente recombinación de secuencias VH con secuencias, DH y JH, y VL con JL. Estos anticuerpos son específicos para su antígeno. Esta aplicación muestra que las librerías únicas derivadas de esta manera pueden actuar como fuente de antígenos foráneos y de auto-antígenos y permite la exploración de una librería amplia para aislar anticuerpos contra cualquier antígeno.

En la patente internacional WO92/01047 se describió que los fragmentos de anticuerpo pueden expresarse en la superficie de bacteriófagos y que éstos pueden unirse al antígeno. Los fragmentos de anticuerpo pueden seleccionarse directamente utilizando esta característica. La capacidad para aislar los fragmentos de anticuerpo (Fab, Fv, scFv y VH) utilizando su expresión sobre la superficie del bacteriófago filamentoso ha abierto la posibilidad de aislar especificidades de anticuerpos (es decir, anticuerpos dirigidos contra un antígeno en particular) que hasta ahora eran difíciles o imposibles de aislar. En particular, la patente internacional WO92/01047 demuestra que las especificidades de anticuerpo pueden aislarse de un humano que no ha sido inmunizado específicamente ("no inmunizado"), incluso especificidades para antígenos como el 2-fenil-5-oxazolona con el que los humanos no estarían normalmente expuestos.

En realizaciones de la presente invención, los repertorios de anticuerpos sintéticos derivados de secuencias humanas, se expresan en la superficie de un bacteriófago filamentoso, referido aquí como un paquete de expresión genética replicable (rgdp, del inglés *replicable genetic display package*) y la especificidad de unión para él mismo se selecciona mediante la unión con su auto-antígeno. En este proceso, los repertorios de genes V se derivan de genes V de línea germinal reordenados *in vitro* o *in vivo* y o mediante mutación de (a) genes V reordenados reorganizados. Una característica clave de los repertorios de genes V es que son extremadamente diversos en su secuencia, generalmente en más de 10^6 miembros distintos. Incluso, es posible que una librería suficientemente grande pueda proporcionar una fuente de especificidades dirigida contra cualquier auto-antígeno. Los repertorios de genes V se clonan en el rgdp de un vector de fago filamentoso, de modo que los repertorios de anticuerpos se expresan en la superficie de rgdp. Los rgdps que codifican especificidades de anticuerpo raras que se unen a su propio anticuerpo, pueden seleccionarse en virtud de la unión a su propio antígeno. Los repertorios de anticuerpos pueden clonarse en un replicón sencillo o un formato de doble replicón como el descrito en la patente internacional WO92/01047 y la PCT/GB92/00883.

Los genes V pueden clonarse dentro del material genético de rgdp, y expresarse como dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo asociado.

Los dos dominios podrían expresarse como cadenas polipeptídicas separadas (unidas en fragmentos Fab a través de asociación no covalente de dominios y/o enlaces disulfuro), o como parte de la misma cadena (fragmentos V de cadena sencilla en donde los dos dominios están contenidos dentro de la misma cadena polipeptídica).

En la patente internacional WO92/01047 y en los ejemplos 1 a 8 de esta solicitud se ha utilizado la fusión de fragmentos de anticuerpo con la proteína del gen 3 del bacteriófago filamentoso para expresar y seleccionar fragmentos de anticuerpo. Una aproximación alternativa sería fusionar fragmentos de anticuerpo con la proteína del gen 8 u otras moléculas de superficie del bacteriófago filamentoso.

El aislamiento de anticuerpos humanos dirigidos contra antígenos humanos es una tarea en demanda. Existe sólo un limitado número de antígenos humanos contra los anticuerpos humanos circulantes hallados de forma natural. Existen anticuerpos dirigidos contra no-auto-antígenos de origen humano. Se han aislado anticuerpos dirigidos contra el grupo sanguíneo humano B de una librería de expresión de fagos preparada de individuos del grupo sanguíneo O (J.D. Marks y col., J. Mol. Biol. 222, 581-597, 1991), que reconoce el grupo sanguíneo B como foráneo.

Esta invención trata de un procedimiento general para aislar anticuerpos dirigidos contra auto-antígenos que son específicos para el antígeno concerniente. Muchos pacientes muestran concentraciones significativas de auto-anticuerpos circulantes. Se estima que del 10 al 30% de linfocitos B en individuos normales, sanos están implicados en generar auto-anticuerpos (I.R. cohen y A. Cooke Immunol. Today 7, 363-364, 1986). Sin embargo, los "auto-anticuerpos naturales" producidos no son de uso terapéutico ya que a menudo son IgM, de baja reactividad y polireactivos (P. Casali y A.L. Notkins Ann. Rev. Immunol. 7, 515-531, 1989); S. Avrameas Immunol.Today, 12, 154-159). Una respuesta autoinmune puede producirse en enfermedades autoinmunes o después de infecciones y pocos anticuerpos monoclonales dirigidos contra auto-antígenos o auto-anticuerpos se han aislado de pacientes con enfermedad autoinmune (K. james & G. T. Bell J. Immunol Methods 100, 5-40, 1987). Estos auto-anticuerpos son frecuentemente específicos, pero pueden unirse sólo a un rango limitado de epitopos sobre el antígeno (M. Bouanani y col., Artrhitis Rheum. 34 1585-1593, 1991).

La preparación de librerías de genes V derivadas del ARNm de células plasmáticas que secretan anticuerpos IgG (o IgM) puede conducir al aislamiento de fragmentos de anticuerpo derivados de auto-anticuerpos. Por ejemplo, los auto-anticuerpos pueden aislarse de pacientes con enfermedades inmunes, por ejemplo anticuerpos anti-receptor de la acetilcolina podrían aislarse de repertorios de anticuerpos generados a partir del ARNm de IgG de pacientes con miastenia gravis. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo específico para la peroxidasa humana del tiroides se ha aislado de una librería de bacteriófago lambda de un paciente con enfermedad autoinmune del tiroides (S. Portolano y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 372-377, 1991). Sin embargo, esto requiere un cribado extenso de 200.000 calvas para obtener un clon. Además, esta librería se derivó de tejido de tiroides, un proceso no fácilmente aplicable en la mayoría de los casos.

Por el contrario, el poder de selección disponible utilizando el sistema de fagos, demostrado en la patente internacional WO92/01047 permite el aislamiento rápido de auto-anticuerpos a partir del ARNm de IgGs de linfocitos de sangre periférica de un donante sin enfermedad. Se muestra en el ejemplo 2 que los anticuerpos que se unen a la tiroglobulilna humana (que pueden hallarse en el suero de personas con o sin enfermedad autoinmune sintomática), pueden aislarse de repertorios de fagos preparados de humanos inmunizados. Normalmente, uno no esperaría poder obtener anticuerpos contra la tiroglobulina humana mediante inmunización de un humano con tiroglobulina humana, no obstante existen auto-anticuerpos en muchas personas. Se ha reportado la presencia de auto-anticuerpos contra la tiroglobulina en el suero normal y a menudo con un elevado nivel de polireactividad (S. Avraemeas, 1991, *supra*). Por el contrario, aquellos que se han aislado en referencia con el ejemplo 2 son específicos para la tiroglobulina.

En esta solicitud, también se demuestra que incluso puede aislarse anticuerpos contra el factor-α de necrosis tumoral, tal como describió en referencia al ejemplo 1 a partir de la misma librería que los anticuerpos dirigidos contra la tiroglobulina. Muchos auto-antígenos no tienen auto-anticuerpos circulantes asociados que sean detectables. Además, en el ejemplo 3 de referencia se muestra el aislamiento de anticuerpos contra auto-antígenos de mucina, el antígeno carcinoembrionario (CEA) y CD4, contra los cuales no se han reportado anticuerpos en el suero normal. Además, estos anticuerpos son específicos, mientras que a menudo existe un grado elevado de polireactividad en los auto-anticuerpos naturales que pueden encontrarse. La gran mayoría de los auto-antígenos no tienen auto-anticuerpos circulantes asociados detectables. Por ello, el aislamiento de auto-anticuerpos tal como se describe en la presente invención abre la posibilidad del aislamiento directo de anticuerpos humanos de unión a antígenos humanos con propósitos diversos, como por ejemplo anticuerpos que se unan a hormonas circulantes para bloquear, modificar o potenciar su acción, o anticuerpos que se unan a un antígeno de superficie para el análisis por la imagen o la eliminación de por ejemplo células cancerosas.

El origen de los genes V que contribuyen a los anticuerpos anti-auto aislados de librerías de fagos no está claro. La tolerancia a los auto-antígenos por el sistema inmunitario (prevención de la generación de anticuerpos dirigidos contra los mismos) está mediada por deleción clonal o inactivación funcional (anergia) de los linfocitos B auto-reactivos (D. A. Nemazee & K. Burki Nature 337, 562-566, 1989); C.C. Goodnow y col., Nature 334, 676-682, 1988; S.B. Hartley y col., Nature 353, 765-769, 1991; D.M. Russell y col., Nature 354, 308-311, 1991). En cualquier caso una pequeña parte de los anticuerpos anti-auto circulantes es detectable para la mayoría de los antígenos. Sin embargo, en el caso de la anergia, las células auto-reactivas del linaje de células B persisten en los órganos linfoides periféricos conduciendo a células B en circulación. Estos linfocitos raros con especificidad anti-auto pueden proporcionar parejas de cadenas ligera y pesada (o incluso ambas) para anticuerpos de fagos con especificidades anti-auto. Alternativamente, dichas especificidades anti-auto pueden provenir de la combinación en la librería de un dominio VH con un dominio VL para proporcionar una especificidad que normalmente se deleciona si ello ocurre en la naturaleza. Por esta razón, las librerías combinatoriales y las librerías de "barajamiento de cadenas" como se describe en la patente internacional WO92/01047 pueden ser una fuente rica de anticuerpos anti-auto. Para obtener dichos anticuerpos anti-auto raros, se requiere un procedimiento de selección potente, como el proporcionado por los anticuerpos de fagos.

El grado de mutación somática observado en los fragmentos de anticuerpo anti-auto aislados por tecnología de fagos en esta solicitud muestra una hipermutación somática que indica que los genes V han sido estimulados por el

antígeno, bien un antígeno de reacción cruzada foráneo u otros antígenos foráneos. En ambos casos los fragmentos de anticuerpo aislados con la tecnología de fagos serán normalmente una combinación de dominios VH y VL no presentes originalmente en los linfocitos B y el poder de la tecnología de fagos, tal como se describe en esta solicitud, permitirá su aislamiento.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento según la reivindicación 1.

El componente polipeptídico codificado por el ácido nucleico en cada bacteriófago filamentoso (rgdp) puede ser un dominio VH o VL de un anticuerpo, o cualquier parte de un anticuerpo que, bien sólo o en combinación con uno o más partes del componente, forme un fragmento de anticuerpo que sea capaz de unirse a un antígeno. Ejemplos de cadenas polipeptídicas que pueden utilizarse como partes del componente de un miembro sbp (del inglés *specific binding pair*), tal como se describió anteriormente incluyen, además de los dominios VH y VL, VlCL, VHCH1, fragmentos scFv, fragmentos Fab y demás.

Cada miembro sbp expresado en la superficie de un rgdp puede ser un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL.

Cada fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento scFv, un fragmento Fab, un fragmento Fv que consiste en un dominio VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, o cualquier otro fragmento que tenga la capacidad de unirse a un epitopo o antígeno.

La etapa de proporcionar una librería de rgdps puede comprender:

La combinación (i) de un primer componente de cadena polipeptídica de un miembro sbp fusionado a un componente de un rgdp, que por ello expresa dicho primer componente de cadena polipeptídica o población de lo mismo en la superficie de rgdps tras la expresión en un organismo de células huésped recombinantes, o una población de dicho primer componente de cadena polipeptídica fusionado con un componente de un rgdp, con (ii) un segundo componente de cadena polipeptídica de un miembro sbp o una población de dicho segundo componente de cadena polipeptídica, para formar una librería de miembros sbp expresada en la superficie de rgdps; al menos uno de los componentes, primero o segundo, de cadena polipeptídica o poblaciones del mismo está codificado por un ácido nucleico, el cual es capaz de ser empaquetado mediante la utilización de dicho componente de un rgdp.

La etapa de proporcionar una librería de rgdp puede comprender:

La expresión de un primer componente de cadena polipeptídica de un organismo huésped recombinante de un miembro sbp o una población del mencionado primer componente de cadena polipeptídica, fusionado a un componente de un rgdp que expresa dicho componente de cadena polipeptídica en la superficie de rgdps;

La combinación del primer componente de cadena polipeptídica o población con un segundo componente de cadena polipeptídica de un miembro sbp, o una población de dicho segundo componente de cadena polipeptídica, para formar una librería de rgdps en donde cada uno expresa un miembro sbp en su superficie, al menos uno de los componentes, primero o segundo, de cadena polipeptídica se expresa a partir de un ácido nucleico capaz de ser empaquetado utilizando dicho componente de un rgdp.

Si el miembro sbp es un fragmento Fab, el primer y segundo componente de cadena polipeptídica pueden ser un polipéptido que consista de un dominio VL y CL, y el segundo componente de cadena polipeptídica un polipéptido que consista en un dominio VH y un dominio CH1.

La combinación de un primer y un segundo componente de cadena polipeptídica o poblaciones del mismo puede realizarse a nivel del ácido nucleico con vectores en los que se ha introducido una secuencia que codifica un primer componente y una secuencia que codifica el segundo componente. Por otra parte, la combinación puede ser a nivel polipeptídico con un primer componente que no se exprese a partir de los mismos vectores que el segundo componente. Incluso, uno u otro, primero o segundo, componente puede proporcionarse como una librería soluble. Detalles de formatos varios que puedan utilizarse se proporcionan en la patente internacional WO92/01047 y PCT/GB92/00883.

La etapa de proporcionar una librería puede comprender:

La combinación (i) de un ácido nucleico que comprende un primer componente de cadena polipeptídica de un miembro sbp fusionado a un componente de un rgdp o una población de dicho primer componente de cadena polipeptídica fusionado con un componente de un rgdp, con (ii) una ácido nucleico que codifica un segundo componente de cadena polipeptídica de un miembro sbp o una población del mismo, para formar una librería de ácido nucleico, en donde dicho ácido nucleico de la mencionada librería es capaz de ser empaquetado utilizando el mencionado componente de un rgdp;

La expresión en un organismo huésped recombinante de dicho componente de cadena polipeptídica fusionado con un componente de un rgdp o población del mismo y un segundo componente de cadena polipeptídica de un miembro sbp o una población del mismo, para producir una librería de rgdps, en donde cada uno expresa en su superficie un

miembro sbp y contiene el ácido nucleico que codifica un primer y un segundo componente de cadena polipeptídica del miembro sbp expresado en su superficie.

Se insta a los lectores que consulten la patente internacional WO92/01047, en particular, si desean conocer detalles adicionales de cualquier procedimiento descrito aquí.

En una realización de la presente invención, tanto el primer como el segundo componente de cadena polipeptídica o poblaciones del mismo se expresan a partir del ácido nucleico capaz de ser empaquetado utilizando dicho componente de un rgdp. Esto puede llevarse a cabo si los componentes juntos forman un fragmento Fab o, más generalmente, cuando cada miembro sbp que se expresa en la superficie de un rgdp es un fragmento de anticuerpo scFv.

En una realización, cada segundo componente de cadena polipeptídica o población del mismo puede expresarse a partir de un ácido nucleico separado de un ácido nucleico del cual se expresa el primer componente de cadena polipeptídica o población del mismo. El ácido nucleico que codifica el primer componente de cadena polipeptídica puede hallarse en el mismo vector de expresión que el ácido nucleico que codifica el segundo componente de cadena polipeptídica, pero separado de éste, de modo que por ejemplo, se produzcan fragmentos Fab. Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el primer componente de cadena polipeptídica puede estar en un vector de expresión distinto al del segundo componente de cadena polipeptídica. Si tanto el primero como el segundo componente de cadena polipeptídica están codificados en el mismo vector de expresión, entonces pueden expresarse como fragmentos scFv, donde un dominio VH está unido a un dominio VL por un engarce polipeptídico, de forma que cada scFv es una sola cadena polipeptídica.

Cada miembro sbp expresado en la superficie de un rgdp es un fragmento de anticuerpo Fab.

Si el ácido nucleico se deriva de un humano, es más difícil obtener anticuerpos que reconozcan (es decir, se unan específicamente) a auto-antígenos humanos.

Si el ácido nucleico se deriva de una librería preparada por recombinación artificial o sintética de secuencias de genes V de línea germinal, la librería puede ser también totalmente sintética.

Los miembros sbp seleccionados en (b) expresados en la superficie de rgdps pueden seleccionarse o cribarse para proporcionar un miembro sbp individual o una población mixta de dichos miembros sbp asociados en sus respectivos rgdps con el ácido nucleico que codifica dicho miembro sbp, o una cadena polipeptídica del mismo. Los miembros sbp de expresión en fagos rgdp seleccionados en (b) pueden crecerse en cultivo para aumentar su número antes de cualquier selección o cribado adicional subsiguiente. El ácido nucleico que codifica un miembro sbp seleccionado o cribado derivado de un rgdp que expresa en su superficie un miembro sbp seleccionado o cribado puede utilizarse para expresar un miembro sbp o un fragmento de derivado del mismo en un organismo huésped recombinante.

La presente invención abarca cualquier procedimiento en donde se obtiene él ácido nucleico de uno o más rgdps seleccionados a partir de una librería por la unión con un auto-antígeno y dicho ácido nucleico se utiliza para proporcionar un ácido nucleico codificante en un procedimiento posterior (de acuerdo o no con cualquiera de las reivindicaciones de la presente invención) para obtener un miembro sbp individual o una población mixta de miembros sbp, o un ácido nucleico que lo codifica.

El producto final de expresión, el miembro sbp seleccionado, puede modificarse para producir un derivado del mismo.

El producto final de expresión o derivado del mismo puede utilizarse para preparar un medicamento terapéutico o profiláctico o un producto de diagnóstico.

La presente invención también abarca fragmentos de anticuerpo, derivados del mismo, incluyendo anticuerpos completos y fusiones con enzimas, obtenidos mediante la utilización de cualquier procedimiento aquí descrito de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización, en cualquier procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la presente invención aquí descritas, de un equipo que comprende una librería de vectores en donde cada uno comprende el ácido nucleico capaz de ser empaquetado en rgdps y que codifica un componente de cadena polipeptídica de un anticuerpo para la expresión en la superficie de rgdps.

También se proporciona por la presente descripción la utilización, en cualquier procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la presente invención aquí descritas, de un equipo que comprende una librería de rgdps en donde cada uno contiene un ácido nucleico que codifica al menos un componente de cadena polipeptídica de un anticuerpo.

La presente descripción proporciona en general un procedimiento para producir un paquete de expresión genética (rgdps) o una población de dichos rgdps, cuyo procedimiento comprende las etapas de:

(a) inserción de una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de unión, la cual es un miembro de una pareja de unión específica y un anticuerpo anti-auto, dentro de un genoma viral;

(b) cultivo del virus que contiene dicha secuencia nucleotídica para que dicha molécula de unión se sintetice y exprese por el virus en su superficie.

La presente invención también abarca un procedimiento para la selección de un rgdp específico para un epitopo de auto-antígeno que comprende la producción de una población de dichos rgdps y la etapa adicional de selección para dicha molécula de unión, la cual es un anticuerpo anti-auto, mediante contacto de la población con dicho epitopo de modo que los rgdps individuales con la especificidad deseada puedan unirse al mencionado epitopo. El procedimiento puede comprender una o más etapas adicionales de: (i) separación de cualquiera de los rgdps unidos del epitopo; (ii) recuperación de cualquiera de los rgdps separados y (iii) utilización de las secuencias nucleotídicas insertadas de cualquiera de los rgdps separados en un sistema recombinante para producir la molécula de unión separada del virus. La etapa de selección puede aislar la secuencia nucleotídica que codifica la molécula de unión con especificidad deseada, en virtud de que dicha molécula de unión se expresa en asociación con la superficie del virus en la que dicha molécula de ácido nucleico está contenida.

La presente descripción también proporciona un procedimiento de producción de un miembro multimérico de una pareja de unión específica (sbp) que es un anticuerpo anti-auto, cuyo procedimiento comprende:

La expresión en un organismo huésped recombinante de un primer componente de cadena polipeptídica de dicho miembro sbp, o una población genéticamente diversa de dicho miembro sbp, fusionado con un componente de un paquete de expresión genética replicable (rgdp) secretado que por ello expresa el mencionado polipéptido en la superficie del paquete, y la expresión en un organismo huésped recombinante de una segunda cadena polipeptídica de dicho multímero, lo que causa o permite que las cadenas polipeptídicas estén juntas para formar dicho multímero como parte del mencionado rgdp. Y al menos una de dichas cadenas polipeptídicas se expresa a partir de un ácido nucleico, capaz de ser empaquetado utilizando dicho componente, por lo que el material genético de cada rgdp codifica una de las cadenas polipeptídicas mencionadas.

Ambas cadenas pueden expresarse en el mismo organismo huésped.

La primera y segunda cadena de dicho multímero puede expresarse como una cadena separada a partir de un único vector que contenga su ácido nucleico respectivo.

Al menos una de las cadenas polipeptídicas (o componente de cadena polipeptídica) puede expresarse a partir de un vector de fago.

Al menos una de las cadenas polipeptídicas puede expresarse a partir de un vector fagémido, el procedimiento incluye la utilización de un fago auxiliar, o un plásmido que exprese los genes de fagos complementarios, para ayudar a empaquetar dicho genoma del fagémido, y dicho componente del rgdp es una proteína de la cápside del mismo. La proteína de la cápside puede estar ausente, ser defectuosa o condicionalmente defectuosa en el fago auxiliar.

El procedimiento puede comprender la introducción de un vector, capaz de expresar dicha primera cadena polipeptídica, en un organismo huésped que exprese dicha segunda cadena polipeptídica en la forma libre, o la introducción de un vector capaz de expresar dicho segundo polipéptido en la forma libre en un organismo huésped que exprese dicha primera cadena polipeptídica.

Cada una de las cadenas polipeptídicas puede expresarse a partir del ácido nucleico, capaz de ser empaquetado como un rgdp, mediante la utilización de dicho producto de fusión del componente mencionado, por lo que el ácido nucleico codificante de ambas cadenas polipeptídicas se empaqueta en los rgdps respectivos.

Las fusiones pueden expresarse en ausencia de un componente de expresión rgdp, quizás la cápside, expresada en la forma de tipo silvestre.

La proteína de la cápside puede estar ausente, ser defectuosa o condicionalmente defectuosa en el fago auxiliar.

La célula huésped puede ser una cepa mutadora que introduce diversidad genética en el ácido nucleico del miembro sbp.

