

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 873 375**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C40B 40/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C40B 40/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2012** **PCT/US2012/029086**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012** **WO12125733**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2012** **E 12757543 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020** **EP 2686349**

54 Título: **Métodos de cribado de anticuerpos**

30 Prioridad:

15.03.2011 US 201161453106 P

05.12.2011 US 201161566778 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2021

73 Titular/es:

X-BODY, INC. (100.0%)
100 Beaver Street, Suite 101
Waltham, MA 02453, US

72 Inventor/es:

CHEN, YAN;
WOOLF, TOD, M. y
WAGNER, RICHARD, W.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 873 375 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de cribado de anticuerpos

5 Antecedentes

Los anticuerpos monoclonales son tremendamente importantes como herramientas de investigación, agentes diagnósticos y terapéuticos. Esto es, en gran parte, debido al hecho de que los anticuerpos monoclonales se pueden seleccionar para que se unan con alta especificidad y afinidad a casi cualquier epítipo estructural.

Los métodos clásicos de inmunizar animales para obtener anticuerpos son lentos y laboriosos y, como resultado, se han desarrollado ahora muchas técnicas de selección *in vitro*. Los ejemplos de las técnicas incluyen presentación de ácidos nucleicos, presentación en fagos, presentación en retrovirus, y presentación en la superficie celular (por ejemplo, células de levadura, mamíferos o bacterianas). Por ejemplo, Chen et al. (2008, J. Mol. Biol. 382:779-789) divulga una genoteca de V_H humana presentada en fagos que tiene un andamiaje basado en un dominio variable de cadena pesada humana estable, muy soluble, designado como m0, en donde la diversidad está en la CDR2 y CDR3. Las CDR 2 y 3 son de cadenas pesadas de cinco genotecas de Fab de anticuerpos humanos. La solicitud de patente en EE UU US 2006/0134098 divulga métodos para generar anticuerpos humanos que retienen la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia para un antígeno diana poniendo en contacto una genoteca de dímeros VH-VL híbridos o dímeros de VH obtenidos por sustitución de porciones de las secuencias de VH y/o VL de un anticuerpo de referencia con la correspondiente secuencia de, por ejemplo, un repertorio de anticuerpos humanos, con antígeno, y aislar clones que expresan dímeros VH-VL o dímeros de VH que se unen al antígeno, los dímeros de VH se refieren a IgG dimérica de cadena pesada de camélidos. A pesar de estos desarrollos tecnológicos, todavía es relativamente difícil obtener anticuerpos que posean las propiedades cinéticas deseadas, selectividad, propiedades biofísicas, e inmunogenicidad necesarias para uso terapéutico.

Según esto, hay una necesidad en la técnica para métodos mejorados para la selección de anticuerpos contra una diana deseada.

30 Compendio de la invención

La invención proporciona métodos y composiciones para la producción de anticuerpos novedosos que se unen específicamente a un antígeno diana. La invención es particularmente útil para producir anticuerpos novedosos que tienen la especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo de referencia, pero con propiedades mejoradas (por ejemplo, afinidad de unión, inmunogenicidad, y estabilidad termodinámica) relativas al anticuerpo de referencia. En particular, los métodos divulgados en el presente documento hacen posible generar rápidamente una molécula de anticuerpo enteramente novedosa empezando solo de una CDR3 de especificidad de unión a antígeno conocida.

Los métodos divulgados también permiten la identificación rápida de pares novedosos de dominios VH y VL que tienen una alta