El rgdp es un bacteriófago filamentoso, el huésped puede ser una bacteria, y dicho componente del rgdp una proteína de la cápside del bacteriófago. El fago puede seleccionarse a partir de la clase I de fagos fd, M13, f1, if1, Ike, ZJ/Z, Ff y la clase II de fagos Xf, Pf1 y Pf3. el fago puede ser fd o un derivado de fd. El derivado puede ser resistente a tetraciclina. Dicho miembro sbp o cadena polipeptídica del mismo puede expresarse como una fusión con la proteína de la cápside del gen III del fago fd o su homólogo en otro fago filamentoso. El miembro sbp o cadena polipeptídica del mismo puede insertarse en la región N-terminal de la proteína de la cápside madura cadena abajo de un péptido líder secretor. La secuencia puede estar insertada después del aminoácido +1 de la proteína madura. El sitio para la inserción puede estar flanqueado por secuencias cortas correspondientes a secuencias que aparecen en cada extremo del ácido nucleico a insertar.

El huésped puede ser *E. coli*.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido de miembro sbp puede estar unido cadena abajo con una proteína viral de la cápside a través de un codón de parada de traducción suprimible, de modo que en condiciones en las que se suprime el codón de parada se producen las proteínas de fusión que contienen el polipéptido del miembro sbp y la proteína de la cápsula viral, mientras que en condiciones no supresoras se produce la forma libre de los polipéptidos del miembro sbp.

Los sistemas de selección y los formatos de ensayo se discuten en otra parte en este documento. En estos sistemas y formatos, la secuencia génica que codifica la molécula de unión (por ejemplo el anticuerpo) de la especificidad deseada se separa de una población general de rgdps con un rango de especificidades, por el hecho de su unión con una diana específica (por ejemplo el antígeno o el epitopo). Por ello, los rgdps formados mediante dicha expresión pueden seleccionarse o cribarse para proporcionar un miembro sbp individual, o una población mixta seleccionada de dichos miembros sbp asociados en sus respectivos rgdps con el ácido nucleico que codifica dicho miembro sbp o una cadena polipeptídica del mismo. Los rgdps pueden seleccionarse mediante afinidad con un miembro complementario de dicho miembro sbp.

Cualquier rgdp unido con el miembro secundario mencionado puede ser recuperado mediante lavado con un eluyente. Las condiciones de lavado pueden variar con el fin de obtener rgdps con afinidades de unión distintas para dicho epitopo. Alternativamente, para obtener por ejemplo rgdps de alta afinidad, el miembro complementario (por ejemplo un epitopo) puede presentarse a la población de rgdps (por ejemplo pAbs) ya unido a un miembro de unión, en cuyo caso los pAbs con una afinidad mayor por el epitopo desplazarán al miembro ya unido. Por ello, el eluyente puede contener una molécula que compita con dicho rgdp por la unión con el miembro sbp complementario. El rgdp puede aplicarse a dicho miembro sbp complementario en presencia de una molécula que compita con el mencionado paquete por la unión con el miembro sbp complementario. Puede utilizarse el ácido nucleico derivado de un rgdp seleccionado o cribado para expresar dicho miembro sbp o un fragmento o derivado de lo mismo en un organismo huésped recombinante. Se puede tomar y utilizar el ácido nucleico de uno o más rgdps para proporcionar el ácido nucleico codificante en un procedimiento adicional para obtener un miembro sbp individual o una población mezclada de miembros sbp, o el ácido nucleico codificante de los mismos. La expresión y el producto pueden modificarse para producir un derivado del mismo.

Una fuente preferida para la generación de librerías diversas de humanos inmunizados es el ARNm de IgM. Se halló en el ejemplo 43 de la patente internacional WO92/01047 que los fragmentos de anticuerpo dirigidos contra la lisozima de huevo de pavo y la 2-fenil-5-oxazolona se aislaban mucho más fácilmente a partir de una librería de fagos derivados de ARNm de IgM de donantes humanos no inmunizados que de una preparada de ARNm de IgG. Además, no pudo aislarse fragmentos de anticuerpo de unión a 2-fenil-5-oxazolona de una librería de 2.000.000 de clones de anticuerpos de fagos preparados de ARNm de IgG de ratones no inmunizados (T. Clackson y col., Nature 352, 624-628, 1991). Los ejemplos de referencia 1 a 3 de esta solicitud muestran el aislamiento de anticuerpos específicos para el auto-antígeno de la librería de IgM. Aunque en estas muestras, las especificidades se han seleccionado como fragmentos Fv de cadena sencilla en un formato de un solo replicón o combinatoria dual, formato de replicón dual (Hoogenboom y col., 1991, *supra*) por ejemplo utilizando la recombinación del sistema loxP (PCT/GB92/00883).

Las librerías de fagos pueden prepararse enriquecidas en anticuerpos dirigidos contra las propias IgM e IgD expresadas en la superficie de linfocitos B antes de la estimulación con el antígeno, aunque expresan poca IgM o IgD solubles. Estas células no estimuladas contienen seguramente más genes de anticuerpo con especificidades anti-auto. Por el contrario, las células de plasma diferenciadas terminalmente que secretan anticuerpos solubles expresan poca inmunoglobulina en su superficie. La preparación de cADN para librerías de fagos con cebadores específicos para IgM o IgD de superficie producirán un repertorio de genes de anticuerpo enriquecidos en los genes nativos no seleccionados que codifican dominios V. En los linfocitos B que se han silenciado funcionalmente mediante su propia exposición existen niveles muy reducidos de IgM de superficie y niveles no variables de IgD de superficie (C.C. Goodnow y col., *supra*). Un cebador específico para IgD de superficie puede ser adecuado en particular para el aislamiento de anticuerpos anti-auto.

Sin embargo, tal como se ha demostrado en esta solicitud, el ARNm de IgM de linfocitos de sangre periférica es una fuente preferida de genes V para especificidades anti-auto. Otras fuentes de dichos anticuerpos anti-auto pueden ser el ARNm fetal o el ARNm de sangre de cordón (P.M. Lydyard y col., Scand J Immunol 31, 33-43, 1990).

Existe el potencial para generar repertorios para la expresión de fagos con la combinación original de dominios VH y VL mediante la utilización de PCR y unión de los genes que los codifican en las células que expresan estos dominios. El principio de "PCR en la célula", donde se mantiene el apareamiento VH/VL original, se demostró en la PCT GB92/01483 y se describió en Embleton y col., Nucleic Acids Res., 20, 3831-3837, 1992. Esto puede ser particularmente útil si los linfocitos pueden seleccionarse en un estadio anterior a la deleción de los clones que expresan los anticuerpo anti-auto.

En esta invención, se utilizó la librería de secuencias de genes V de línea germinal preparada mediante recombinación sintética de segmentos V, D y J. Estos actúan como una fuente rica de anticuerpo anti-auto. En los ejemplos 5 a 7, se demostró que las especificidades anti-auto contra el TNF, anticuerpo humano anti-rhesus D (OAK3) y la tiroglobulina pueden aislarse de una librería de anticuerpos de fagos preparada mediante unión sintética de segmentos V, D y J. La utilización de genes de línea germinal para este propósito, tal como se muestra en los ejemplos 5 a 7, debería ser válida para el aislamiento de anticuerpo anti-auto ya que existen evidencias de que los linfocitos B dirigidos

contra auto-antígenos solubles están silenciados funcionalmente y se eliminan los dirigidos contra el propio antígeno unido a la membrana (S.B. Hartley y col., *supra*; D.M. Russell y col., *supra*). Por ello, la utilización de librerías sintéticas generadas mediante recombinación *in vitro* de VH, DH, JH o VK, JK o VL, JL o su equivalente pueden ser particularmente ventajosas para el aislamiento de anticuerpos dirigidos contra auto-antígenos multivalentes unidos a la membrana.

En los ejemplos 5 a 7, se han utilizado los segmentos VH CD3 sintéticos mediante incorporación de secuencias de bases aleatorias en la región de unión V-D-J y unión de éstas a los segmentos del gen VH de línea germinal. Otras estrategias pueden utilizarse como la generación de bucles CDR de secuencias aleatorias o la generación de bucles CDR de estructura canónica conocida (C. Chothia y col., Nature 342, 877-893, 1989) y la incorporación de elementos de secuencia aleatoria. La naturaleza de línea germinal de los segmentos V y J podría alterarse por incorporación de alteraciones aleatorias o específicas a la secuencia o mediante regiones del gen V mutadas somáticamente. La estrategia utilizada en los ejemplos 5 a 7 tiene la ventaja de que las estructuras de bucle de los segmentos del gen V forman únicamente un número limitado de plegamientos distintos y combinaciones de plegamientos (C. Chothia y col., J. Mol. Biol. 227, 779-817, 1992) y han evolucionado presuntamente hacia la estabilidad con el fin de crear una distribución y un intervalo de sitios de unión bien ajustados para acoplarse a la estructura de los antígenos. Además, las regiones de entramado y los dos primeros bucles hipervariables de cadenas ligera y pesada de los anticuerpos humanos sintéticos son seguramente idénticos en muchos individuos distintos. Dichos anticuerpos humanos sintéticos podrían ser menos inmunogénicos que las estructuras totalmente artificiales.

Una alternativa menos preferida para las librerías anteriores de expresión en fagos sintéticos y naturales podría ser la generación de librerías por mutagénesis aleatoria que se expresaran en fagos, derivados de una o más moléculas de anticuerpo humano y la selección de especificidades anti-auto-antígeno a partir de ellas.

Selección

Los rgdps individuales que expresan la especificidad deseada para un antígeno, pueden aislarse de una librería utilizando técnicas de cribado convencional (por ejemplo la descrita en Harlow, E. y Lane, D., 1988, *supra* Gherardi y col., 1990. J. Immunol. Meth. 126, p61-68).

Los solicitantes también concibieron técnicas que son practicables debido a las propiedades únicas de los rgdps. El esquema general de algunos procedimientos de cribado se ilustra en la Figura 5 con pAbs como un ejemplo tipo de rgdp.

La población/librería de pAbs a cribar se deriva de la recombinación artificial de segmentos V humanos, tal como se describe más adelante. Esta población puede cribarse en uno o más formatos de los descritos más adelante con referencia a la Figura 5, para derivar aquellos pAbs individuales cuyas propiedades de unión al antígeno son distintas a las de la muestra c.

Elución de la unión

La Figura 5(i) muestra el antígeno (ag) unido a una superficie sólida que puede ser una placa de Petri, bolas de cromatografía, bolas magnéticas y similares. La población/librería de pAbs se pasa luego a través de ag, y aquellos individuos p que se unen, se retienen tras el lavado y opcionalmente se detectan con el sistema de detección d. Puede utilizarse un sistema de detección basado en el antisuero anti-fd (véase por ejemplo, Ejemplo 4 de la patente internacional WO92/01047). Si las muestras de la población p unida se eliminan en condiciones crecientes de astringencia, aumentará la afinidad de unión representada en cada muestra. Un aumento en las condiciones de astringencia puede lograrse, por ejemplo, aumentando el tiempo de remojo o cambiando el pH de la solución de remojo, etc.

Competición

En referencia a la figura 5(ii) el antígeno ag puede unirse a un soporte sólido y unirse a saturación por la molécula de unión original c. Si una población de pAb mutante (o un grupo de pAbs no relacionados) se ofrece al complejo, únicamente se unirán aquellos que tengan una mayor afinidad por el antígeno ag que por c. En muchos ejemplos, únicamente una minoría de la población c será desplazada por individuos de la población p. Si c es una molécula de anticuerpo tradicional, todo material unido puede recuperarse y el p unido puede recuperarse mediante infección con la bacteria adecuada y/o mediante utilización de técnicas estándares como la PCR.

Una aplicación ventajosa se deriva cuando se utiliza ag como receptor y c como el ligando correspondiente. La población unida recuperada p se relaciona estructuralmente con el sitio de unión del receptor/y o ligando. Este tipo de especificidad es conocida por su utilidad en la industria farmacéutica.

Otra aplicación ventajosa se deriva cuando ag es un anticuerpo y c su antígeno. La población unida recuperada p es un anticuerpo anti-idiotipo que tiene numerosas utilizaciones en la investigación y el diagnóstico y en la industria farmacéutica.

En la actualidad es difícil de seleccionar directamente anticuerpos anti-idiotipos. Los pAbs proporcionarían la capacidad para llevarlo a cabo directamente mediante la unión a librerías de pAb (por ejemplo librerías naíf) para células B (que expresan anticuerpos en su superficie) y el aislamiento de aquellos fagos que se unan de forma adecuada.

En algunos ejemplos, puede ser ventajoso preseleccionar la población p. Por ejemplo, en el ejemplo del anti-idiotipo anterior, p puede estar absorbido contra un anticuerpo relacionado que no se une al antígeno.

Sin embargo, si c es pAb, entonces cualquiera de los dos c y p puede marcarse ventajosamente de alguna forma para distinguirlos y seleccionarlos por su unión a p respecto a c. Este marcaje puede ser físico, por ejemplo, mediante pre-marcaje de p con biotina; o más ventajosamente, genético. Por ejemplo, c puede estar marcado con una diana de restricción EcoB, mientras que p puede estar marcado con una diana de restricción EcoK (véase Carter, P. y col., 1985, Nuc Acids Res, 13, 4431-4443). Cuando p+c unidos se eluyen del antígeno y se utilizan para infectar la bacterias adecuada, existe una restricción (y por ello una ausencia de crecimiento) de población c (es decir, bacterias de restricción EcoB en este ejemplo). Cualquier fago que crezca, se verá muy enriquecido para estos individuos de p con afinidades de unión superiores. Alternativamente, el marcaje genético puede lograrse mediante marcaje de p con secuencias nuevas, que pueden utilizarse para amplificar específicamente p de la mezcla de PCR.

Dado que los pAbs unidos pueden amplificarse utilizando por ejemplo la PCR o la infección de bacterias, es posible rescatar la especificidad deseada incluso cuando un número insuficiente de individuos están unidos para permitir la detección mediante técnicas convencionales.

El procedimiento preferido para la selección de un fago que exprese una molécula de proteína con una especificidad o afinidad deseada será a menudo la elución de una matriz de afinidad con un ligando. Por ello, pueden utilizarse el propio antígeno o fragmentos de lo mismo para eluir anticuerpos de fagos específicos para el propio antígeno unido a una matriz. Alternativamente, el antígeno homólogo de una especie diferente puede unirse a una matriz, una librería de anticuerpos de fagos unida, y anticuerpos de fagos específicos para el propio antígeno pueden eluirse utilizando el propio antígeno. Por ejemplo, un antígeno bovino puede estar unido a la matriz, a una librería de anticuerpos de fagos humanos unida y al antígeno humano utilizado para la elución. Los anticuerpos anti-auto aislados de ese modo serán específicos para epitopos compartidos entre los antígenos bovinos y humanos. Otra alternativa aunque menos preferida puede ser la unión del fago de forma no específica a una columna y la elución con el propio antígeno. Por ejemplo, si una librería de fagos Fab se une a una columna de afinidad anti-Fab, puede lavarse a un pH que no eluya el fago no específico y a continuación lavarse con una solución que es la misma excepto que contiene el propio antígeno, eluyendo gracias a una mayor afinidad para la fase móvil de los anticuerpos de expresión en fagos contra el propio antígeno.

Para cada uno de estos formatos de elución con concentraciones crecientes de ligando deberían eluirse fagos que expresen moléculas de unión de afinidad creciente. Sin embargo, cuando un pAb se une a su antígeno con elevada afinidad o avidez (u otra proteína con su pareja de unión) puede que no sea posible eluir el pAb de una matriz de afinidad con la molécula relacionada con el antígeno. Alternativamente, puede que no sea posible preparar moléculas de elución específica a una concentración suficientemente elevada. En estos casos es necesario utilizar un procedimiento de elución que no sea específico para por ejemplo el complejo antígeno-anticuerpo. Algunos de los procedimientos de elución no específicos utilizados reducen la viabilidad de los fagos, por ejemplo, la viabilidad de fagos se reduce con el tiempo a pH 12 (Rossomando, E.F. y Zinder N.D. J. Mol Biol 36, 387-399, 1968). Pueden existir interacciones entre los anticuerpos y las matrices de afinidad que no puedan romperse sin eliminar completamente la infectividad del fago. En estos casos, se requiere un procedimiento para eluir fagos que no se base en la disrupción de la interacción antígeno-anticuerpo. Por ello se generó un procedimiento que permite la elución de pAbs unidos n condiciones moderadas (reducción de un grupo ditiol con ditiotreitol) que no rompe la estructura del fago (Ejemplo 47 de la patente internacional WO92/01047).

El procedimiento de elución moderada utiliza la unión de la población de fagos con el antígeno biotinilado y la unión con bolas magnéticas con estreptavidina. Después de un lavado para eliminar el fago no unido, el anticuerpo de fagos se eluye y se utiliza para infectar células para proporcionar una población de anticuerpo de fagos. Un enlace disulfuro entre la biotina y la molécula de antígeno permite la elución moderada con ditiotreitol. Una vía en especial ventajosa de realización de esta selección es utilizar el antígeno biotinilado en exceso pero a una concentración igual o superior a la concentración equivalente de la constante de disociación deseada para la unión del antígeno-anticuerpo. El procedimiento es ventajoso para la selección de anticuerpos de alta afinidad (R.E. Hawkins, S.J. Russell y G. Winter, J. Mol. Bioll. 226, 889-896, 1992). Los anticuerpos también pueden seleccionarse por sus constantes de disociación con el antígeno de selección tal como se describe en R.E. Hawkins y col., 1992, *supra*. La concentración del antígeno biotinilado puede reducirse gradualmente para seleccionar anticuerpos de fagos de mayor afinidad. Como una alternativa, el anticuerpo de fago puede estar en exceso sobre el antígeno biotinilado descrito por J.K. Scott & G.P. Smiths (Science 249, 386-390, 1990).

Este procedimiento de elución es sólo un ejemplo en condiciones moderadas. Un procedimiento particularmente ventajoso sería introducir una secuencia nucleotídica que codifica aminoácidos que constituyen un sitio de reconocimiento para el corte con una proteasa específica entre el gen foráneo insertado, en este ejemplo un gen para un fragmento de anticuerpo, y la secuencia del gen III restante. Ejemplos de dichas proteasas altamente específicas son el Factor X y la trombina. Después de la unión del fago con una matriz de afinidad y la elución para eliminar el fago de unión no específica y el fago de unión débil, los fagos unidos fuertemente deberían recogerse por lavado de la columna con proteasas en condiciones adecuadas para la digestión en el sitio de corte. Ello cortaría el fragmento de anticuerpo de la partícula del fago mediante elución del fago. Se espera que estos fagos sean infectivos, ya que únicamente se habría introducido específicamente el sitio de la proteasa. Los fagos de unión fuerte deberían recuperarse mediante infección con células *E. coli* TG1.

Un procedimiento alternativo a lo anterior es tomar una matriz de afinidad que ha retenido el pAb unido y extraer el ADN, por ejemplo mediante ebullición en una solución de SDS. El ADN extraído puede a continuación utilizarse directamente para transformar células huésped de *E. coli* o alternativamente pueden amplificarse las secuencias codificantes del anticuerpo, por ejemplo mediante la utilización de PCR con cebadores adecuados tal como se describe aquí, y luego insertarse en un vector de expresión como un anticuerpo soluble para el estudio posterior o un pAb para rondas adicionales de selección.

Otro procedimiento preferido para la selección de acuerdo con la afinidad debería ser la unión con una matriz de afinidad que contenga cantidades pequeñas de ligando.

Si se desea seleccionar a partir de una población de fagos que expresen una molécula de proteína con una elevada afinidad por su ligando, una estrategia preferida es unir una población de fagos a una matriz de afinidad que contenga una cantidad baja de ligando. Existe competición entre fagos, que expresan proteínas con afinidades altas y bajas, por la unión con el ligando sobre la matriz. El fago que expresa una proteína de afinidad alta se une preferentemente y el que expresa una proteína de afinidad baja se elimina con los lavados. La proteína de afinidad alta se recupera entonces mediante elución con el ligando o mediante procesos que eluyen los fagos de la matriz de afinidad (el Ejemplo 35 de la patente internacional WO92/01047 demuestra este proceso).

En resumen, para la recuperación del ADN empaquetado de la etapa de afinidad, el paquete puede eluirse simplemente, puede eluirse en presencia de un miembro sbp homólogo que compita con dicho paquete por la unión a un miembro sbp complementario, podría eliminarse mediante ebullición, podría eliminarse mediante corte proteolítico de la proteína; y otros procedimientos serán evidentes a los expertos en la materia, por ejemplo, destruyendo el enlace entre el sustrato y el miembro sbp complementario para liberar el ADN empaquetado y el miembro sbp. En cualquier caso, el objetivo es obtener el ADN del paquete de modo que pueda utilizarse directa o indirectamente, para expresar el miembro sbp codificado.

La eficiencia de este proceso de selección para pAbs y la capacidad para crear librerías muy grandes significa que las técnicas de inmunización desarrolladas para aumentar la proporción de las células cribadas productoras de anticuerpos de interés no será un requisito absoluto. La técnica permite el aislamiento rápido de las especificidades de unión, por ejemplo especificidades de unión al antígeno, incluyendo aquellos que sería difícil de obtener o incluso no factibles de obtención mediante técnicas convencionales, por ejemplo, anticuerpos catalíticos o anti-idiopáticos. Hoy en día, es posible La eliminación de la fuente animal, una vez construida la librería completa del repertorio inmune.

Aplicaciones de anticuerpos contra auto-antígenos

Anticuerpos humanos contra componentes de superficie celular. El aislamiento de dichas especificidades de anticuerpo sería de especial utilidad para la preparación de agentes que medie la muerte celular por ejemplo de células cancerosas, por ejemplo utilizando la función efectora de anticuerpos. Los auto-anticuerpos también pueden valiosos en la preparación de reactivos para el diagnóstico mediante el análisis por la imagen *in vivo*, por ejemplo mediante radioisótopos.

Los anticuerpos dirigidos contra los componentes de superficie celular de subgrupos de células T podrían utilizarse terapéuticamente (D. Wraith y col., Cell, 57, 709-715, 1989); L. Steinman y R. Mantegazza FASEB J. 4, 2726-2731, 1990), por ejemplo para prevenir la acción de las células T que causan la artritis reumatoide.

Anticuerpos humanos que modifican la función de auto- moléculas

Pueden aislarse anticuerpos que modifiquen la acción de auto-moléculas como hormonas, factores de crecimiento y receptores a través de su unión con un epitopo específico sobre la molécula. Las proteínas multifuncionales pueden tener tanto características deseables como no deseables, en particular si se utilizan terapéuticamente. Por ejemplo, la linfoquina TNF (factor de necrosis tumoral) se une por lo menos a dos clases distintas de receptores celulares - uno comúnmente hallado en las células vasculares endoteliales, el otro hallado comúnmente en las células tumorales. Se ha generado un anticuerpo de ratón contra al TNF que previene la unión del TNF a los receptores de células endoteliales, mientras permite la unión a células tumorales permitiendo el ataque de los tumores mediado por células endoteliales sin efectos secundarios tóxicos (patente PCT/AU90/00337). Para la utilización de modificadores terapéuticos de moléculas de hormonas o de factores de crecimiento, sería preferible tener una especificidad de anticuerpo humano aislado directamente tras selección de una librería de fagos.

Anti-idiotipos humanos

Los anticuerpos anti-idiotipos (anticuerpos dirigidos contra sitios de combinación antigénica formados por dominios variables de anticuerpos humanos) se generaron de forma convencional mediante el aislamiento de un anticuerpo contra un antígeno y a continuación utilizando este anticuerpo aislado como un inmunógeno para generar anticuerpos dirigidos contra éste. Si el anticuerpo original se dirige contra una hormona o factor de crecimiento, la relación entre el antígeno y los sitios de combinación en el anticuerpo significa que el anti-idiotipo puede mimetizar en algunos aspectos la hormona o el factor de crecimiento y unirse al receptor para estas moléculas. Sin embargo, se esperaría que la fracción de anticuerpos anti-idiotipo capaz de mimetizar la unión de la hormona con el receptor fuera pequeña. Además, la deleción de los linfocitos anti-auto significaría que utilizando la vía convencional contra anti-idiotipos

sería difícil el aislamiento de anticuerpos anti-idiotipos que mimeticen moléculas de unión a receptores humanos. En esta aplicación, se muestra que los anticuerpos dirigidos contra los sitios de combinación antigénicos formados por dominios variables de anticuerpos humanos pueden aislarse directamente de librerías de expresión en fagos, tal como se muestra en los ejemplos 1 y 4, y debería también ser posible identificar los anticuerpos anti-idiotipos que mimetizan la unión de la hormona directamente mediante el cribado por la unión con el receptor.

Los anti-idiotipos también pueden ser de utilidad para el tratamiento de la enfermedad autoinmune. Podrían utilizarse para unir auto-anticuerpos circulantes. Sin embargo, podría ser preferible atacar directamente a las células productoras de anticuerpos, por ejemplo utilizando un anticuerpo biespecífico dirigido contra un marcador de superficie celular así como una especificidad de anti-idiotipo. Alternativamente, la plasmaféresis podría utilizarse para eliminar el anticuerpo circulante y las células tratadas directamente.

Anticuerpos humanos dirigidos contra receptores

Los anticuerpos humanos que se unen a receptores, bloqueando o antagonizando la función del ligando podrían seleccionarse directamente de una librería de fagos que expresan anticuerpos derivados de un donante no inmunizado.

Anticuerpos humanos para prevenir el rechazo del trasplante

Anticuerpos dirigidos contra las proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor, con el fin de prevenir el rechazo. Se han utilizado anticuerpos dirigidos contra ciertos marcadores de superficie celular de linfocitos para prevenir el rechazo en trasplantes, por ejemplo, CD45, CD3, CD4, CD8 y el receptor de la interleuquina-2. El ejemplo 3 muestra que los anticuerpos humanos contra CD4 pueden aislarse directamente de librerías de expresión en fagos.

Anticuerpos humanos contra citoquinas

Los anticuerpos humanos dirigidos contra citoquinas podrían ser valiosos para el tratamiento de enfermedades humanas, por ejemplo del choque séptico con anticuerpos anti-TNF y anti-interleuquina 1. Ejemplos 1 y 6 muestran que los anticuerpos humanos contra el TNF pueden aislarse directamente de librerías de anticuerpos de fagos a partir de humanos no inmunizados o recombinación sintética de fragmentos V, D y J. En muchos casos las moléculas de citoquinas están altamente conservadas entre especies, por ejemplo, el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), y se ha demostrado la dificultad de aislar directamente los anticuerpos contra la molécula humana incluso en ratones. El aislamiento de anticuerpos anti-auto tal como se describió en la presente invención proporciona un procedimiento de obtención de anticuerpos humanos con dicha especificidad.

Anticuerpos humanos para el diagnóstico y tratamiento de trastornos cardiacos

Los anticuerpos humanos contra los componentes del coágulo, por ejemplo la fibrina, podrían ser de utilidad para el análisis por la imagen de coágulos cuando se marcan con radioisótopos o para disolver los coágulos, si por ejemplo están unidos a una enzima que disuelve el coágulo como la uroquinasa.

Anticuerpos que desencadenan la actividad del receptor

Pueden seleccionarse anticuerpos que se unan a un receptor celular y desencadenen una respuesta biológica en la célula. Ello se describe con mayor detalle en el Ejemplo 8 que describe el aislamiento de dichos anticuerpos.

Mediante ciclos de crecimiento y selección, se aíslan aquellos rgdps que se unen a los receptores celulares. Algunos de estos rgdps codifican anticuerpos de unión con el potencial (sólo o en combinación con otras especificidades de unión) para provocar los receptores. Estas especificidades de unión se analizan solas, o en combinación, para desencadenar la actividad de los receptores celulares.

Existen diversos receptores celulares en los que la unión de un ligando, por ejemplo una hormona, un factor de crecimiento o un péptido desencadena un evento biológico, por ejemplo la activación de la actividad tirosina quinasa, o la apertura de un canal iónico. Los rgdps podrían seleccionarse para la unión al receptor celular (o un receptor relacionado con porciones conservadas superficies tal como de otra especie), por ejemplo mediante utilización de células que expresan el receptor celular, o utilización de un receptor soluble inmovilizado sobre una fase sólida, o utilización de dominios o epitopos peptídicos del receptor. Idealmente, el receptor podría proporcionarse en una forma unida (tal como se requiera para su activación).

La activación de receptores en la superficie celular a menudo parece implicar el movimiento relativo de proteínas o subunidades. Por ejemplo, en los receptores de entrada de neurotransmisores, las cinco subunidades que están ordenadas simétricamente en el lugar de la membrana, delinean una vía iónica hacia el centro. La unión del neurotransmisor altera el tamaño del canal iónico central causando reordenaciones pequeñas entre las subunidades en una transición alostérica. Para los receptores tirosin quinasa, el ligando parece conducir la oligomerización del receptor. Por ello los anticuerpos con especificidades de unión dirigidas contra un receptor pueden tener el potencial de promover un cambio alostérico o promover la oligomerización. La oligomerización de los receptores también puede ser promovida mediante la utilización de anticuerpos bivalentes o biespecíficos.

Los anticuerpos solubles o fragmentos de anticuerpo pueden ser fragmentos monovalentes, por ejemplo, fragmentos de cadena sencilla Fv o fragmentos Fab, o fragmentos bivalentes, por ejemplo, Fab2 o fragmentos de anticuerpos completos. La bivalencia también puede proporcionarse por otras vías, por ejemplo (1) mediante la codificación de una etiqueta, como un péptido o proteína (por ejemplo, la subunidad de una proteína dimérica) que se auto-asocia por su extremo N- o C-terminal del fragmento monomérico, (2) mediante la utilización de un anticuerpo bivalente que se una al fragmento monovalente, por ejemplo, a una etiqueta C-terminal común, o a un dominio constante de anticuerpo, o (3) mediante unión química.

El anticuerpo biespecífico o los fragmentos biespecíficos también podrían generarse de igual modo que los fragmentos bivalentes. (Para la expresión del anticuerpo biespecífico o del fragmento en la misma célula, los genes que codifican ambas especificidades necesitarían introducirse juntos). Los "brazos" distintos de los anticuerpos podrían dirigirse contra el mismo receptor, por ejemplo contra epitopos diferentes, o contra dos receptores diferentes (para activar los receptores híbridos).

El aislamiento directo de anticuerpo anti-auto a partir de librerías de fagos tal como se describe en la presente invención es importante para permitir el reconocimiento de un gran número de anticuerpos para estos receptores de activación.

Es adecuado diferenciar el modo de generación de los anticuerpos contra receptores a activar tal como se describe y proporciona como un aspecto de la presente invención a partir de la "vía anti-idiopática", en la que los anticuerpos específicos generados en un animal, incluyendo el hombre mediante vacunación del animal mencionado con un antígeno específico son utilizados para vacunar otro animal. De este modo se producen anticuerpo nuevos denominados anticuerpos anti-idiopáticos (Anti-Ids) que son capaces de reconocer y unir el primer grupo de anticuerpos. Algunas especies de estos Anti-ids son capaces de mimetizar las propiedades biológicas específicas del antígeno original. Si por ejemplo, el antígeno fuera una hormona peptídica o un receptor celular, el Anti-id contra la hormona o el antígeno del receptor celular sería capaz de provocar una respuesta de la célula (Véase Gaulton, G.N. y Greane, M.I., 1986. Idiopatic mimicry of biological receptors. Ann Rev Immunol., 4, 253-280; Sege, K. y Petersen, P.A., 1978. Use of anti-idiopatic antibodies as cell surface receptor probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2443-2447, para los ejemplos).

La esencia de la enseñanza actual sobre los Anti-Ids como mimetizadores de antígenos es que se producen como resultado de la generación de anticuerpos contra anticuerpos del antígeno original. Existe sin embargo, cierta controversia sobre si dicha construcción de anticuerpos anti-idiopáticos mimetiza de forma adecuada el antígeno original (S.J. Davis y col., Nature, 358, 76-79, 1992).

Existe por ello una distinción clara entre anticuerpos preparados por una vía anti-idiopática que mimetiza antígenos como los factores de crecimiento o las hormonas, y anticuerpos que se generan directamente para provocar la activación de los receptores. Los anticuerpos derivados por una vía anti-idiopática requieren que el antígeno (hormona, factor de crecimiento) se una al mismo epitopo sobre el receptor, como por ejemplo la hormona, mientras que los anticuerpos derivados de la unión con los receptores no necesitan unirse al mismo epitopo para desencadenar la activación del receptor. Incluso, dichos anticuerpos no necesitan mimetizar una hormona conocida o factor de crecimiento, ya que su especificidad, o unión con el receptor (caracterizado como epitopo, constante de asociación o de disociación) o el aclaramiento sanguíneo es seguramente distinto. El proceso para generar los anticuerpos es también bastante distinto. Los anticuerpos anti-idiotípicos se generan clásicamente mediante inmunización de animales, aunque pueden también aislarse directamente a partir de librerías de expresión en fagos, tal como se describió anteriormente. Los anticuerpos dirigidos contra los propios receptores se generan mediante selección de librerías de genes V (tal como se describió anteriormente).

Al igual que las ventajas sobre la vía anti-idiotípica, los anticuerpos derivados directamente por la unión del receptor pueden incluso tener ventajas sobre la hormona natural o el factor de crecimiento. Por ello, receptores que sean defectuosos para la unión de la hormona o el factor de crecimiento natural (por ejemplo en una enfermedad genética), pueden ser activados por la unión de un anticuerpo a un epitopo distinto.

Como agentes terapéuticos, los isotipos diversos de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que contienen las regiones variables responsables de la especificidad de la molécula presentan diversas propiedades ventajosas sobre la porción bioactiva que mimetizan. Por ejemplo, al contrario que las hormonas naturales, su vida media en circulación puede modificarse fácilmente. Dependiendo del isotipo del anticuerpo o del fragmento elegido, presentan vidas medias circulantes en un paciente del orden de minutos a varias semanas. Si se requiere una utilización a largo plazo o un aclaramiento a corto plazo, es posible lograrlo eligiendo el isotipo de anticuerpo adecuado sin necesidad de utilizar dispositivos de liberación lenta como los implantes, o infusión intravenosa continua, etc.

Además, muchas hormonas o factores de crecimiento o antígenos en general son complejos funcionales con epitopos distintos de cada una de las moléculas que tienen funciones específicas diversas. Los clones de anticuerpo mimetizadores son monofuncionales a este respecto, por lo que podrían utilizarse para producir un efecto biológico específico de una hormona sin efectos secundarios que podrían posteriormente ser desaconsejables para el paciente. Por ello la linfoquina TNF (factor de necrosis tumoral) se une a dos clases distintas de receptores celulares - una común en las células endoteliales vasculares, la otra común a las células tumorales. Si el TNF se modifica de modo que no pueda unirse a los receptores de células endoteliales pero sí a receptores de células tumorales, los tumores son atacados sin que al mismo tiempo se induzcan efectos secundarios muy tóxicos a través de sus receptores vasculares. (Esto se

describe en la patente australiana PCT/AU90/00337). Un anticuerpo mimético es capaz de reconocer el receptor de célula tumoral esperado para eliminar forma muy específica las células tumorales sin producir efectos secundarios tóxicos mediados por el endotelio vascular, ya que no tendría parecido con el epitopo del TNF al cual se unen dichos receptores.

Terminología

Gran parte de la terminología discutida en esta sección se ha mencionado a lo largo del texto en donde ha sido adecuado.

Auto

Un auto-antígeno es un antígeno o epitopo que es capaz de unirse a un sitio de unión de un antígeno formado por un dominio o dominios variables de anticuerpo, el cual está conservado entre miembros de una especie animal y es nativo al cuerpo.

El sistema inmune intenta evitar la generación de anticuerpos contra auto-antígenos. Se ha sugerido que (i) las secuencias de los segmentos de genes V de línea germinal han evolucionado bajo la presión de estar dirigidas contra antígenos y epitopos foráneos, por ejemplo de un patógeno, y no para ser capaces de proporcionar anticuerpos que se unan a sus propios antígenos, y (ii) que, además de ello, la tolerancia inmune causa combinaciones de segmentos génicos que codifican anticuerpo anti-auto las cuales en el caso de que se produzcan serían delecionadas o inactivadas. Consecuentemente, por lo general no existen anticuerpos circulantes contra estos antígenos excepto en ciertas enfermedades, por ejemplo las enfermedades autoinmunes. Un auto-antígeno puede ser uno que no varía entre individuos de una misma especie. Un auto-antígeno puede ser uno para el cual exista variación alélica en una población. La inmunización de un individuo en una especie con un auto-antígeno no se esperaría normalmente que resultara en la generación, o detección de anticuerpos contra el antígeno, excepto quizás cuando la tolerancia se ha roto deliberadamente. Los anticuerpos contra un auto-antígeno no sólo pueden estar presentes en un individuo que sufre de una enfermedad autoinmune. Por otra parte, existen auto-antígenos contra los cuales es posible hallar anticuerpos circulantes en una subpoblación de individuos normales de una especie.

Un auto-antígeno puede ser un antígeno reconocido por los anticuerpos de superficie de célula B pero no por anticuerpos que puedan estar circulando. Quizás no sea posible detectar u obtener anticuerpos circulantes contra un auto-antígeno, excepto si el individuo sufre de una enfermedad o síndrome autoinmune.

Un anticuerpo anti-auto o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene especificidad de unión para un auto-antígeno. Puede reconocer un epitopo que se halla sólo en un auto-antígeno, o puede reaccionar de forma cruzada con un antígeno que será reconocido como foráneo por los individuos de la especie. La presente invención es particularmente adecuada para la producción y el aislamiento de un fragmento de anticuerpo que únicamente se une a un auto-antígeno.

Pareja de unión específica

Este término describe una pareja de moléculas (cada una es un miembro de una pareja de unión específica) que se derivan de forma natural o se generan de forma sintética. Una tal pareja de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad que se une específicamente a, y se define en consecuencia como complementaria con una organización espacial y polar particulares de la otra molécula, de modo que cada miembro de la pareja tiene la propiedad de unirse específicamente uno con otro. Ejemplos de tipos de parejas de unión específica son el antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato, IgG-proteína A.

Miembro multimérico

Este término describe un primer polipéptido que estará asociado con al menos un segundo polipéptido, cuando se expresen los polipéptidos en la forma libre y/o la expresada en la superficie de un sustrato. El sustrato puede proporcionarse por una bacteria. Si hay dos polipéptidos asociados, el complejo polipeptídico asociado es un dímero, si hay tres, es un trímero, etc. El dímero, trímero, multímero, etc., o el miembro multimérico pueden comprender un miembro de una pareja de unión específica.

Ejemplos de miembros multiméricos son los dominios pesados basados en una molécula de inmunoglobulina, los dominios ligeros basados en una molécula de inmunoglobulina, las subunidades del receptor de células T.

Paquete de expresión genética replicable (Rgdp)

Este término describe una partícula biológica que tiene información genética y que proporciona la partícula con la capacidad para replicarse. La partícula puede expresar en su superficie al menos parte de un polipéptido. El polipéptido puede estar codificado por información genética nativa a la partícula y/o colocada artificialmente en la partícula o un ancestro de ésta. El polipéptido así expresado puede ser un miembro de una pareja de unión específica, por ejemplo, los dominios de cadena ligera o pesada basados en una molécula de inmunoglobulina, una enzima o un receptor, etc.

En el contexto de la presente invención, la partícula es un bacteriófago filamentoso como el fd o el M13.

Paquete

Este término describe un paquete de expresión genética replicable en la que la partícula expresa un miembro de una pareja de unión específica en su superficie. El paquete puede ser un bacteriófago que expresa un dominio de unión al antígeno en su superficie. Este tipo de paquete se ha denominado un anticuerpo de fago (pAb).

Anticuerpo

Este término describe una inmunoglobulina producida de forma natural, parcial o totalmente sintética. El término también abarca cualquier proteína que tenga un dominio de unión, el cual es o es homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. Estas proteínas pueden derivarse de fuentes naturales, o producirse parcial o totalmente de forma sintética.

Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulinas y los fragmentos Fab, $F(ab^1)_2$, scFv, Fv, dAb, Fd.

Superfamilia de inmunoglobulinas

Este término describe una familia de polipéptidos, los miembros de los cuales tienen al menos un dominio con una estructura relacionada con la del dominio constante o variable de moléculas de inmunoglobulina. El dominio contiene dos hojas β y generalmente un enlace disulfuro conservado (véase A.F. Williams y A.N. Barcaly 1988, Ann. Rev, Immunol. 6, 381-405).

Ejemplos de miembros de una superfamilia de inmunoglobulina son el CD4, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), la molécula de adhesión intercelular (ICAM). Excepto que se especifique lo contrario en el contexto, la referencia a inmunoglobulinas y homólogos de inmunoglobulinas en esta solicitud incluye miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas y homólogos de lo mismo.

Homólogos

Este término indica polipéptidos que tienen residuos idénticos o conservados en una posición correspondiente con su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término también abarca dos o más secuencias nucleotídicas que codifican polipéptidos homólogos.

Ejemplos de péptidos homólogos son los isotipos de inmunoglobulina y las enzimas con estructura de barril TIM.

Funcional

En relación con un miembro sbp expresado en la superficie de un rgdp, significa que el miembro sbp se presenta en una forma plegada en la cual su dominio de unión específico para su miembro sbp complementario es el mismo o estrechamente análogo al de la configuración nativa, por lo que presenta una especificidad similar respecto al miembro sbp complementario.

Población genéticamente diversa

En conexión con miembros sbp o componentes polipeptídicos de lo mismo, no se refiere únicamente a la diversidad que pueda existir en la población natural de células u organismo, sino también a la diversidad que pueda crearse mediante mutación artificial *in vitro* o *in vivo*.

La mutación *in vitro* puede por ejemplo, implicar la mutagénesis aleatoria mediante la utilización de oligonucleótidos con mutaciones aleatorias de la secuencia deseada a variar. La mutagénesis *in vivo* puede por ejemplo, utilizar cepas mutantes de microorganismos huésped para albergar el ADN (véase el Ejemplo 38, de la patente internacional WO 92/01047). Las palabras "población única" pueden utilizarse para denotar una pluralidad de cadenas de por ejemplo polipéptidos que no son genéticamente diversas, es decir que son la misma. Una población restringida es una que es diversa pero menos que el repertorio completo de un animal, o una librería, sintética u otra. La diversidad puede haberse reducido mediante selección previa, por ejemplo utilizando la especificidad de unión al antígeno.

Dominio

Un dominio es una parte de una proteína que está plegada con ella misma e independientemente de otras partes de la misma proteína e independientemente de un miembro de unión complementario. Una unidad plegada es una combinación específica de una hélice α y/o estructura en hoja β. Los dominios y las unidades plegadas contienen estructuras que acercan aminoácidos que no están juntos en la estructura primaria.

Forma libre

Este término describe el estado de un polipéptido que no se expresa por un paquete de expresión genética replicable.

Condicionalmente defectuoso

Este término describe un gen que expresa un polipéptido defectuoso bajo ciertas condiciones, pero que expresa un polipéptido no defectuoso relacionado pero diferente en otras condiciones. Un ejemplo es un gen que contiene una mutación ámbar expresada en huéspedes no supresores o supresores respectivamente.

Alternativamente, un gen puede expresar una proteína que es defectuosa en ciertas condiciones, pero no en otras. Un ejemplo es un gen con una mutación sensible a la temperatura.

Codón de parada traduccional suprimible

Este término describe un codón que permite la traducción de secuencias nucleotídicas cadena abajo del codón en ciertas condiciones, pero en otras condiciones la traducción finaliza en el codón. Un ejemplo de codones de parada suprimibles son los codones ámbar, ocre y ópalo.

Cepa mutadora

Este término designa una célula huésped que tiene un defecto genético que causa que el ADN que se replica mute respecto al ADN parental. Ejemplo de cepas mutadoras son NR9046mutD5 y NR9046 mut T1 (véase el Ejemplo 38 de la patente internacional WO92/01047).

Fago auxiliar

Este término designa un fago que se utiliza para infectar células que tienen un genoma de fago defectuoso y que funciona para complementar el defecto. El genoma del fago defectuoso puede ser un fagémido o un fago con algunas secuencias génicas codificantes funcionales delecionadas. Ejemplos de fagos auxiliares son el M13KO7, M13K07 gen III no. 3; y fagos que expresan o codifican una molécula de unión fusionada con una proteína de la cápside.

Vector

Este término es una molécula de ADN, capaz de replicarse en un organismo huésped, en el cual se ha insertado un gen para generar una molécula de ADN recombinante.

Vector fago

Este término designa un vector derivado por modificación de un genoma de fago, que contiene un origen de replicación para un bacteriófago, pero ninguno para un plásmido.

Vector fagémido

Este término es un vector derivado de un genoma plasmídico, que contiene un origen de replicación para un bacteriófago así como un origen de replicación del plásmido.

Secretado

Este término describe un rgdp o una molécula que se asocia con el miembro de un sbp expresado en el rgdp, en el que el miembro sbp y/o la molécula, se ha plegado y el paquete se ha ensamblado externamente al citosol celular.

Repertorio de genes de inmunoglobulina reordenados

Este término designa una colección de nucleótidos que ocurren de forma natural por ejemplo secuencias de ADN que codifican genes de inmunoglobulina expresados en un animal. Las secuencias se generan por reordenamiento *in vivo* de por ejemplo segmentos V, D y J para las cadenas H y por ejemplo segmentos V y J para las cadenas L. Alternativamente, las secuencias pueden generarse a partir de una línea celular inmunizada *in vitro* y en la cual tiene lugar el reordenamiento en respuesta a la inmunización intracelular.

Librería

Este término designa una colección de nucleótidos, por ejemplo secuencias de ADN en los clones; o una colección diversa genéticamente de polipéptidos, o miembros de parejas de unión específica o polipéptidos o miembros sbp que se expresan en los rgdps capaces de ser seleccionados o cribados para proporcionar un polipéptido individual o miembro sbp o una población mixta de polipéptidos o miembros sbp.

Repertorio de genes de inmunoglobulina reordenados artificialmente

Este término designa una colección de nucleótidos por ejemplo de secuencias de ADN derivadas total o parcialmente de una fuente distinta a las secuencias de inmunoglobulina reordenadas de un animal. Ello puede incluir por ejemplo, secuencias de ADN que codifican dominios VH por combinación de segmentos V no reordenados con segmentos D y J y secuencias de ADN que codifican dominios VL mediante combinación de segmentos V y J.

Las secuencias de ADN pueden derivarse parcial o totalmente mediante síntesis oligonucleotídica.

Péptido líder secretor

Este término designa una secuencia aminoacídica unida por su extremo N-terminal a un polipéptido, dicha secuencia dirige el movimiento del polipéptido fuera del citosol.

Eluyente

Este término designa una solución utilizada para romper la unión entre dos moléculas. La unión puede ser un enlace (o enlaces) covalente o no-covalente. Las dos moléculas pueden ser miembros de un sbp.

Derivado

Este término designa un polipéptido que deriva de otro polipéptido que está codificado por el ADN en un rgdp seleccionado. El polipéptido derivado puede diferenciarse del polipéptido codificado por la adición, deleción, sustitución o inserción de aminoácidos, o por la unión a otras moléculas con el polipéptido codificado. Estos cambios pueden generarse a nivel proteico o nucleotídico. Por ejemplo, el polipéptido codificado puede ser un fragmento Fab que luego se une a una cola Fc de otra fuente. Alternativamente, marcadores como enzimas, fluoresceínas, etc., pueden unirse por ejemplo a fragmentos Fab, scFv.

Descripción resumida de las figuras

La Figura 1, muestra un análisis de ELISA de las especificidades de Fvs de cadena sencilla (scFvs) aislados de la librería no inmunizada mediante selección con tiroglobulina soluble (panel superior), TNFα humano (panel central), o mAb Fog-1 humano (gamma-1, Kappa). La unión se determinó mediante ELISA con un panel de proteínas, tal como sigue: 1- plástico; 2- inhibidor de tripsina de huevo de gallina; 3- quimotripsinógeno A; 4- ovalbúmina de huevo de gallina; 5- hemocianina de la lapa californiana; 6- tiroglobulina bovina; 7- TNFα humano; 8- lisozima de la clara de huevo de pavo; 9- citocromo de corazón de caballo; 10- albúmina sérica bovina; 11- mAb Fog-1.

La Figura 2 muestra un análisis de ELISA de las especificidades de scFvs solubles aislados de la librería no inmunizada por selección con el antígeno carcinoembrionario humano (CEA) (panel superior), péptido MUC1 (Price y col., 1990, *supra*) (panel central), o CD4 humano (panel inferior). La unión se determinó mediante ELISA con un panel de proteínas, tal como sigue: 1- inhibidor de tripsina de huevo de gallina; 2- quimotripsinógeno A; 3- ovalbúmina de huevo de gallina; 4- hemocianina de la lapa californiana; 5- CEA; 6- extracto de orina que contiene mucina epitelial polimórfica (PEM); 7- tiroglobulina bovina; 8- lisozima de la clara de huevo de pavo; 9- albúmina sérica bovina; 10- globulina gamma de pollo acoplada a 4-hidroxi-3-nitrofenil-acético; 11- CD4 soluble recombinante humano.

La Figura 3, muestra un ELISA para analizar la unión de tres scFvs, aislado por selección con un anticuerpo monoclonal humano Fog-1 (IgG1, kappa), con un panel de anticuerpos humanos de isotipo variable, como sigue: 1- Fog-1; 2- el fragmento Fv de Hulys 11; 3- anticuerpo de Hulys11 (IgG1, kappa); 4- RegA (IgG1, Kappa); FogC (IgG3, Kappa); 6- Pag1 (IgG1, lambda); 7IgG2, anticuerpo lambda purificado de plasma de mieloma (Sigma); 8- Oak3 (IgG3 lambda); 9- IgG4, lambda purificado de plasma de mieloma (Sigma); 10 Fom1 (IgM, lambda); 11- FomA (IgM, lambda).

La Figura 4 muestra el ensamblamiento de genes VH en la creación de una librería sintética.

La Figura 5 muestra esquemáticamente las técnicas de selección para pAbs: 2(i) muestra el sistema de unión/elución; 2(ii) muestra un sistema de competición (p = pAb; ag = antígeno al que se requiere la unión con pAb; C = población competidora por ejemplo anticuerpo, pAb, ligando; s = sustrato (por ejemplo bolas de plástico etc.); d = sistema de detección).

La presente invención se ilustra por los ejemplos siguientes. Los cebadores oligonucleotídicos y sondas mencionados en el texto se listan en la Tabla IV. Las Tablas I a IV se hallan después del Ejemplo 8.

Los ejemplos 1-4 y 8 se refieren a los ejemplos y no se hallan dentro del ámbito de las reivindicaciones.

El Ejemplo 1 muestra el aislamiento de anticuerpos dirigidos contra el factor-α de necrosis tumoral y un anticuerpo monoclonal humano de una librería de fagos de fragmentos Fv de cadena sencilla derivada de un humano no inmunizado.

El Ejemplo 2 muestra el aislamiento de anticuerpos que se unen a la tiroglobulina humana de una librería de fagos de fragmentos Fv de cadena sencilla derivados de un humano no inmunizado.

El Ejemplo 3 muestra el aislamiento de fragmentos de anticuerpo dirigidos contra los auto-antígenos MUC1 mucina, antígeno carcinoembrionario humano (CEA) y CD4 soluble recombinante (rsCD4) de una librería de expresión en fagos de fragmentos Fv de cadena sencilla derivada de un humano no inmunizado.

El Ejemplo 4 muestra la caracterización posterior de fragmentos de anticuerpo anti-auto por secuenciación de ADN y determinación de afinidad.

El Ejemplo 5 muestra la creación de una librería humana sintética con segmentos VH de línea germinal.

El Ejemplo 6 muestra el aislamiento de un fragmento de anticuerpo unión al factor-α de necrosis tumoral humano de una librería sintética de línea germinal.

El Ejemplo 7 muestra la creación de una librería humana sintética utilizando segmentos VH de línea germinal humana que contenían secuencias VH CDR3 de longitudes diferentes y el aislamiento de fragmentos Fv de cadena sencilla de unión a la tiroglobulina humana y a un anticuerpo monoclonal humano.

El Ejemplo 8 muestra el aislamiento de anticuerpos humanos dirigidos contra las moléculas de receptor de la interleuquina-1 humana que activan la función del receptor.

Ejemplo 1

Aislamiento de fragmentos de anticuerpo dirigidos contra auto-antígenos de una librería de scFvs hechos a partir de donantes de sangre no inmunizados

Los genes V que naturales aislados de los linfocitos de sangre periférica humanos se pueden incluir en una extensa librería de fragmentos de anticuerpo que contienen reactividades contra antígenos a los que el donante no ha sido expuestos (Patente internacional WO92/01047 ejemplo 42). Hemos advertido que estas librerías pueden también contener reactividades contra auto-antígenos, que surgen tanto de las células B auto-reactivas que no han sido eliminadas o como fragmentos que no ocurren naturalmente y que resultan de la recombinación de las cadenas VH y VL. Para probar esto, recorrimos una extensa librería scFv humana desplegada en la superficie de un fagémido contra el TNF-a humano y una inmunoglobulina IgG/k humana.

Métodos

Rescate de la librería

La librería de scFvs se construyó a partir del ARN de linfocitos de sangre periférica humanos y se ha descrito previamente (patente internacional WO92/01047 ejemplo 42). Para rescatar al fago que expresa los fragmentos de anticuerpo, se utilizaron aproximadamente 10^9 *E. coli* que albergaban el fagémido para inocular 50 ml de 2 x TY que contenía un 1% de glucosa y 100 mg/ml de ampicilina (2 x TY-AMPGLU) y se crecieron hasta una D.O. de 0,8 con agitación. Cinco ml de este cultivo se utilizaron para inocular 50 ml de 2 x TY-AMPGLU, 2 x 10^8 TU del auxiliar del gen-delta 3 (M13 D gen III, ver patente internacional WO92/01047) se añadieron y el cultivo se incubó a 37ºC durante 45 minutos sin agitación y luego a 37ºC durante 45 minutos con agitación. El cultivo se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 min. y el sedimento se resuspendió en 2 litros de 2 x TY que contenía 100 mg/ml de ampicilina y 50 mg/ml de kanamicina y se creció durante una noche. El fago se preparó como se describió previamente (Patente internacional WO92/01047 ejemplo 42). El M13 D genIII se preparó como sigue:

El fago auxiliar M13 D gen III no codifica la proteína del gen III, por tanto, el fago(fagémido) que expresa los fragmentos de anticuerpo tiene una avidez mayor para unirse al antígeno. Las partículas de M13 D gen III infecciosas se producen creciendo el fago auxiliar en células que albergan un derivado de pUC19 que proporciona la proteína gIII natural durante la morfogénesis del fago. El cultivo se incubó durante 1 hora a 37ºC sin agitación y luego durante otra hora más a 37ºC con agitación. Las células se centrifugaron (IEC-Centra 8, 4000 revoluciones/min durante 10 min), se resuspendieron en 300 ml de medio 2 x TY que contenía 100 mg de ampicilina/ml y 25 mg de kanamicina/ml (2 x TY-AMP-KAN) y se crecieron durante una noche, agitando a 37ºC. Las partículas de fago se purificaron y se concentraron del medio de cultivo mediante dos precipitaciones con PEG (Sambrook y col., 1990), resuspendidas en 2 ml de PBS y filtradas a través de un filtro de 0,45 mm (Minisart NML; Sartorius) para dar una concentración final de aproximadamente 10^{13} unidades de transducción/ml (clones resistentes a ampicilina).

Cribado de la librería

Immunotubos (Nunc) se recubrieron con 4 ml de 100 mg/ml ó 10 mg/ml del recombinante humano TNF-a en PBS o 4 ml de 10 mg/ml de Fog-1, una inmunoglobulina IgG/k humana que reconoce el antígeno Rh (D)de los glóbulos rojos, durante una noche en PBS. Los tubos se bloquearon con 2% de Marvel-PBS durante 2 horas a 37ºC y entonces se lavaron 3 veces en PBS. Aproximadamente 10^{13} UT del fago se aplicaron al tubo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente volteándose en una plataforma giratoria y entonces se dejaron reposar durante 1,5 horas. Los tubos se lavaron 10 veces con PBS con 0,1% Tween-20 y 10 veces con PBS. El fago se eluyó mediante adición de 1 ml de 100 mM trietilamina y agitándolo 15 minutos en una plataforma giratoria tras lo que la solución se neutralizó inmediatamente con 0,5 ml de Tris-HCl 1,0 M a pH 7,4. El fago se utilizó entonces para infectar 10 ml de *E. coli* TG1 mediante incubación del fago eluido con las bacterias durante 30 minutos a 37ºC. Las *E. coli* se plaquearon entonces en placas TYE que contenían 1% de glucosa y 100 mg/ml de ampicilina. La librería bacteriana resultante se rescató entonces con el fago auxiliar delta gen 3, tal como se describe más arriba para preparar fagos para una serie de selecciones subsecuente. Este proceso se repitió entonces en un total de 4 series de purificación por afinidad con un aumento en el lavado de los tubos a 20 veces con PBS, 0,1% Tween-20 y 20 veces con PBS para las series 3 y 4.

Caracterización de los clones de unión

Los fagos eluidos de las series de selección 3ª y 4ª se utilizaron para infectar *E. coli* HB 2151 y se produjo scFv soluble (Marks, y col., 1991) a partir de colonias simples como ensayo. En el caso del TNF, los fagos se rescataron también de colonias simples. Se realizaron ELISAs en placas de microtitulación recubiertas con 10 μg/ml de TNF-a humano en bicarbonato 50 mM a pH 9,6 o 10 μg/ml de Fog-1 en PBS, tal como se describió anteriormente. Los clones positivos para el ELISA se caracterizaron luego mediante PCR *fingerprinting* (patente internacional WO92/01047 ejemplo 20) y luego mediante secuenciación.

Resultados

TNF: El scFv soluble de 1536 colonias y los fagos de 1152 colonias se cribaron mediante ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 1, que se describe en descripción resumida de las figuras (*supra*). Los clones positivos para la unión a TNF-a se caracterizaron mediante PCR *fingerprinting* y secuenciación. De esta manera, se identificaron 15 binders diferentes y cuatro de éstos se secuenciaron.

Fog-1: El scFv soluble de los 96 clones se cribó mediante ELISA y los clones positivos se caracterizaron mediante PCR *fingerprinting* y se secuenciaron. De esta manera, se encontraron y secuenciaron cuatro clones de unión diferentes.

Ejemplo 2

Aislamiento de fragmentos de anticuerpo con especificidad dirigida contra la tiroglobulina humana procedente de una librería de fragmentos scFv utilizando la expresión sobre el bacteriófago fd

El ejemplo 44 de la patente internacional WO92/01047 describe la selección de fragmentos scFv del anticuerpo dirigidos contra la tiroglobulina bovina procedente de una librería de fragmentos scFv. Estos, se derivaron de humanos no inmunizados, se expresaron en la superficie del fago fd, y se aislaron mediante cribado contra la tiroglobulina bovina. Los resultados demostraron que es posible aislar de una librería derivada de un individuo no inmunizado fragmentos de anticuerpo que unirán un antígeno al cual ese individuo nunca ha sido expuesto.

Los dieciséis clones encontrados mediante este cribado que eran específicos para la tiroglobulina bovina han sido analizados para la unión a tiroglobulina humana en un ensayo de ELISA (como se describe en el ejemplo 44 de la patente internacional WO92/01047). Nueve de estos clones también se unían fuertemente a tiroglobulina humana con señales de absorbancia entre 1,0 y 1,6 12 minutos después de la adición del sustrato. No se encontró reactividad cruzada (señal menor de 0,05 tras 90 min) con una serie de antígenos no relacionados- lisozima de huevo de gallina, BSA, ovoalbúmina, quimotripsinógeno, citocromo c, Hemocianina de la lapa californiana, insulina, cardiolipina y ADN.

Así, los anticuerpos con especificidad por los epítopos en el auto-antígeno humano tiroglobulina se pueden aislar de las librerías preparadas de humanos no inmunizados.

Se secuenciaron los clones que unían a ambas tiroglobulinas humana y bovina, α-Thy23 y α-Thy29, y los dos clones que unían a la tiroglobulina bovina únicamente, α-Thy32 y α-Thy33.

Ejemplo 3

Aislamiento de los fragmentos de anticuerpo dirigidos contra el auto-antígeno humano MUC1 a mucina, el antígeno carcinoembrionario (CEA, del inglés: carcinoembryonic antigen) y el CD4 soluble recombinante (rsCD4) de una librería de despliegue de fago de fragmentos Fv de cadena simple humanos

La librería de expresión en fagos de fragmentos Fv de cadena simple derivados de donantes humanos no inmunizados usados en el Ejemplo 1 se utilizó en la selección para aislar fragmentos de anticuerpo dirigidos contra los auto-antígenos de mucina MUC1, el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el CD4 soluble recombinante (rsCD4) de una librería de expresión en fagos de fragmentos Fv de cadena simple humanos.

Rescate de la librería

La librería se rescató como en el ejemplo 1 excepto que se utilizó el fago auxiliar estándar M13KO7 (5 x 10^{10} pfu) para rescatar la librería en lugar de el fago auxiliar delta gen-3 (M13 D gen III).

Selección del fago específico para la mucina MUC1 y el antígeno carcinoembrionario (CEA)

Los fagos se cribaron para la unión con un panel de antígenos utilizando inmuno-tubos (Nunc; Maxisorp) recubiertos con antígenos esencialmente tal como se describió por Marks y col., (1991), o se seleccionaron en una columna con el antígeno (J. McCafferty y col., Nature 348 552-554, 1990). Se utilizaron los siguientes antígenos: CD4 soluble

recombinante humano (CD4 sr) (expresado en baculovirus por American Biotechnologies Inc. y suministrado por el MRC AIDS Reagent Project [ADP608]); el anticuerpo carcinoembrionario humano (CEA); y un péptido de 20 aminoácidos (M.R.Price y col., Molec. Immunol. 27 795-802, 1990), que corresponde a un motivo repetido en la mucina humana MUC1 (mucina epitelial polimórfica asociada a tumor o PEM (del inglés, *polymorphic Epithelial Mucin*)(S. Gendler y col., J. Biol. Chem. 263 12820-12823, 1988; J.R.Gum y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 171 407-415, 1990).

Se recubrieron inmunotubos con CEA (20 mg/ml) y rsCD4 (10 mg/ml) durante una noche a temperatura ambiente en medio salino tamponado con fosfato. Para las dos primeras series de selección los tubos se lavaron 10 veces con PBS, 0,1% (v/v) Tween 20 y 10 veces con PBS. Para las siguientes series de selección los tubos se lavaron 20 veces con PBS, 0,1% (v/v) de Tween 20 y 20 veces con PBS. Los fagos se eluyeron con 100 mM de trietilamina como en (Marks y col., 1991). Los fagos eluidos (normalmente de 10^6 a 10^7 unidades de transducción) se utilizaron para infectar células *E. coli* TG1. Aproximadamente se utilizaron 10^9 bacterias infectadas como inóculo para el siguiente rescate. La librería se sometió a 3-5 series de rescate y selección para cada antígeno.

Para la selección del fago que se une al péptido MUC1, el péptido se acopló químicamente a Sepharose 4B. (proporcionada por M.R. Price). Se preparó una columna de 1 ml, y el fago se seleccionó tal como se describe por McCafferty y col., 1990 (más arriba). Brevemente, la columna Sepharose-MUC1 se lavó con PBS que contenía un 2% de leche desnatada en polvo (MPBS, del inglés milk-PBS) y el fago se cargó en 1 ml del mismo tampón. Tras lavar la columna sucesivamente con volúmenes de 10 ml de MPBS, PBS a pH 7,2, Tris-HCl 50 mM/NaCl 500 mM a pH 8,0, y Tris-HCl 50 mM/NaCl 500 mM a pH 9,0, el fago se eluyó con 5 ml de trietilamina 100 mM y se neutralizó con 0,5 M de tampón de fosfato de sodio a pH 6,8. Se llevaron a cabo cinco series de selección.

Exploración y secuenciación de los clones

Para la unión del fago se rastrearon colonias únicas resistentes a ampicilina procedentes de la infección de *E. coli* TG1 con el fago eluido (Clackson y col., 1991) o fragmentos de scFv soluble (Marks y col., 1991). Puesto que el gen que codifica el fragmento de anticuerpo está unido al que codifica la proteína que recubre el fago mediante un codón ámbar, los fragmentos solubles se pueden secretar desde una línea no supresora de bacterias infectadas por el fago (Hoogenboom y col., 1991). La unión al antígeno de scFvs en el sobrenadante bacteriano se detectó con el anticuerpo de ratón mAb 9E10 (1 mg/ml), que reconoce la etiqueta peptídica C-terminal (Munro y Pelham, Cell 46, 291-300, 1986), y el anticuerpo Fc anti-ratón conjugado a peroxidasa (Sigma), tal como se describe (Ward y col., 1989). Las placas se recubrieron con los antígenos Fog1, TNFa, tiroglobulina bovina y rsCD4 tal como se describió para los inmunotubos más arriba, y con CEA a 5 mg/ml. Un extracto urino que contiene la mucina epitelial polimórfica humana (PEM) se utilizó a una concentración de proteína de aproximadamente 10 mg/ml.

La especificidad de los clones aislados se comprobó mediante ELISA de los fragmentos scFv solubles utilizando placas recubiertas con varias proteínas. Las placas fueron recubiertas con los antígenos Fog-1, TNFa, tiroglobulina bovina, rsCD4, CEA y PEM, tal como se describió más arriba. Otras proteínas se dispusieron de recubrimiento durante la noche a temperatura ambiente a una concentración de 1 mg/ml en PBS (citocromo c [Sigma] o $NaHCO_3$ 50mM, pH 9,6 (albúmina de suero bovina, lisozima de clara de huevo de pavo, lisozima de clara de huevo de gallina, ovoalbúmina de gallina, hemocianina de la lapa californiana [CalBiochem], quimotripsinógeno A, inibidor de la tripsina de la clara de huevo de pollo [Sigma], globulina gamma de pollo acoplada a ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilacético. Los clones que dieron una señal positiva en ELISA se rastrearon mediante PCR y se caracterizaron por *fingerprinting* con la enzima de restricción BstNI tal como se describió por Marks y col., (1991, *supra*) para identificar los diferentes clones. Se seleccionaron ejemplos de clones con diferentes patrones de restricción y las cadenas pesada y ligera se secuenciaron utilizando el equipo Sequenase (USB) o utilizando el equipo Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y el secuenciador Applied Biosystems 373A ADN sequencer.

Los clones secuenciados se analizaron usando el programa MacVector 3.5 (IBI Kodak, New Haven, CT). Los genes V_H se compararon con los 83 segmentos de genes de línea germinal presentes en el directorio de V_H compilado por Tomlinson y col. (J. Mol. Biol. 227 776-798, 1992). Los genes VL se compararon con los 34 segmentos publicados de genes de la línea germinal kappa y los 13 segmentos publicados del gen lambda. Las regiones de los genes-V codificados por los cebadores de PCR no estaban incluidas en el análisis. Los fragmentos de anticuerpos humanos seleccionados muestran una elevada especificidad contra los auto-antígenos.

Tras dos a cinco series de selección, las células de *E. coli* se infectaron con el fago eluido y los fragmentos de anticuerpo producidos por los clones individuales se probaron para su unión mediante ELISA. Los fagos seleccionados con el péptido de 20 aminoácidos MUC1 (Price y col., 1990, *supra*), que correspondían al motivo repetido en la mucina MUC1 humana (mucina epitelial polimórfica asociada a tumor o PEM) (Gendler y col., 1988, *supra*; Gum y col., 1990, *supra*), se probaron para su unión a la PEM humana y que por tanto unían a ambos péptidos y la proteína. Se secuenciaron los genes-V de los clones que presentaban unión, y se identificó un clon para cada antígeno de CEA, PEM y rsCD4 (Tabla 1). La presencia de sólo números bajos de clones que se unen a CEA, PEM y CD4 soluble recombinante (rsCD4), incluso tras varias series de selección, puede reflejar el uso de VCS-M13 (Statagene) como fago auxiliar en lugar de el auxiliar M13DgIII utilizado para otros antígenos). Las poblaciones de partículas de fago (fagémido) producidas mediante el rescate con M13DgIII (que no puede producir pIII) tienen una avidez media mayor que aquellos que se producen por rescate con VCS-M13 (donde el tipo silvestre pIII codificado por el fago auxiliar puede competir con el complejo scFv-pIII).

Los fragmentos scFv se probaron entonces para la unión a una serie de antígenos de otras proteínas, y se encontró que eran altamente específicos. Esto se ilustra en la fig. 2 con los clones individuales que presentan unión a CEA, MUC1 y rsCD4 humanas. Ver la descripción resumida de la figura 2 (*supra*) para su interpretación.

Así, los fragmentos de anticuerpo dirigidos contra los auto-antígenos humanos CEA y MUC1 (que son marcadores tumorales) y rsCD4 pueden derivarse de la misma librería y todos tienen una alta especificidad por el antígeno.

Ejemplo 4

Caracterización de fragmentos de anticuerpo anti-auto mediante secuenciación de ADN y unión a antígeno

Los fragmentos de anticuerpo anti-auto aislados en los ejemplos 1, 2 y 3 se caracterizaron mediante secuenciación de ADN y unión a antígeno.

Los fragmentos de anticuerpo se derivan de un rango de genes-V sin mutar y mutados somáticamente.

Las secuencias de distintos clones con auto-especificidad se determinaron al igual que en el ejemplo 3 y contienen ambas cadenas ligeras (Tabla II). La comparación con las secuencias de los segmentos de los genes-V de la línea germinal más próxima indica que se utilizan familias distintas (V_H1, 3, 4 y 5; Vk1 y 4, V11, 2 y 3). En unos pocos casos los genes-V son completamente de línea germinal, por ejemplo ambos genes V_H y V1 de un Thy-29. Sin embargo, la mayoría de los genes-V tiene varias diferencias con los segmentos de los genes-V de la línea germinal más próxima, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos (Tabla II), lo que sugiere que éstos derivan de células B mutadas somáticamente. Algunas mutaciones pueden haberse producido durante la amplificación por PCR y el proceso de amplificación, por ejemplo los genes-VH de FOGI-G8 y MUCI-1, y el gen-Vk de Thy-33 probablemente se producen de un cruce entre dos genes-V durante la amplificación por PCR (Tabla II). Además, las grandes diferencias (por ejemplo el Vk de FOGI-H6 que difiere en 36 nucleótidos) pueden ser debidas al uso de segmentos desconocidos del gen-V. Hay una asombrosa homología en el CDR3 de cadena pesada entre TNF-A1 y TNF-E1: los genes-V de la línea germinal son diferentes pero se utilizan los mismos segmentos JH, y 11/16 residuos de CDR3 son idénticos. Esto sugiere que ambos fragmentos scFv puedan unirse al mismo epítopo del TNF. Los fragmentos de anticuerpo se dirigen a diferentes epítopos de la misma proteína.

Los fragmentos scFv dirigidos contra la tiroglobulina bovina del ejemplo 2 se probaron para la unión a la tiroglobulina humana, que difiere en sólo 6 aminoácidos en el pro-proteína (Malthiéry,Y. y Lissitzky, S. (1987) Eur. J. Biochem., 165, 491-498). Cuatro de los doce clones (incluyendo aThy-29) se unieron a la tiroglobulina humana, mientras que el resto (incluyendo a aThy-32 y aThy-33) no lo hicieron (datos no mostrados). Así mismo, los fragmentos que se unían al anticuerpo humano Fog-1 se probaron para su unión a una serie de otros anticuerpos que diferían en los isotipos de las cadenas pesada y ligera (Fig.3). Ver la descripción resumida de la Figura 3 para mayor comprensión (*supra*). El fragmento aFOG1-A4 se unía a todos los isotipos de cadena pesada g1, 2 y 3, pero no a g4 o m. En contraste, los fragmentos aFOG1-H6 y aFOG1-A3 no se unieron a ninguno de los otros anticuerpos, incluyendo aquellos del mismo isotipo de Fog-1, lo que sugiere que éstos están dirigidos al dominio variable de Fog-1.

Caracterización de los fragmentos scFv seleccionados

Los clones siguientes se eligieron de una purificación a gran escala y la posterior caracterización: aFOG1-H6, aFOG1-A3, aTNF-E7, y aThy-29. Las colonias de la línea de *E. coli* HB2151 no supresoras que albergan al fagémido adecuado se utilizaron para inocular 2 litros de 2 x TY que contenía 100 mg de ampicilina/ml y 0,1% de glucosa. Los cultivos se crecieron e indujeron (De Bellis,D. y Schwartz,I. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 1311) y los fragmentos scFv marcados se purificaron usando el mAb 9E10 como en (Clackson y col., 1991, *supra* y la patente internacional WO92/01047).

La inhibición de 125I-Fog-1 que se une al antígeno humano Rh D por los fragmentos scFv aFOG1-H6 y aFOG1-A3 purificados por afinidad se realizó esencialmente como (Gorick, B.D., Thompson, K.M., Melamed, M.D. y Hughes, J.N. (1988) Vox. Sang., 55, 165-170) con las siguientes modificaciones. Se preincubaron 0,0148 μg de 125I-FOG1 con cantidades variables de fragmentos scFv aFOG1-H6 o aFOG1-A3 purificados (0-16 μg) a 37ºC durante 1,5 horas, antes de añadir 0,5 μl de células R1R2 (o células rr como control). La mezcla se incubó entonces durante otras 1,5 horas a 37ºC con agitación constante, y finalmente se separaron las células del sobrenadante. Como control, se llevó a cabo una valoración con un fragmento scFv purificado dirigido contra la lisozima de clara de huevo de pavo (aTEL9) (Marks y col., 1991, *supra*).

Las cuantificaciones cinéticas se hicieron usando resonancia de plasmones de superficie (BIAcore, Pharmacia Biosensor AB) (Jönsson, U., Fägerstam, L., Ivarsson, B., Lundh ,K., Löfås, S., Persson, B., Roos, H., Rönnberg, I., Sjölander, S., Stenberg, E., Ståhlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H. y Malmqvist, M. (1991) BioTechniques, 11, 620-627; Jönsson, U. y Malmqvist,M. (1992) In Turner, A. (ed.), Real Time Biospecific Interaction. JAI Press Ltd., San Diego, Vol. 2, pp. 291-336). Para separar las especies monoméricas y multiméricas, los fragmentos scFv purificados se concentraron mediante ultracentrifugación y luego se fraccionaron en una columna de FPLC calibrada Superdex 75 (Pharmacia) en PBS, EDTA 0,2 mM. La filtración en gel se siguió tanto mediante la absorbancia a 280 nM como en línea con un BIAcore con el antígeno inmovilizado en el chip sensor (Johnsson y col., 1991).

Los experimentos cinéticos se llevaron a cabo en dos configuraciones diferentes. Primero, para analizar la unión del scFv soluble, los diferentes antígenos se inmovilizaron covalentemente en el chip sensor (en el caso de mAb Fog-1, el anticuerpo también se inmovilizó a través de un mAb de cadena ligera kappa de ratón anti-humano utilizando un chip sensor cubierto con un anti-ratón IgG1 de conejo). Segundo, para analizar la unión del mAb FOG-1 soluble, el scFv aFOG1-H6 se inmovilizó en la superficie del chip.

Los antígenos se acoplaron al chip sensor CM5 a través de sus grupos amino utilizando el equipo Amine Coupling Kit (Pharmacia Biosensor AB)(Johnsson,B., Löfås, S. y Lindqvist,G. (1991) Anal. Biochem., 198, 268-277). Los antígenos se diluyeron en tampón acetato 10 mM a pH 5,0 a 25 mg/ml aproximadamente, y se inmovilizaron 3805 unidades de resonancia (RU, del inglés: resonance units)de TNFm 6249 RU de tiroglobulina humana, y 5279 RU de FOG1. Para la presentación bioespecífica de Fog-1, se acopló a la superficie una IgG1 anti-ratón de conejo purificada por afinidad (Pharmacia Biosensor AB) seguida de un mAb de ratón anti-humano kappa (2300 RU) y luego Fog-1 (2050 RU). Como la unión de la IgG1 anti-ratón de conejo al mAb de ratón era reversible mediante HCl 10 mM, el complejo se reconstruyó para cada ciclo analítico. El scFv anti Fog-1 se acopló a la superficie del CM5 hasta 1538 RU. Todas las determinaciones se llevaron a cabo a 25ºC en PBS, EDTA 0,2 mM, 0,05% surfactante P20 de BIAcore con una velocidad de flujo constante de 10 μl/min y un volumen de muestra inyectado de 35 μl. No fue necesario regenerar el antígeno puesto que los fragmentos de scFv se disociaban rápidamente, con excepción de la presentación bioespecífica del antígeno a través de la IgG1 anti-ratón de conejo, que se regeneró con HCl 10 mM durante 3 min.

Se llevaron a cabo análisis del monómero de scFv en un rango de concentración de 100-500 nM, y de los dímeros en el rango 40-200 nM excepto para el Fog-1 bioespecíficamente presentado si la concentración del scFv dimérico era 0,25-1,26 mM. El Fog-1 se analizó en la superficie de scFv aFOG1-H6 en el rango de concentración 10-200 nM. Todas las concentraciones se calcularon a partir de la absorción U.V. a 280 nm (asumiendo que scFv a 0,7 mg/ml da una A280 = 1 [Mach, H., Middaugh, C.R. y Lewis, R.V. (1992) Anal. Biochem., 200, 74-80], y que el PM de un monómero de scFv es 30 kD y de un dímero es de 60 kD). No se hizo ninguna corrección para la fracción de la proteína activa, y por tanto las cantidades puestas están estimadas a la baja. La evaluación cinética de los datos se llevó a cabo de acuerdo con (Karlsson,R., Michaelsson, A. y Mattsson,L. (1991) J. Immunol. Methods, 145, 229-240) y se evaluó con el programa Origin 1.1 (Microcal inc., Northampton, Mass., USA).

Dos de los fragmentos de anticuerpo se dirigieron contra los idiotipos del mAb Fog-1 humano.

La unión del anticuerpo 125I-Fog-1 a los glóbulos rojos humanos que llevaban el antígeno Rh D podría ser inhibida mediante ambos fragmentos scFv aFOG1-H6 y aFOG1-A3. Así, ambos aFOG1-H6 y aFOG1-A3 son anticuerpos anti-idiotípicos asociados a la diana, que se complejan con el sitio de unión al antígeno de Fog-1. La magnitud de la inhibición de la unión de 125I-Fog-1 al antígeno Rh D (en glóbulos rojos humanos R1R2) se determinó mediante titulación con los fragmentos scFv aFOG1-H6 y aFOG1-A3 purificados por afinidad. (Como control, no se observó ninguna inhibición de la unión de 125I-Fog-1 utilizando un fragmento scFv (aTEL9) (Marks y col., 1991, *supra*) dirigida contra la lisozima de clara de huevo de pavo). Con el máximo de 16 pg scFv (exceso molar respecto a 125I-Fog-1 de 1000 veces), la unión se inhibió en un 14,2% (aFOG1-H6) y un 20,9% (aFOG1-A3), lo que sugiere que las afinidades de estos fragmentos para Fog-1 son mucho más bajas que la afinidad de Fog-1 para el antígeno Rh D ($K1 = 2{,}2 \times 10^9\ M^{-1}$) que se une monovalentemente (Gorick y col., 1988, *supra*). Si el 100% de los fragmentos son activos, las afinidades de los dos fragmentos para la unión a Fog-1 se podría estimar como $Ka = 3 \times 10^5\ M^{-1}$ para aFOG1-H6 t $6 \times 10^5\ M^{-1}$ para aFOG1-A3, y esto es consistente con las otras medidas cinéticas (ver Tabla III más abajo).

Los fragmentos scFv pueden formar tanto monómeros como dímeros en disolución.

Los fragmentos solubles de anticuerpo se purificaron de los sobrenadantes bacterianos mediante cromatografía de afinidad, por unión del péptido etiqueta en el extremo carboxilo al mAb 9E10. Tras la ultrafiltración, los fragmentos se purificaron mediante FPLC de filtración en gel (Pharmacia) en Superdex 75 (Pharmacia), y detectados en línea tanto por absorción UV (280 nm) y mediante unión a un antígeno inmovilizado en un chip sensor en BIAcore (Pharmacia Biosensor AB). Esto mostró que los fragmentos scFv salían en dos picos, que correspondían en tamaño a los monómeros y dímeros. Los dímeros se unen más fuertemente al antígeno inmovilizado que los monómeros debido a su mayor avidez de unión. Los dímeros de scFv migran como monómeros en geles de SDS no reductores, y por lo tanto no están unidos por puentes disulfuro. Como se observan dos picos en la filtración en gel, parece que en este caso los monómeros y dímeros no se interconvierten rápidamente. Presumiblemente, los dímeros son fragmentos scFv unidos a través del fragmento flexible de unión que une las cadenas pesada y ligera, o con la cadena pesada de una molécula de scFv asociada con la cadena ligera de la otra. Advertimos que los fragmentos Fb del anticuerpo producidos en bacterias pueden también multimerizarse (datos sin publicar).

Los fragmentos scFv tienen afinidades micromolares.

La presencia tanto de monómeros como de dímeros de scFv podría llevar a una sobreestimación de la afinidad de unión utilizando procedimientos en fase sólida. Para determinar la afinidad y la cinética de la unión de los fragmentos de scFv al chip cubierto con antígeno mediante resonancia de plasmones de superficie, purificamos, por tanto, los fragmentos mediante filtración en gel (Tabla III). Para los dímeros, la constante de disociación se determinó como aproximadamente $10^{-2}\ s^{-1}$ y la constante de asociación para los dímeros de scFv de aproximadamente 10^5-$10^6\ M^{-1}\ s^{-1}$ (asumiendo que la muestra está completamente activa). En el caso de aFOG1-H6, el antígeno (el mAc Fog-1) se

inmovilizó sobre el chip sensor de dos maneras, tanto directamente como a través de un anticuerpo IgG1 anti-ratón de conejo. Los resultados fueron casi idénticos por cualquiera de los dos métodos (ver Tabla III). sin embargo, la fracción activa de los fragmentos scFv varía considerablemente y puede llevar a una estimación a la baja de la constante de asociación (y de la afinidad de la unión); por ejemplo, usando la titulación por atenuación de fluorescencia con varios fragmentos scFv dirigidos contra feniloxazolona, detectamos sólo de 0,06 a 0,38 sitios de unión funcionales por molécula de scFv (datos sin publicar). De hecho, las constantes de asociación calculadas para la asociación del fragmento aFOG1-H6 y el anticuerpo Fog-1 depende de si el anticuerpo (k_{as} 2.2 x 10^5 M^{-1} s^{-1}) o el fragmento scFv (k_{as} 1.0 x 10^6 M^{-1} s^{-1}) está inmovilizado en el chip sensor (Tabla III), indicando que el fragmento aFOG1-H6 es menos activo que el anticuerpo Fog-1. Para los monómeros de scFv, las señales de unión eran bajas y fue difícil seguir la cinética de unión a la superficie, excepto para la disociación de el monómero aThy-29 (k_{dis} = 2 x 10^{-2} s^{-1}). Sin embargo, la estabilización en cuatro veces del dímero del fragmento aThy-29 (ver más abajo), sugiere que las constantes de disociación de los otros monómeros son >10^{-2} s^{-1}, quizá 10^{-1} s^{-1}.

La mayor estabilidad de los dímeros scFv en el chip sensor, comparada con los monómeros, indica que los dímeros son bivalentes. Los dímeros scFv son por lo tanto análogos a las dos cabezas del anticuerpo IgG (pero con diferente espaciado entre las cabezas), y sus avideces por la unión se estimaron sobre 10^7 M^{-1} para k_{as}/k_{dis} (Tabla III). Las afinidades de los monómeros deben ser más bajas en virtud de su disociación más rápida de la superficie. Para el monómero de aThy-29, y asumiendo que la constante de asociación es la misma que para el dímero (Mason,D.W. y Williams,A.F. (1986) Kinetics of Antibody Reactions and the Analysis of Cell Surface Antigens. Blackwell Scientific, Oxford), podemos estimar una afinidad de aproximadamente 3 x 10^6 M^{-1}. Estas afinidades, calculadas a partir de las constantes de velocidad medidas por resonancia de plasmón de superficie, parecen ser similares a aquellas medidas en disolución mediante técnicas de atenuación de fluorescencia. Por ejemplo, la afinidad de la unión del monómero del fragmento scFv aTEL9 (Marks y col. 1991) que se une a la lisozima de pavo (y que se derivó de la misma librería) se estimó de 3,9 x 10^7 M^{-1} utilizando la resonancia de plasmón de superficie (Tabla III), y de 1,2 x 10^7 M^{-1} mediante atenuación de fluorescencia (Marks y col., 1991, *supra*).

Las afinidades de los anticuerpos aislados son típicas de la respuesta inmune primaria de ratón (Foote, J. y Milstein, C. (1991) Nature, 352, 530-532). Las cinéticas de asociación de los fragmentos de anticuerpo a los auto-antígenos de proteína (10^5 a 10^6 M^{-1} s^{-1}) son también típicas de las interacciones Ab-proteína caracterizadas previamente. Sin embargo, las cinéticas de disociación (10^{-2} s^{-1}) son relativamente rápidas para las interacciones Ab-proteína (pero ambas velocidades son lentas comparadas con muchas interacciones Ab-hapteno). A primera vista, es sorprendente que podamos aislar fragmentos scFv con constantes de disociación tan rápidas, puesto que uno no se esperaría que un fago "monomérico" sea retenido en un soporte sólido durante el lavado. Sin embargo, los fragmentos scFv se exponen de manera multivalente en el fago, especialmente usando el fago auxiliar M13DgIII, y algunos de los scFvs que tienden a formar dímeros en disolución, pueden también formar dímeros en el fago. Las interacciones multivalentes con ayuda del antígeno retienen al fago, permitiendo el aislamiento del fago codificante de scFv.

Los repertorios de genes-V de combinación aleatoria derivados del ARN-m de animales inmunizados se enriquecen para los genes-V de cadena ligera o pesada que codifican parte de un sitio de unión al antígeno y esto facilita el aislamiento de los fragmentos de unión al antígeno utilizando la tecnología de fagos, aunque las combinaciones de los genes-V de cada linfocito-B parece estar en gran parte destruida Los sitios de unión al antígeno, pueden también generarse *de novo* mediante la combinación aleatoria de cadenas, como se ilustra mediante el aislamiento de fragmentos scFv contra los antígenos foráneos procedentes de donantes humanos no inmunizados (Marks y col., 1991, *supra*).

Los "auto-anticuerpos naturales", anticuerpos auto-reactivos aislados de donantes sanos, tienden a ser de baja afinidad y poliespecíficos y pueden producirse por un subgrupo discreto de células-B, grupo de actividad interna (Holmberg, D. y Coutinho, A. (1985) Immunol. Today, 6, 356-357), contribuido en parte por células-B $CD5_+$ (Casali,P. y Notkins,A.L. (1989) Annu. Rev. Immunol., 7, 513-535). En contraste, los fragmentos anti-auto scFv que hemos generado, son altamente específicos para la unión al antígeno a pesar de tener solamente afinidades micromolares. Esto es un descubrimiento sorprendente y valioso. Sus afinidades podrían presumiblemente, ser mejoradas *in vitro*, por ejemplo, la afinidad de un fragmento scFv para la feniloxazlona del hapteno derivada de la librería de fagos (y, como los anticuerpo anti-autos descritos aquí, con una constante de disociación relativamente rápida) se mejoró desde Ka = 3.1 x 10^6 M^{-1} a 9.1 x 10^8 M^{-1} mediante barajamiento de cadenas (patente internacional WO92/01047; Marks y col., 1992b, Biotechnology 10, 779-783, 1992). Esto permitiría la creación de anticuerpos humanos altamente específicos, y altamente afines dirigidos contra los auto-antígenos para su uso en la terapia humana.

Ejemplo 5

Creación de una Librería sintética

Mediante la exposición de repertorios de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos y la selección del fago con antígeno[1], podemos mimetizar la selección inmune [2,3] y hacer anticuerpos humanos a partir de los genes-V reordenados de donantes no inmunizados[4]. Los anticuerpos humanos se generan en la actualidad mediante síntesis a partir de elementos de genes-V definidos. Un repertorio de 49 segmentos del gen VH de la línea germinal humana se reorganizó *in vitro* mediante la unión a un "segmento-D" sintético de cinco residuos de aminoácidos aleatorios y un segmento-J, para crear una tercera región que determina la complementariedad (CDR) sintética de ocho residuos. Los genes VH reorganizados se clonaron con una cadena ligera Vlambda3 humana como fragmentos Fv de cadena simple

para la expresión en fagos. La librería de 10^7 fagos se cribó con un conjugado 2-fenil-oxazol-5-ona de hapteno (phOx) a albumina de suero bovino (BSA), y se aislaron fagos que codificaban fragmentos que poseen actividad de unión específica a phOx-BSA, y con afinidad a phOx-ácido gamma-amino butírico (phOx-GABA) en el rango micromolar. La comparación de los 21 clones con secuencias únicas mostró que la "respuesta inmune" *in vitro* al hapteno estaba extensamente restringida al segmento VH26 (familia VH3) 6 con un residuo aromático invariable (Tyr, Phe, Trp) en el residuo 98 del CDR3. El uso de genes-V reorganizados *in vitro* puede permitir el diseño de librerías de anticuerpo sesgadas hacia la unión de antígenos de estructuras conocidas, y la creación de anticuerpos humanos terapéuticos con inmunogenicidad reducida.

Los anticuerpos con dominios variables consisten en una estructura de lámina β con tres lazos de secuencia hipervariable o CDRs[5]. Los lazos crean sitios de unión específica a antígeno de una variedad de formas, que van desde superficies planas[7] a bolsillos[8]. Para las cadenas pesadas humanas, la diversidad en la secuencia de los dos primeros CDRs está codificada por un repertorio de aproximadamente 15 segmentos de genes-V de línea germinal. (I.M. Tomlinson y col., *supra*). La tercera CDR se genera de la recombinación de estos segmentos con unos treinta segmentos D y unos seis segmentos J[9], y aunque su secuencia es altamente variable, ésta normalmente incluye un puente salino desde el Asp101 del lazo a la Arg94 de la estructura soporte[10]. Las estructuras y longitudes de las dos primeras CDRs están restringidas[10,11], pero aquellas de CDR3 difieren enormemente, con longitudes que varían entre 4 a 25 residuos[5].

Se creó una librería de genes-V_H reorganizados con una CDR3 de ocho residuos que incluía Asp101, en combinación con una cadena ligera Vlambda simple (ref.12). Cuarenta y nueve segmentos de línea germinal que codifican la mayoría del reportorio V_H humano (Tomlinson y col., *supra*) se amplificaron por separado utilizando la reacción de polimerasa en cadena[13] y los cebadores de oligonucleótidos que introducen el segmento D sintético (de 15 bases de secuencia aleatoria en el extremo 3' del segmento V_H) y un segmento J, que codificaba conjuntamente un lazo de CDR3 de ocho residuos (Fig. 4). Los segmentos reorganizados se unieron y se clonaron para su expresión en fagos con una cadena ligera Vlambda3 humana, creando una librería sintética de 10^7 clones de fagos. Al igual que el sistema inmune, la librería sintética de 10^7 clones del fago puede interceptar sólo una pequeña fracción de la diversidad potencial. Así la diversidad es potencialmente $49 \times 32^5 = 1.6 \times 10^9$ secuencias de nucleótidos distintas o $49 \times 20^5 = 1.6 \times 10^8$ secuencias diferentes de aminoácidos.

La librería se sometió a cuatro rondas de crecimiento y cribado en tubos recubiertos con phOx-albúmina de suero bovino (BSA), y los clones se probaron como fragmentos[15,16] Fv de cadena simple solubles[14] para la actividad de unión a phOx-BSA mediante ELISA[4]. Tras las series tercera y cuarta, se identificaron 14/96 y 61/96 clones respectivamente con actividades de unión a phOx-BSA, y de estos (29 probados), ninguno se unía a otras proteínas (ver la leyenda de la Tabla B). Además su unión a placas cubiertas con phOx-BSA podría completarse con el hapteno soluble (Tabla B).

La secuenciación reveló que muchos (21/29) de los clones de unión a phOx eran únicos, con una CDR3 de ocho residuos, y utilizaban un segmento de la familia V_H4, o bien uno de los tres segmentos de la familia V_H3 (Tabla B). Juntos estos segmentos utilizan tres de los siete pliegues "canónicos" disponibles para los dos primeros lazos hipervariables de los segmentos V_H humanos. (C. Chothia, y col., *supra*). La mayoría de los clones únicos (16/21) se derivaron del segmento VH26[6] y tienen secuencias relacionadas en el tercer lazo hipervariable: en este grupo, las primeros residuos tienden a tener una cadena lateral alifática (15/16), el segundo residuo tiende a ser lisina o arginina (11/16), mientras que el cuarto residuo es siempre un residuo aromático (más frecuentemente tirosina).

Las afinidades (K_d) de dos de los clones de unión más fuertes (Ox 13 y Ox-31, Tabla B) para phOx-GABA se determinaron mediante titulación por atenuación de fluorescencia[17] como 3,1 ± 0,2 μM y 6,7 ± 0,7 μM respectivamente. Aunque la librería de anticuerpos sintéticos carece de distintas longitudes de VH-CDR3 y de las diferentes cadenas ligeras de los anticuerpos generados *in vivo*, las afinidades para phOx-GABA se compararon con 0,5 μM para un anticuerpo (fago) generado a partir de donantes humanos no inmunizados[4], o 1 μM para varios hibridomas de una respuesta inmune primaria de ratón[18] (pero ver por advertencia, la leyenda de la Tabla A). Para mejorar estas afinidades, uno podría alterar sistemáticamente (ver más abajo) los anticuerpos phOx diferentes seleccionados (Tabla A).

En principio, el uso de librerías de expresión en fagos de genes-V reorganizados *in vitro* ofrece una alternativa atractiva a aquellos reorganizados *in vivo*[4]. En primer lugar las regiones de la estructura y los dos primeros lazos hipervariables de ambas cadenas pesada y ligera se los anticuerpos sintéticos humanos creados a partir de la librería son esencialmente líneas germinales. Esto contrasta con el anticuerpo "primario" del fago interceptado de los genes-V reorganizados*in vivo*, en el que la magnitud de la mutación somática variaba ampliamente[4]. Dejando aparte los polimorfismos, los segmentos de los genes VH son idénticos en individuos diferentes, y los anticuerpos sintéticos son potencialmente menos inmunogénicos. Mediante la alteración de la longitud y la secuencia de los lazos CDR3 de la cadena pesada y ligera, o mediante la localización de las mutaciones mínimas en los otros lazos CDR, o mediante la mezcla con las cadenas ligeras de la "línea germinal" sintética[19,20], sería posible mejorar sus afinidades mientras se retiene su carácter de línea germinal.

En segundo lugar, ambos tipos de librerías están altamente predispuestas. En las librerías "naturales", la tendencia está fuera de nuestro control, y está impuesta por ejemplo por la variación alélica, polimorfismos de deleción y la eliminación de clones auto-reactivos. En la librería sintética, la tendencia se puede introducir sistemáticamente. Aquí por ejemplo, todos los segmentos de genes-VH se escogieron, y así también el plegamiento de los lazos hipervariables

primero y segundo: también eran fijas la longitud y la diversidad de VH-CDR3 y de la cadena ligera. Aunque se han sugerido diferentes maneras de hacer librerías sintéticas[2], sería también posible incorporar principios de diseño en las estructuras codificadas. Si se conociese la forma del anticuerpo, se podría diseñar un envoltorio de sitios de unión complementarios aproximado y construirse con elementos de genes-V definidos. El uso de tales librerías de "diseño" favorecería el aislamiento de anticuerpos con afinidades más altas.

TABLA A

Familia	N°de genes	Segmentos VH*	Tamaño de la librería x 10^{-6} (%)
V_H1	14	1-5,7,8,10,12,14,15,20,21,25	2,3 (20)
V_H2	1	27	1,0 (9)
V_H3	23	29-33,35,38-40, 42,44-54,58,59	2,1 (19)
V_H4	9	63-71	2,6 (23)
V_H5	1	73	1,4 (12)
V_H6	1	74	1,9(17)
Total:	49		11,3 (100)
*para simplificar los segmentos V_H se enumeran de acuerdo con la nomenclatura DP de Tomlinson y col., *supra*.			

Tabla A

Composición de la librería sintética

Cuarenta y nueve segmentos V_H humanos (Tomlinson y col, *supra*) se utilizaron, uno para cada familia de genes V_H2, V_H5 y V_H6 y múltiples segmentos de las otras tres familias, y se clonaron de acuerdo con cada familia. Los clones de los segmentos V_H de cada familia se comprobaron para la presencia de un inserto (85% de media) y se unieron en una única gran librería como en la Tabla B, creando una tendencia (sesgo controlado) para ciertas familias de genes. Los segmentos procedentes de las familias V_H2, V_H5 y V_H6 están por lo tanto "sobrerepresentadas" con respecto a los segmentos de otras familias. La secuenciación de los treinta y cinco clones de las librerías no seleccionadas confirmaron que los segmentos V_H de cada familia estaban presentes, y que los nucleótidos estaban presentes en los cocientes esperados en el segmento-D, pero con una ligera tendencia por C. (En las posiciones primera y segunda de cada codón, A, 21,3%; G, 17,9%; C33,7% y T, 27,1%; y en la tercera posición, G, 42,6% y T, 57,4%). Los niveles de expresión de los fragmentos de anticuerpo también se comprobaron, y los segmentos V_H se identificaron en clones con niveles de expresión detectables, por ejemplo V_H1 (DP-7), V_H2 (DP-27), V_H3 (DP-29,35,38,44,47,51,53), V_H4 (DP-63,69), V_H5 (DP-73) y V_H6 (DP-74).

Métodos

Los clones se comprobaron para la presencia de insertos mediante "PCR-screening"[21] con oligonucleótidos LMB3 y pHENSEQ (ref.4) y se secuenciaron a partir del ADN de doble cadena mediante el procedimiento de terminadores didesoxinucleótidos de cadena[22] con la secuencia de oligonucleótidos (5'-CGA TCC GCC ACC GCC AGA G-3'). (Los números en las tablas están corregidos para el inserto). La expresión de los fragmentos scFv solubles se comprobó poniendo 10 μl de sobrenadante del cultivo inducido durante toda la noche en *E. coli* HB2151 (ref.14) sobre un filtro de nitrocelulosa utilizando un dispositivo automático de bloqueo (Minifold II, Schleicher y Schuell), y detectando el fragmento scFV unido marcado con un péptido con el anticuerpo 9E10[23] y anticuerpos anti-ratón marcados con peroxidasa (Sigma).

TABLA B

Clon	Familia	Gen Germinal*	Estructura canónica del Lazo	I_{50}ø
Ox-31	V_H3	DP-42	1-1	26
Ox-15	V_H3	DP-45	1-1	>300
Ox-18	"	"	"	>300
Ox-33	V_H3	DP-47	1-3	20
Ox-13	"	"	"	50
Ox-9	"	"	"	80
Ox-7	"	"	"	86
Ox-30	"	"	"	86
Ox-12	"	"	"	86
Ox-5	"	"	"	100
Ox-3	"	"	"	125
Ox-20	"	"	"	125
Ox-21	"	"	"	125
Ox-4	"	"	"	130
Ox-10	"	"	"	150
Ox-14	"	"	"	180
Ox-19	"	"	"	250
Ox-25	"	"	"	>400
Ox-27	"	"	"	¶
Ox-2§	V_H4	DP-67	2-1	>400
Ox-1	"	"	"	>400

* Tomlinson y col., *supra*, Chothia y col., *supra*.

ø en µM, de acuerdo con el ELISA de competición con phOx-GABA.

§ muestra la mutación V67A en FR3.

¶ No determinada.

Tabla B

Clones de unión a phOx aislados de la librería sintética

Los fagos se prepararon a partir de la librería mediante rescate con VCS-M13, y se sometieron a ciclos de cribado en tubos recubiertos con phOx-BSA como en la ref.4. Las secuencias de los 21 fagos que se unían a phOx revelaban cuatro segmentos VH de la línea germinal, DP-42,45,47 (familia VH3) y DP-67 (familia VH4). La DP-47 es idéntica a la VH26 (ref.6, corregida en la referencia 24), mientras que la DP-42, DP-45 y DP-67 solo difieren en uno o unos pocos residuos en la estructura desde 8-1B (ref. 25), 65-2 (ref. 26) o VH4.22 (ref.27) respectivamente. Los clones de la librería no seleccionada que utiliza los segmentos VH DP47 ya que carece del patrón característico CDR3 no se unía a phOx. De los 21 clones de unión a phOx probados, ninguno se unía a BSA, NIP-BSA, plástico, quimotripsinógeno A, citocromo c, tiroglobulina bovina, hemocianina de la lapa californiana o lisozima de la clara de huevo de pavo. Se encontraron que cuatro clones que se unían a BSA (pero no a phOx) eran contaminantes (clones αBSA3, de la ref.4).

Métodos

Como en la ref.4. Las afinidades relativas de los fragmentos scFv se determinaron por inhibición de ELISA[28]. Se hizo una dilución seriada de ácido 4-gamma-aminobutírico metilen 2-fenil-oxazol-5-ona (phOx-GABA), con concentraciones en el rango desde 6 a 400 μM, en Marvel al 4% en PBS, y se añadió el sobrenadante scFV. Se observó que la concentración de phOx-GABA resulta en una reducción de la señal del 50% (I_{50}) para la unión a phOx-BSA. Las afinidades de los clones Ox-13 y Ox-31 para phOx-GABA se determinaron mediante titulación por atenuación de fluorescencia utilizando scFv purificados mediante la etiqueta c-myc (ref.4). Idealmente, la afinidad por el conjugado se phOx-BSA podría haberse medido directamente, o la afinidad por el phOx-ácido caproíco, pero aquí se empleó el phOx-BSA para permitir la comparación con los datos del hibridoma de la ref.18. Las afinidades de los anticuerpos para el conjugado con phOx, o para el phOx-ácido caproico parecen ser mejores que las medidas para phOx-GABA.

Figura 4

Muestra el acoplamiento de los genes VH reordenados (ver texto)

Métodos

Un oligonucleótido sintético SYNLIB1 (ver Tabla IV) introdujo un segmento-D con una secuencia aleatoria de cinco aminoácidos, un segmento-J y un sitio de restricción XhoI, al extremo 3' de cada uno de los 49 segmentos germinales V_H humanos (Tomlinson y col., *supra*). El cebador se utilizó en la reacción en cadena de la polimerasa[13] con una familia V_H y dicho cebador se basó en los cebadores de sentido de transcripción 3' o inversos (VHBACK) que incorporan una diana NcoI[4], HuVH1BackSfi a HuVH6BackSfi. Cada clon del segmento V_H (proporcionado como molde de cadena simple en el vector M13) se amplificó de manera separada a 94ºC durante 1 min, 50ºC durante 1 min, y 72ºC durante 1,5 min, durante 25 ciclos, en un termociclador PHD-3 (Techne). Cada amplificación se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa, y se agruparon cantidades similares de ADN de los segmentos V_H de la misma familia, se digirieron con NcoI y XhoI, y se clonaron en el vector pHEN1 (ref. 14) que contiene el dominio variable de la cadena ligera Vlambda3 reordenado (IGLV3S1; ref. 12) tomado de un fragmento scFv unido a BSA[4].

Si, en lugar de un oligonucleótido aleatorio, se usa un oligonucleótido que codifica una CDR, por ejemplo de un roedor, esto puede marcar esa CDR no humana en la librería humana sintética producida.

Referencias mencionadas en el Ejemplo 5

1. **McCafferty**, J., **Griffiths**, A.D., **Winter**, G. & **Chiswell** D.J. (1990). *Nature*, 348, 552-554.

2. **Milstein**, C. (1990). *Proc R Soc Lond Biol*, 239, 1-16.

3. **Winter**, G. & **Milstein**, C (1991). *Nature*, 349, 293-299.

4. **Marks**, J.D., y col. (1991). *J Mol Biol*, 222, 581-597.

5. **Kabat**, E.A., **Wu**, T.T., **Reid-Miller**, M., **Perry**, H.M. & **Gottesman**, K.S. Sequences of proteins of immunological interest (US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office, 1987).

6. **Matthyssens**, G. & **Rabbits**, T.H. (1980). *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 6561-6565.

7. **Amit**, A.G., **Mariuzza**, R.A., **Phillips**, S.E. & **Poljak**, R.J. (1986). *Science*, 233, 747-753.

8. **Alzari**, P.M., y col. (1990). *Embo J*, 9, 3807-3814.

9. **Ichihara**, Y., **Matsuoka**, H. & **Kurosawa**, Y (1988). *Embo J*, 7, 4141-4150.

10. **Chothia**, C. & **Lesk**, A.M. (1987). *J Mol Biol*, 196, 901-917.

11. **Chothia**, C., y col. (1989). *Nature*, 342, 877-883.

12. **Frippiat**, J.P., y col. (1990). *Nucleic Acids Res*, 18, 7134.

13. **Saiki**, R.K., y col. (1985). *Science*, 230, 1350-1354.

14. **Hoogenboom**, H.R., y col. (1991). *Nucleic Acids Res*, 19, 4133-4137.

15. **Huston**, J.S., y col. (1988). *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 5879-5883.

16. **Bird**, R.E., y col. (1988). *Science*, 242, 423-426.

17. **Eisen**, H.N. (1964). *Meth Med Research*, 10, 115-121.

18. **Foote**, J. & **Milstein**, C. (1991). *Nature*, 352, 530-532.

19. **Clackson**, T., **Hoogenboom**, H.R., **Griffiths**, A.D. & **Winter**, G (1991). *Nature*, 352, 624-628.

20. **Roberts**, A.J., y col. (1992). *Bio/Technology*, in press.

21. **Gussow**, D. & **Clackson**, T. (1989). *Nucleic Acids Res*, 17, 4000.

22. **Sanger**, F., **Nicklen**, S. & **Coulson**, A.R. (1977). *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467.

23. **Munro**, S. & **Pelham**, H.R.B. (1986). *Cell*, 46, 291-300.

24. **Chen**, P.P., **Liu**, M.F., **Sinha**, S. & **Carson**, D.A. (1988). *Arthritis Rheum*, 31, 1429-1431.

25. **Berman**, J.E., y col. (1988). *Embo J*, 7, 727-738.

26. **Matsuda**, F., y col. (1990). *Embo J*, 9, 2501-2506.

27. **Sanz**, I., y col. (1989). *Embo J*, 8, 3741-3748.

28. **Rath**, S., **Stanley**, C.M. & **Steward**, M.W. (1988). *J Immunol Methods*, 106, 245-249.

Ejemplo 6

Aislamiento de los fragmentos de anticuerpo específicos para el factor-a de necrosis tumoral de una librería sintética de línea germinal humana

Se aisló un clon que codificaba un fragmento de anticuerpo específico del factor-a de necrosis tumoral de una librería sintética humana de línea germinal. Esta librería se preparó tal como se describe en el ejemplo 5, excepto que se utilizó el oligonucleótido SYNLIB2 en lugar del SYNLIB1, de modo que se generó un VH CDR3 de cinco aminoácidos. La librería se cribó contra el factor-α de necrosis tumoral, tal como se describe en el ejemplo 1 para la librería derivada de humanos no inmunizados. Tras cuatro ciclos de cribado correspondiente, se aisló un anticuerpo de fago (y el fragmento soluble correspondiente) con actividad de unión a TNF. La región V_H del fragmento scFv (αTNF-10) se derivó del segmento V_H DP-45 (Tomlinson y col., 1992). Los clones que se unen al hapteno, clones αNIP-6, αNIP-12, αOx-15 y αOx-18 se derivaron también de este segmento, aunque cada uno de estos fragmentos eran no obstante específicos para la unión al hapteno o al TNF. Esto indica pueden crearse sitios de unión al antígeno con especificidades completamente diferentes sobre la misma estructura de anticuerpo mediante substitución de únicamente CDR3. La unión a antígenos no específicos se determinó mediante ELISA tal como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 7

Aislamiento de fragmentos Fv de cadena simple que se unen a tiroglobulina humana y a un anticuerpo monoclonal humano de una librería sintética humana de línea germinal que contiene secuencias VH CDR3 de longitudes diferentes

Una librería de fragmentos Fv de cadena simple sintética de la línea germinal humana se preparó de manera análoga a la librería del Ejemplo 5, para incluir segmentos VH de línea germinal y regiones DH y JH sintéticas, generando regiones VH CDR3 de 4-12 aminoácidos. Se proporcionó una cadena ligera reordenada de una línea germinal simple. Esta librería de fagos se ha usado como una fuente de fragmentos de anticuerpo con especificidades anti-humano.

Cincuenta segmentos de genes VH de línea germinal (Tomlinson y col., 1991 *supra*, como en el Ejemplo 5) se amplificaron con oligonucleótidos para introducir una CDR3 completamente aleatoria variando la longitud de 4 a 12 residuos. En una primera reacción de PCR, cada gen se amplificó con su cebador VHBACK específico para su familia

(uno de VH1BACKSfi a VH6BACKSfi; Marks y col., 1991 *supra*; WO92/01047) en el extremo 5', e hibridación en el extremo 3', cada uno de los oligonucleótidos de las series SYNLIB4 - SYNLIB12 (Tabla IV). La PCR contenía 2,5 pmol de cada pareja apropiada de oligonucleótidos por cada 50 μl de mezcla de reacción que contenía dNTPs 250 μM, 10 mM KCl, $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM, TrisHCl 20 mM (pH 8,8), $MgCl_2$ 2 mM, BSA 100 μg/ml y 1 μl (1 unidad) de la Taq ADN polimerasa (Cetus). El molde fue 1 μl de la preparación madre de *E. coli* infectada con un clon de fago M13 que codificaba el gen V de línea germinal. El ciclo de amplificación fue de 94ºC durante 1 min, 55ºC durante 1 min y 72ºC durante 1,5 min. Tras 25 ciclos, se añadieron 30 pmol del mismo oligonucleótido VHBACK y 30 pmol de JHSAL (Tabla IV), y la PCR continuó durante 15 ciclos más, introduciéndose la diana de clonaje SalI en el extremo 3' del gen-VH. Tras verificar que una banda del tamaño adecuado se veía por electroforesis en gel de agarosa, los productos de todas las amplificiones por PCR hechas con el mismo cebador SYNLIB se recogieron, se cortaron con NcoI y SalI, y se clonaron en el pHEN1-V 3 (pHEN1 que contiene al IGLV3S1 clonado) cortado con NcoI-XhoI como en el ejemplo 5. De esta manera, se hicieron 9 librerías (cada una con una longitud particular de CDR3) conteniendo cada una entre 5 x 10^6 y 5 x 10^7 clones.

Selección

Se prepararon fagos de las 9 librerías diferentes mediante rescate con VCS-M13 tal como se describe en el ejemplo 3. Los fagos procedentes de las 9 librerías individuales se mezclaron para generar una gran librería y se sometieron a un rastreo en cada uno de los dos antígenos: tubos Inmunosorb se recubrieron con OAK3 (anticuerpo D anti-Rhesus humano, IgG3, k) durante toda una noche en tampón carbonato ($NaHCO_3$ 0,1 M, a pH 9,6 a 100 mg/ml) o tiroglobulina humana (recubierta a 100 μg/ml). Las selecciones se llevaron a cabo como en el Ejemplo 3.

Cribado

Se llevó a cabo un ELISA tal como se describe en Hoogenboom y col., 1991 *supra*. Las placas de ELISA se recubrieron durante una noche con OAK3 a 100 μg/ml en PBS a temperatura ambiente o con tiroglobulina humana a 100 μg/ml a temperatura ambiente.

Resultados

Tras cuatro ciclos de selección en tubos cubiertos con OAK3, se utilizó el fago eluido para infectar HB2151, y los fragmentos scFv solubles se analizaron para la unión mediante ELISA. Se encontraron 59/96 clones positivos en el ELISA-OAK3.

La librería sintética humana de línea germinal también se sometió a: 5 series de selección en tubos recubiertos con tiroglobulina humana, y se encontraron 80/96 clones positivos en un ELISA para el fago de cada clon individual rescatado con VCS-M13.

Se analizaron dos de cada uno de los clones positivos por ELISA para la unión contra un rango de antígenos (OAK3, tiroglobulina humana, phOx-BSA, NIP-BSA, BSA, ovoalbúmina, quimotripsinógeno-A, estreptavidina, citocromo c, KLH (hemocianina de la lapa californiana), lisozima de la clara de huevo de pavo). Los dos clones que unen OAK-3 (como los fragmentos scFv solubles) dieron señales aproximadamente 3 veces mayores que la señal de fondo en ELISA sobre OAK3. Los dos clones que unen tiroglobulina (como los fragmentos scFv expuestos en el fago) dieron señales aproximadamente 5 veces superiores a la señal de fondo para el ELISA sobre tiroglobulina. Se encontró que todos los clones eran altamente específicos para el antígeno contra el cual habían sido seleccionados. Mediante la hibridación a cebadores específicos de la familia (J.D. Marks y col., Eur. J. Immunol. 21 985-991 1991), los segmentos VH de los cuatro clones se identificaron como de la familia VH3. La longitud del CDR3 de cada clon se analizó mediante amplificación de CDR3 con los oligonucleótidos CDRFOR y CDRBACK (Tabla IV), y analizando el producto en un gel de poliacrilamida al 8%. Para dos de los clones que se unen a OAK3, encontramos una longitud de 4 o 7 residuos de aminoácido, mientras que los clones que se unen a tiroglobulina utilizan ambos una CDR3 de 10 aminoácidos de longitud.

Así, los fragmentos scFV de anticuerpo que se unen al anticuerpo monoclonal humano y a un auto-antígeno humano, se han aislado de una libraría sintética de línea germinal humana.

Ejemplo 8

Aislamiento de fragmentos de anticuerpo que desencadena la actividad del receptor de interleuquina-1

La librería de los fragmentos Fv de cadena simple derivados de un humano no inmunizado que se describió en el Ejemplo 1, se utilizó para seleccionar anticuerpos que desencadenaran la actividad del receptor de interlequina-1. Se aíslan primero los fragmentos de anticuerpo que se unen al dominio externo del receptor de interleuquina-1 (IL-1R) de las células T. Los clones de anticuerpo que se identifican de esta manera se analizan entonces en ensayos para la actividad biológica del tipo interleuquina-1. El IL-1R de células T murinas y humanas es altamente homólogo a la proteína de superficie celular de 80 kD que une tanto la interleuquina-1α como la interleuquina-1β. Un clon de ADN-c que codifica los 316 aminoácidos del extremo amino del dominio externo del receptor murino ha sido expresado en células HeLa (S.K. Dower y col. J. Immunol. 142 4314-4320 1989). La molécula IL1-R soluble expresada de esta

manera se ha purificado y muestra propiedades de unión indistinguibles de la molécula IL-1R completa, complejo formado entre una sola molécula IL1-R soluble y IL-1. Esta molécula receptora soluble se une a la interleuquina-1 humana. Los receptores de interleuquina-1 de las células T humanas se han clonado y secuenciado por J.E. Sims y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 8946-8950, 1989). El dominio externo soluble del receptor IL1 humano, aminoácidos de 1 a 316, se expresa en células HeLa y se purifica como está descrito para el receptor murino.

La librería rescatada humana no inmunizada se selecciona primero contra el receptor IL-1 humano soluble recombinante, correspondiente al dominio externo del receptor IL-1. Los inmunotubos se recubren con el receptor IL-1 soluble tal como se describe en el Ejemplo 1 a 10 μg/ml y se lleva a cabo un cribado tal como se describió en el Ejemplo 1, para un total de cuatro ciclos de selección por afinidad.

La unión de los clones al receptor IL-1 soluble se caracteriza mediante ELISA utilizando placas de microtitulación recubiertas con el receptor IL-1 soluble a 10 μg/ml como se describe para el TNF-α en el Ejemplo 3. Los fragmentos de anticuerpo que muestran señales de ELISA significativas con el receptor de IL-1 soluble pero no con antígenos no específicos, se eligen entonces para estudios posteriores.

Los clones de anticuerpo aislados de esta manera se expresan entonces como fragmentos scFv solubles en *E. coli* y se purifican tal como se describe en el Ejemplo 4 mediante mAb 9E10 por cromatografía de afinidad. La unión a receptores humanos se evalúa utilizando la unión de un fragmento de anticuerpo marcado con I^{125} a la línea celular de fibroblastos humanos TIG-1 que expresa el receptor de interleuquina-1 básicamente como se describe en T.Takii y col. (Eur. J. Immunol. 22 1221-1227 1992) para determinar la afinidad de IL1α-I^{125} por el receptor en estas líneas celulares. Los fragmentos de los anticuerpos purificados que presentan unión al receptor se utilizan en un ensayo de exploración biológica utilizando células epiteliales para examinar la estimulación de la síntesis de prostaciclinas (PGI2) y el factor de activación plaquetaria (PAF) como se describe en E. Dejana y col. (Blood 69 695-699, 1987). Estos estudios identificarán fragmentos de anticuerpo que tienen una especificidad anti-auto contra el receptor IL-1 que desencadena la actividad del receptor. La actividad puede ser cuantificada en relación a la interleuquina-1α humana utilizando un bioensayo estándar para IL-1α, por ejemplo la proliferación de la línea de células T auxiliares D10S utilizando la incorporación de timidina-H^3. (S.F. Orencole y C.A. Dinarello Cytokine 1 14-22 1989) o una conversión del ensayo de proliferación como se describe por A.J. Gearing y col.(J. Immunol. Methods 99 7-11, 1987).

TABLA I

Frecuencia de clones de unión aislados de la librería de scFv no inmunizada tras selección

Antígeno	Tandas de selección					N° de
	1	2	3	4	5	clones
Tiroglobulina (bovina)	-	-	18/40	-		12
Tiroglobulina (humana)	-	-	10/40	-		4
Seleccionada sobre bovina						
Fog1 (IgG1 humana, K anticuerpo)	-	-	-	94/96		4
TNFα (humano)	-	122/1920	83/192	92/96		7
CEA (humano)	-	-	0/96	1/96	2/96	1
MUC1 (humano):seleccionado con péptido	-	-	-	0/96	2/96	1
rsCD4 (humano)	-	-	-	-	8/96	1

Las proporciones indican la frecuencia de clones de unión después de cada tanda de selección. Los fagémidos se rescataron con el fago auxiliar M13DgIII, excepto para las selecciones de CEA, MUC1 y rsCD4, en donde se utilizó el fago auxiliar VCS-M13.

TABLA II

Familia de genes V, derivación de línea germinal y magnitud de la hipermutación somática de varios fragmentos scFv antígeno-específico aislados de la librería no inmunizada

scFv	Familia	Genes de línea germinal de secuencia nucleotídica cercana	Diferencias de línea germinal nucleótido	Aminoácido
CADENAS PESADAS				
αThy-23	VH3	DP-47	13	8
αThy-29	VH13	DP-14	0	0
αThy-32	VH3	DP-31	5	2
αThy-33	VH3	DP-49	32	19
αFOG1-A3	VH3	DP-54	7	3
αFOG1-A4	VH3	DP-46	7	7
αFOG1-H6	VH3	DP-51	10	4
αFOG1-G8[a)]	VH4	DP63(FR1)	2	0
	VH5	DP-73(CDR1 a FR3)	15	7
αTNF-A1		DP-50	9	6
αTNF-E1		DP-46	14	6
αTNF-E7		DP-10	0	0
αTNF-H9G1		DP-4	1	1
αCEA4-8A	VH1	DP-14	1	0
αMUC1-1[a)]	VH1	V1-2 (FR1 a CDR2)	2	0

	VH1	DP-25(FR3)	0	0
αCD4-74	VH5	DP-73	13	8
CADENAS LIGERAS				
αThy-23	Vk1	L8	20	9
αThy-29	V3	IGLV3S1	0	0
αThy-32	V1	IGLV1S2	1	1
αThy-33[a)]	Vk1	L12(FR1 & CDR1)	6	3
	Vk4	B3(FR2 a FR3)	5	5
αFOG1-A3	V2	VL2.1	16	9
αFOG1-A4	Vk1	04	25	12
αFOG1-H6	Vk1	L5	36	17
αFOG1-G8	Vk1	L8	27	14
αTNF-A1	Vk1	L11	12	8
αTNF-E1	Vk1	L5	5	5
αTNF-E7	Vk1	L11	17	8
αTNF-H9G1	V1	IGLV1S2	18	9
αCEA4-8A	Vk1	02	4	0
αMUC1-1	V2	VL2.1	18	12
αCD4-74	V1	HumlvL1	23	17

Las referencias para todos los genes de línea germinal de cadena pesada pueden hallarse en Tomlinson y col., (1992). Las referencias para las cadenas ligeras son VL2.1 (Brockly y col., 1989); IGLVS2 (Bernard y col., 1990); IGLV3S1 (Frippiat y col., 1990); L8(Vd) y L5(Vb) (Pech y col., 1984); L12(HK102) (Bentley y Rabbits, 1980); B3 (VKIV) (Klobeck y col., 1985); 02 y 04 (Pargetn y col., 1991); L11 (Scott y col., 1991); Humlv1L1 (Daley y col., 1992). Los nombres alternativos se proporcionan entre paréntesis.

a) Estos genes parece que han sido generados mediante entrecruzamientos entres dos genes V durante la amplificación por PCR y en consecuencia las concordancias del apareamiento de secuencia se han determinado utilizando dos segmentos de línea germinal putativos: FR, región de entramado; CDR, región determinante de la complementariedad.

Bently, D.L. y **Rabbits** T.H. (1980) *Nature*, 288, 730-3.

Bernard, F. **Chucana** P., **Frippiat** JP, **Buluwela**, L. Y **Lefranc**, M.P. (1990) *Nucleic Acids Res*, 18, 7139.

Brockly, F., **Alexandre**, D., **Chuchana**, P., **Huck**, S., **Lefranc**, G., y **Lefranc** M.P. (1989) *Nucleic Acids Res*, 18, 7134.

Klobeck, H.G., **Bornkamm**, G.W., **Combriato**, G., **Mocikat** R., **Pohlenz**, H.D. y **Zachau**, H.G. (1985) *Nucleic Acids Res*. 13, 6515-29.

Pargent,W., **Meindi**, A., **Thiebe**, R., **Mitzel**, S. Y **Zachau**, H.G. (1991) *Eur J Immunol*, 21, 1821-7.

Pech, M., **Jaenichen**, H.R., **Pohelenz**, H.D., **Neumaier**, P.S., **Klobeck** H.G. y **Zachau** (1984) *J Mol Biol*, 176, 189-204.

Scott, M.G., **Crimmins**, D.L., **McCourt**, D.W., **Chung**, G., **Schabble**, K.F., **Thiebe**, R., **Quenzel**, E.M., **Zacahu**, H.G. y **Nahm**, M.H. (1991) *J Immunol*, 47, 4007-13.

Tomlinson, I.M. **Walter**, G., **Marks**, J.D., **Llewelyn**, M.B., y **Winter** G. (1992) *J. Mol. Biol*., 227, en prensa.

TABLA III

Afinidades de la unión al antígeno por fragmentos scFv monoméricos y diméricos

scFv	(M/D)[a]	Especies inmovilizadas	K_{on}b) (BIACORE) $M^{-1}s^{-1}/10^4$		K_{off}b) (BIACORE) $M^{-1}s^{-1}/10^{-2}$		$K_a = K_{on}/K_{off}$ (BIACORE) $M^{-1}/10^6$	K_a por FQ[c] o inhibición[d] $M^{-1}/10^6$
αTNF-E7	D	TNFα humano	9,0	(±1,2)	1,4	(0,054)	6,4	ND
αFOG1-H6	D	Fog-1 (directo)	22,2	(±0,4)	1,8	(0,23)	12,3	ND
αFOG1-H6	D	Fog-1(via RAMIgG1)	22,1	(±1,9)	2,4	(0,045)	9,3	ND
αFOG1-H6	D	αFOG1-H6 scFv	104	(±2,4)	ND[c]		ND	ND
αFOG1-H6	M+D	(cuantificado por inhibición)	ND		ND		ND	0,3[d]
αFOG1-A3	M+D	(cuantificado por inhibición)	ND		ND		ND	0,6[d]
αThy-29	D	Tiroglobulina humana	6,6	(±1,2)	0,46	(0,063)	14,3	ND
αThy-	M	Tiroglobulina	ND		2,0	(0,37)	ND	ND

29		humana						
αTE L9	M	Tiroglobulina de huevo de pavo	39,2	(±2, 6)	1,0	(0,97)	39,2	11,6 [c]

a) M, fracción monomérica; D, fracción dimérica; b) los números entre paréntesis son las desviaciones estándares; c) FQ, titulación por atenuación de fluorescencia.

b) Calculado de la magnitud de inhibición de la unión de Fog-1-I^{125} con el antígeno Rh D; e) no determinado porque las curvas de disociación presentaron una inclinación de curva muy mala.

TABLA IV

Oligonucleótidos utilizados

SYNLIB1 :
5'GCC TCC ACC TCT CGA GAC GGT GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ATA GTC AAA (A/CNN)5 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB2 :
5'GCC TCC ACC TCT CGA GAC GGT GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA (A/CNN)5 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB4 :
5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)4 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB5 :
5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)5 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB6 :
5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)6 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB7 :
5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)7 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB8 :
5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)8 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB9 :
5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)9 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB10 :
5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)10 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

SYNLIB11 :
5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)11 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

TABLA IV (continuación)

SYNLIB12 :

5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA ((A/C)NN)12 TCT TGC ACA GTA ATA CAC GGC CGT GTC-3'

JHSAL :

5'- GCC TGA ACC GCC TCC ACC AGT CGA CAC GGT GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA-3'

CDRFOR : 5'- CAG GGT ACC TTG GCC CCA-3'

CDRBACK : 5'- GTG TAT TAC TGT GCA AGA-3'

Cebadores BACK VH humanos

HuVH1aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3'

HuVH2aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG-3'

HuVH3aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG-3'

HuVH4aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG-3'

HuVH5aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC-3'

HuVH6aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3'

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. Ésta no forma parte del documento de la patente Europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado al compilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones, por lo que la EPO declina cualquier responsabilidad a este respecto.

Patentes citadas en esta descripción

- WO 9201047 A [0001] [0004] [0005] [0005] [0006] [0009] [0013] [0015] [0024] [0025] [0055] [0065] [0074] [0079] [0123] [0129] [0145] [0146] [0146] [0146] [0149] [0151] [0152] [0169] [0181] [0199]
- GB 9200883 W [0001] [0006] [0024] [0055]
- GB 9201755 W [0001]
- GB 9206372 A [0001]
- GB 2188638 B [0003]
- GB 9201483 W [0058]
- AU 9000337 W [0084] [0103]

Bibliografía no referente a patentes citada en la descripción

- G.J. **NOSSAL**. *Science*, 1989, vol. 245, 147-153 [0003]
- J.D. **MARKS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0010]
- I.R. **COHEN**; A. **COOKE**. *Immunol. Today*, 1986, vol. 7, 363-364 [0011]
- P. **CASALI**; A.L. **NOTKINS**. *Ann. Rev. Immunol.*, 1989, vol. 7, 515-531 [0011]

- S. **AVRAMEAS**. *Immunol. Today*, vol. 12, 154-159 [0011]
- K. **JAMES**; G.T. **BELL**. *J. Immunol. Methods*, 1987, vol. 100, 5-40 [0011]
- M. **BOUANANI** *et al. Arthritis Rheum*., 1991, vol. 34, 1585-1593 [0011]
- S. **PORTOLANO** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun*., 1991, vol. 179, 372-377 [0012]
- D.A. **NEMAZEE**; K. **BURKI**. *Nature*, 1989, vol. 337, 562-566 [0015]
- C.C. **GOODNOW** *et al. Nature*, 1988, vol. 334, 676-682 [0015]
- S.B. **HARTLEY** *et al. Nature*, 1991, vol. 353, 765-769 [0015]
- D.M. **RUSSELL** *et al. Nature*, 1991, vol. 354, 308-311 [0015]
- T. **CLACKSON** *et al. Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0055]
- P.M. **LYDYARD** *et al. Scand J Immunol*, 1990, vol. 31, 33-43 [0057]
- **EMBLETON** *et al. Nucleic Acids Res*., 1992, vol. 20, 3831-3837 [0058]
- C. **CHOTHIA** *et al. Nature*, 1989, vol. 342, 877-893 [0060]
- C. **CHOTHIA** *et al. J. Mol. Biol*., 1992, vol. 227, 779-817 [0060]
- **GHERARDI**, E *et al. J. Immunol. meth*., 1990, vol. 126, 61-68 [0062]
- **ROSSOMANDO**, E.F.; **ZINDER** N.D. *J. Mol.Biol*., 1968, vol. 36, 387-399 [0074]
- R.E. **HAWKINS**; S.J. **RUSSELL**; G. **WINTER**. *J. Mol. Biol*., 1992, vol. 226, 889-896 [0075]
- J.K. **SCOTT**; G.P. **SMITH**. *Science*, 1990, vol. 249, 386-390 [0075]
- D. **WRAITH** *et al. Cell*, 1989, vol. 57, 709-715 [0083]
- L. **STEINMAN**; R. **MANTEGAZZA**. *FASEB J*., 1990, vol. 4, 2726-2731 [0083]
- **GAULTON**, G.N.; **GREANE**, M.I. Idiotypic mimicry of biological receptors. *Ann. Rev. Immunol*., 1986, vol. 4, 253-280 [0098]
- **SEGE**, K.; **PETERSON**, P.A. Use of anti-idiotypic antibodies as cell surface receptor probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*., 1978, vol. 75, 2443-2447 [0098]
- S.J. **DAVIS** *et al. Nature*, 1992, vol. 358, 76-79 [0099]
- A.F. **WILLIAMS**; A.N. **BARCLAY**. *Ann. Rev Immunol.*, 1988, vol. 6, 381-405 [0117]
- J. **MCCAFFERTY** *et al. Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0157]
- M.R. **PRICE** *et al. Molec. Immunol*., 1990, vol. 27, 795-802 [0157]
- S. **GENDLER** *et al. J. Biol. Chem*., 1988, vol. 263, 12820-12823 [0157]
- J.R. **GUM** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun*., 1990, vol. 171, 407-415 [0157]
- **TOMLINSON** *et al. J. Mol. Biol*., 1992, vol. 227, 776-798 [0162]
- **MALTHIÉRY**, Y.; **LISSITZKY**, S. *Eur. J. Biochem*., 1987, vol. 165, 491-498 [0168]
- DE **BELLIS**, D.; **SCHWARTZ**, I. *Nucleic Acids Res.*, 1990, vol. 18, 1311 [0169]
- **GORICK**, B.D.; **THOMPSON**, K.M.; **MELAMED**, M.D.; **HUGHES**, J.N. Vox. Sang., 1988, vol. 55, 165-170 [0170]
- **JÖNSSON**, U.; **FÄGERSTAM**, L.; **IVARSSON**, B.; **LUNDH**, K.; **LÖFÅS**, S.; **PERSSON**, B.; **ROOS**, H.; **RÖNNBERG**, I.; **SJÖLANDER**, S.; **STENBERG**, E. *BioTechniques*, 1991, vol. 11, 620-627 [0171]

• **JÖNSSON**, U.; **MALMQVIST**, M. Real Time Biospecific Interaction. *JAI Press Ltd*, 1992, vol. 2, 291-336 [0171]

• **JOHNSSON**, B.; **LÖFÅS**, S.; **LINDQVIST**, G. *Anal. Biochem*., 1991, vol. 198, 268-277 [0173]

• **MACH**, H.; **MIDDAUGH**, C.R; **LEWIS**, R.V. *Anal. Biochem*., 1992, vol. 200, 74-80 [0174]

• **KARLSSON**, R.; **MICHAELSSON**, A.; **MATTSSON**, L. J. *Immunol. Methods*, 1991, vol. 145, 229-240 [0174]

• **MASON**, D.W.; **WILLIAMS**, A.F. Kinetics of Antibody Reactions and the Analysis of Cell Surface Antigens. *Blackwell Scientific*, 1986 [0178]

• **FOOTE**, J.; **MILSTEIN**, C. *Nature*, 1991, vol. 352, 530-532 [0179]

• **HOLMBERG**, D.; **COUTINHO**, A. *Immunol. Today*, 1985, vol. 6, 356-357 [0181]

• **CASALI**, P.; **NOTKINS**, A.L. *Annu. Rev. Immunol*., 1989, vol. 7, 513-535 [0181]

• **MARKS** *et al. Biotechnology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0181]

• **MCCAFFERTY**, J.; **GRIFFITHS**, A.D.; **WINTER**, G.; **CHISWELLD**. J. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0196]

• **MILSTEIN**, C. *Proc R Soc Lond Biol*, 1990, vol. 239, 1-16 [0196]

• **WINTER**, G.; **MILSTEIN**, C. *Nature*, 1991, vol. 349, 293-299 [0196]

• **MARKS**, J.D. *et al. J Mol Biol*, 1991, vol. 222, 581-597 [0196]

• **KABAT**, E.A.; **WU**, T.T.; **REID-MILLER**, M.; **PERRY**, H.M.; **GOTTESMAN**, K.S. US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office. *Sequences of proteins of immunological interest*, 1987 [0196]

• **MATTHYSSENS**, G.; **RABBITS**, T.H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, vol. 77, 6561-6565 [0196]

• **AMIT**, A.G.; **MARIUZZA**, R.A.; **PHILLIPS**, S.E.; **POLJAK**, R.J. *Science*, 1986, vol. 233, 747-753 [0196]

• **ALZARI**, P.M. *et al. Embo J*, 1990, vol. 9, 3807-3814 [0196]

• **ICHIHARA**, Y.; **MATSUOKA**, H.; **KUROSAWA**, Y. *Embo J*, 1988, vol. 7, 4141-4150 [0196]

• **CHOTHIA**, C.; **LESK**, A.M. *J Mol Biol*, 1987, vol. 196, 901-917 [0196]

• **CHOTHIA**, C. *et al. Nature*, 1989, vol. 342, 877-883 [0196]

• **FRIPPIAT**, J.P. *et al. Nucleic Acids Res*, 1990, vol. 18, 7134 [0196]

• **SAIKI**, R.K. *et al. Science*, 1985, vol. 230, 1350-1354 [0196]

• **HOOGENBOOM**, H.R. *et al. Nucleic Acids Res*, 1991, vol. 19, 4133-4137 [0196]

• **HUSTON**, J.S. *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0196]

• **BIRD**, R.E. *et al. Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0196]

• **EISEN**, H.N. *Meth Med Research*, 1964, vol. 10, 115-121 [0196]

• **FOOTE**, J.; **MILSTEIN**, C. *Nature*, 1991, vol. 352, 530-532 [0196]

• **CLACKSON**, T.; **HOOGENBOOM**, H.R.; **GRIFFITHS**, A.D.; **WINTER**, G. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0196]

• **ROBERTS**, A.J. *et al. Bio/Technology*, 1992 [0196]

• **GUSSOW**, D.; **CLACKSON**, T. *Nucleic Acids Res*, 1989, vol. 17, 4000 [0196]

• **SANGER**, F.; **NICKLEN**, S.; **COULSON**, A.R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0196]

- **MUNRO**, S.; **PELHAM**, H.R.B. *Cell*, 1986, vol. 46, 291-300 [0196]
- **CHEN**, P.P.; **LIU**, M.F.; **SINHA**, S.; **CARSON**, D.A. *Arthritis Rheum*, 1988, vol. 31, 1429-1431 [0196]
- **BERMAN**, J.E. *et al. Embo J*, 1988, vol. 7, 727-738 [0196]
- **MATSUDA**, F. *et al. Embo J*, 1990, vol. 9, 2501-2506 [0196]
- **SANZ**, I. *et al. Embo J*, 1989, vol. 8, 3741-3748 [0196]
- **RATH**, S.; **STANLEY**, C.M.; **STEWARD**, M.W. *J Immunol Methods*, 1988, vol. 106, 245-249 [0196]
- J.D. **MARKS** *et al. Eur. J. Immunol*., 1991, vol. 21, 985-991 [0204]
- S.K. **DOWER** *et al. J. Immunol*., 1989, vol. 142, 4314-4320 [0206]
- J.E. **SIMS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8946-8950 [0206]
- T. **TAKII** *et al. Eur. J. Immunol*., 1992, vol. 22, 1221-1227 [0209]
- E. **DEJANA** *et al. Blood*, 1987, vol. 69, 695-699 [0209]
- S.F. **ORENCOLE**; C.A. **DINARELLO**. *Cytokine*, 1989, vol. 1, 14-22 [0209]
- A.J. **GEARING** *et al. J. Immunol. Methods*, 1987, vol. 99, 7-11 [0209]
- **BENTLEY**, D.L.; **RABBITS**, T.H. *Nature*, 1980, vol. 288, 730-3 [0210]
- **BERNARD**, F.; **CHUCHANA**, P.; **FRIPPIAT**, J.P.; **BULUWELA**, L.; **LEFRANC**, M.P. *Nucleic Acids Res*, 1990, vol. 18, 7139 [0210]
- **BROCKLY**, F.; **ALEXANDRE**, D.; **CHUCHANA**, P.; **HUCK**, S.; **LEFRANC**, G.; **LEFRANC**, M.P. *Nucleic Acids Res*, 1989, vol. 17, 3976 [0210]
- **FRIPPIAT**, J.P.; **CHUCHANA**, P.; **BERNARD**, F.; **BULUWELA**, L.; **LEFRANC**, G.; **LEFRANC**, M.P. *Nucleic Acids Res*, 1990, vol. 18, 7134 [0210]
- **KLOBECK**, H.G.; **BORNKAMM**, G.W.; **COMBRIATO**, G.; **MOCIKAT**, R.; **POHLENZ**, H.D.; **ZACHAU**, H.G. *Nucleic Acids Res*, 1985, vol. 13, 6515-29 [0210]
- **PARGENT**, W.; **MEINDL**, A.; **THIEBE**, R.; **MITZEL**, S.; **ZACHAU**, H.G. *Eur J Immunol*, 1991, vol. 21, 1821-7 [0210]
- **PECH**, M.; **JAENICHEN**, H.R.; **POHLENZ**, H.D.; **NEUMAIER**, P.S.; **KLOBECK**, H.G.; **ZACHAU**. *J Mol Biol*, 1984, vol. 176, 189-204 [0210]
- **SCOTT**, M.G.; **CRIMMINS**, D.L.; **MCCOURT**, D.W.; **CHUNG**, G.; **SCHABLE**, K.F.; **THIEBE**, R.; **QUENZEL**, E.M.; **ZACHAU**, H.G.; **NAHM**, M.H. *J Immunol*, 1991, vol. 47, 4007-13 [0210]
- **TOMLINSON**; I.M. **WALTER**, G.; **MARKS**, J.D.; **LLEWELYN**, M.B.; **WINTER**, G. *J. Mol. Biol*., 1992, 227 [0210]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un miembro de una pareja de unión específica (miembro sbp), el miembro sbp es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio VH de anticuerpo humano y un dominio VL de anticuerpo humano, los cuales forman un sitio de unión a un antígeno con especificidad de unión por un auto-antígeno humano, el procedimiento comprende:

(a) preparación de una librería de secuencia de ácido nucleico que codifica una población genéticamente diversa de dichos miembros de parejas de unión específica, en donde la preparación de la librería comprende preparar una población genéticamente diversa de secuencias codificantes del dominio VH mediante recombinación artificial o sintética de secuencias humanas de genes VH de línea germinal con segmentos D y J e incluyendo bases aleatorias en las regiones de unión V-D-J.

(b) Expresión de dicha librería de secuencias de ácido nucleico en células huésped recombinantes, por lo que dicho miembro de pareja de unión específica o componente de cadena polipeptídica del mismo se expresa como una fusión con un componente de superficie de proteína de cubierta de un bacteriófago filamentoso, el cual expresa en la superficie de una partícula de bacteriófago dicho miembro de unión específica, y en donde en dicha partícula se empaqueta una secuencia de ácido nucleico que codifica un miembro de unión específica o un componente de cadena polipeptídica del mismo;

(c) Selección, mediante unión con dicho auto-antígeno, de uno o más miembros sbp con especificidad de unión para dicho auto-antígeno.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha población genéticamente diversa de secuencias codificantes de dominios VH se prepara mediante combinación de al menos 50 segmentos de genes VH de línea germinal humanos con segmentos de genes DH y JH.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha población genéticamente diversa de secuencias codificantes de dominios VH se prepara mediante combinación de segmentos múltiples de genes VH de línea germinal humanos con segmentos de genes DH y JH, en donde dichos segmentos múltiples de genes VH de línea germinal humanos están sesgados hacia una o más familias de genes VH.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la preparación de dichas secuencias codificantes de dominios VH humanos comprende la alteración de secuencias de genes V de línea germinal.

5. Procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde los dominios mencionados VH como VL se expresan a partir de un ácido nucleico capaz de ser empaquetado utilizando dicho componente de un bacteriófago filamentoso.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho miembro sbp expresado en la superficie de un bacteriófago filamentoso es un fragmento scFv de anticuerpo.

7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde cada uno de los miembros mencionados en la superficie de un bacteriófago filamentoso es un fragmento de anticuerpo Fab.

8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los miembros sbp seleccionados en (c) expresados en la superficie de un bacteriófago filamentoso se seleccionan o criban para proporcionar un bacteriófago filamentoso que exprese un miembro sbp o una población mixta de dichos bacteriófagos filamentosos, en donde cada bacteriófago filamentoso contiene ácido nucleico que codifica el miembro sbp o una cadena polipeptídica del mismo que se expresa en su superficie.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el ácido nucleico que codifica un miembro sbp seleccionado o cribado y que se deriva de un bacteriófago filamentoso que expresa en su superficie un miembro sbp seleccionado o cribado se utiliza para expresar un miembro sbp o un fragmento o derivado del mismo en un huésped recombinante.

10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el ácido nucleico de un bacteriófago filamentoso se recoge y utiliza para proporcionar el ácido nucleico en un procedimiento ulterior con el fin de obtener un miembro sbp individual o una población mixta de miembros sbp, o ácido nucleico que codifica dicho miembro sbp individual o dicha población mixta de miembros sbp.

11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 y 11, en donde el producto de expresión final o derivado del mismo se utiliza para preparar un medicamento terapéutico o profiláctico o un producto diagnóstico.

Fig.1.

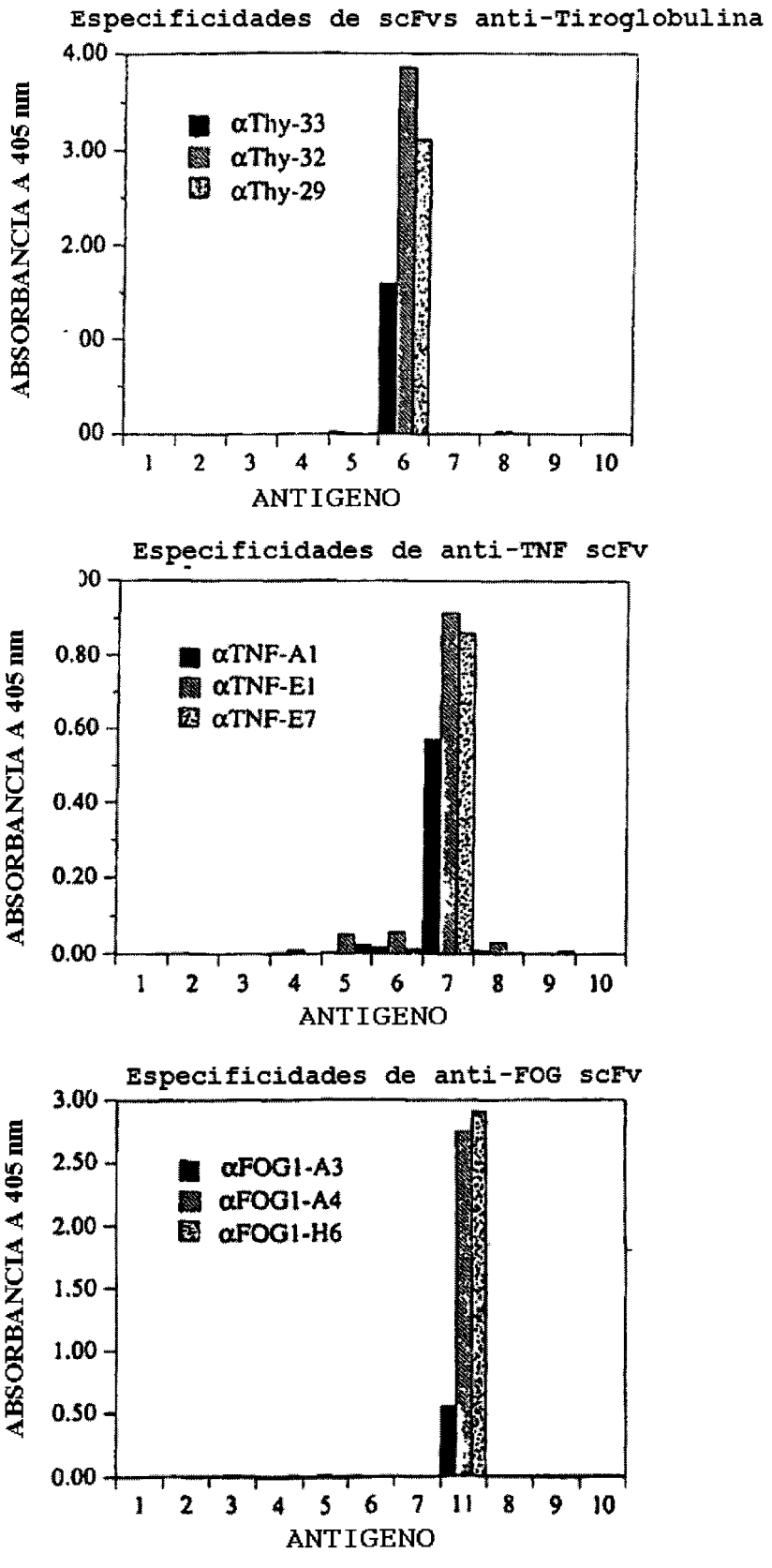

Especificidades de scFvs anti-Tiroglobulina
ABSORBANCIA A 405 nm
4.00
3.00
2.00
00
00
αThy-33
αThy-32
αThy-29
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
ANTIGENO
Especificidades de anti-TNF scFv
ABSORBANCIA A 405 nm
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
αTNF-A1
αTNF-E1
αTNF-E7
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
ANTIGENO
Especificidades de anti-FOG scFv
ABSORBANCIA A 405 nm
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
αFOG1-A3
αFOG1-A4
αFOG1-H6
1 2 3 4 5 6 7 11 8 9 10
ANTIGENO

Fig.2.

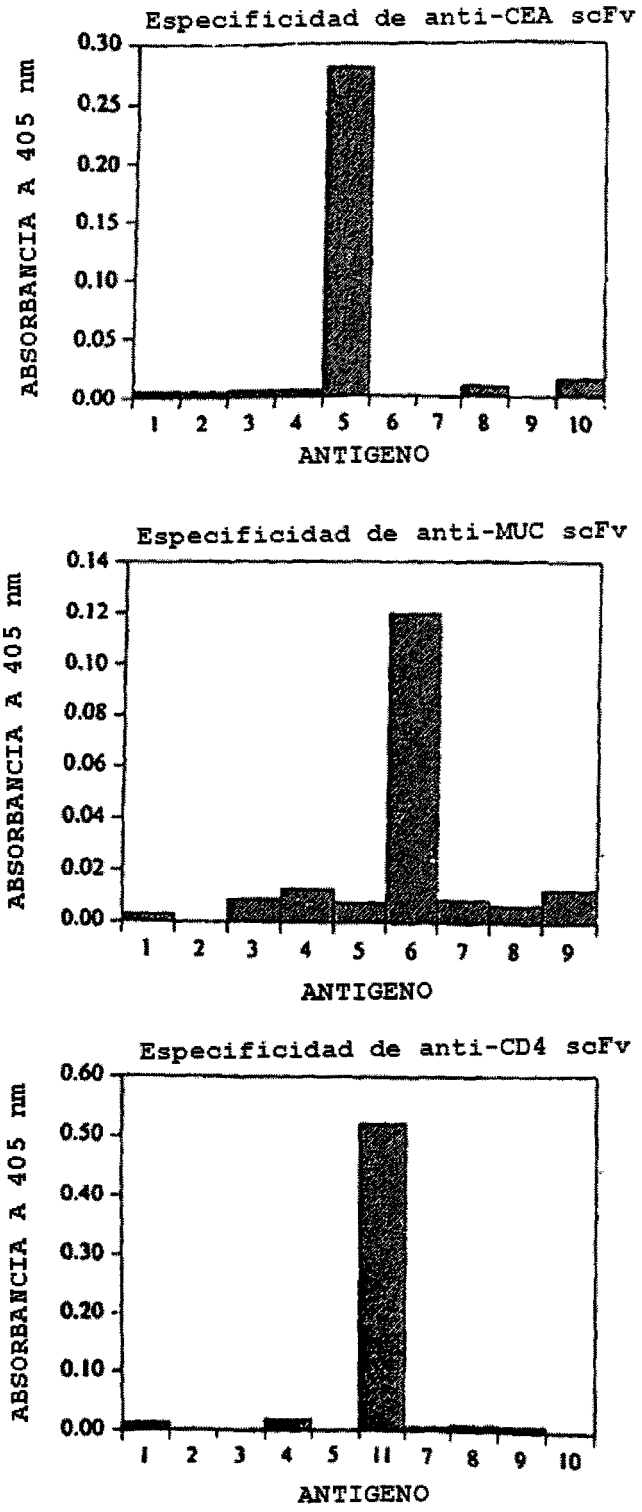

Especificidad de anti-CEA scFv
ABSORBANCIA A 405 nm
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
ANTIGENO
Especificidad de anti-MUC scFv
ABSORBANCIA A 405 nm
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
1 2 3 4 5 6 7 8 9
ANTIGENO
Especificidad de anti-CD4 scFv
ABSORBANCIA A 405 nm
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
1 2 3 4 5 11 7 8 9 10
ANTIGENO

Fig.3.

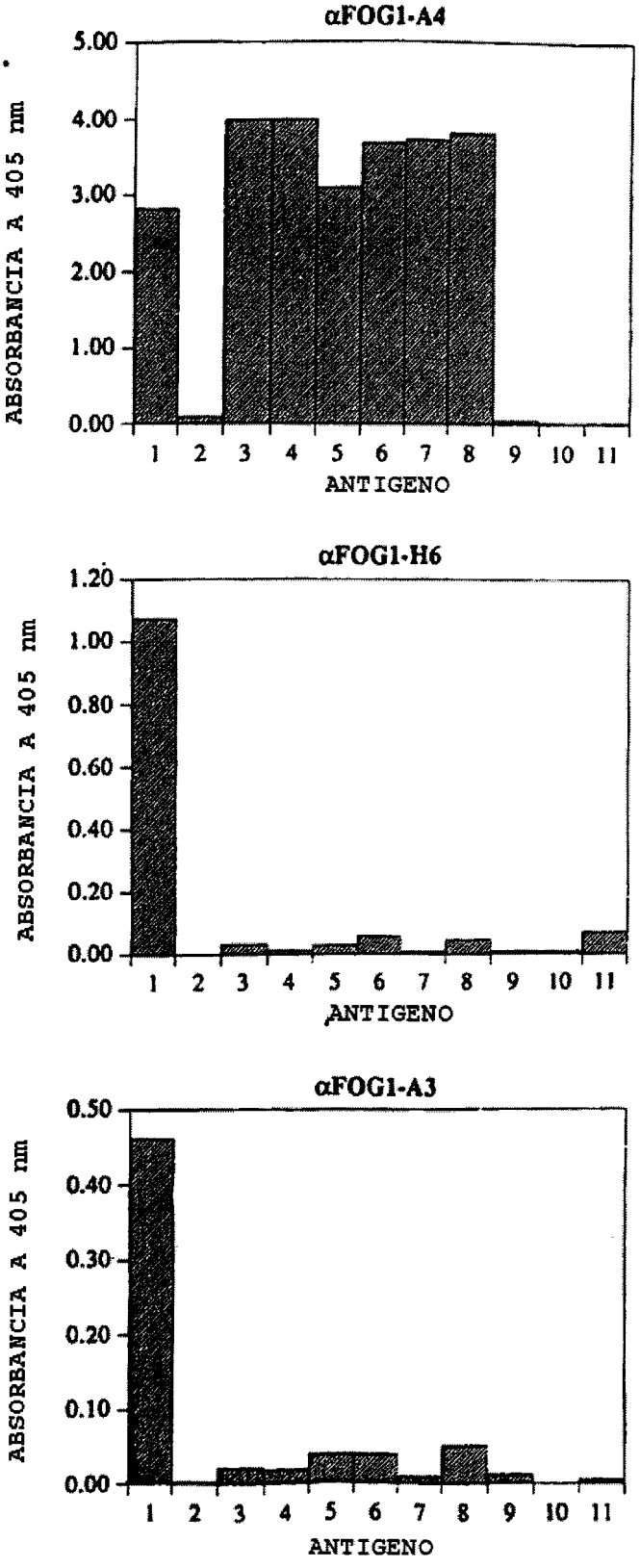

αFOG1-A4
ABSORBANCIA A 405 nm
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
ANTIGENO
αFOG1-H6
ABSORBANCIA A 405 nm
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
ANTIGENO
αFOG1-A3
ABSORBANCIA A 405 nm
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
ANTIGENO

Fig. 4.

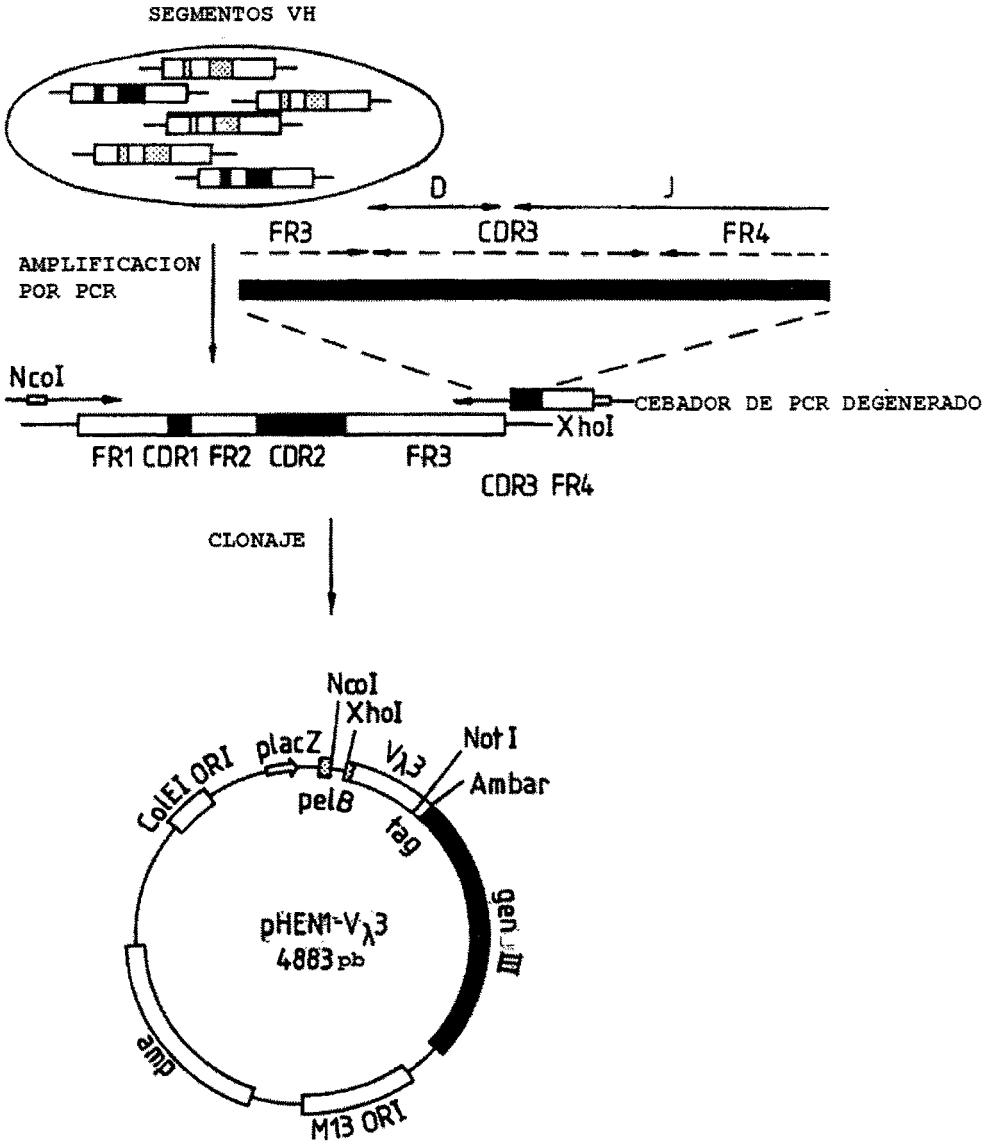

SEGMENTOS VH
D
J
FR3
CDR3
FR4
AMPLIFICACION
POR PCR
NcoI
CEBADOR DE PCR DEGENERADO
XhoI
FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3
CDR3 FR4
CLONAJE
NcoI
XhoI
NotI
Ambar
placZ
Vλ3
ColEI ORI
pelB
tag
gen III
pHEN1-Vλ3
4883 pb
amp
M13 ORI

Fig. 5(i)

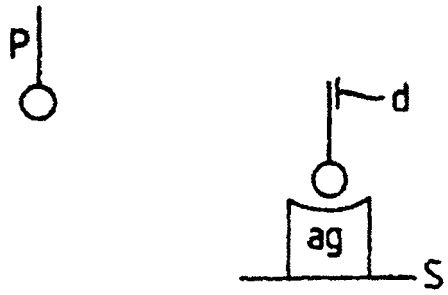


Fig. 5(ii)

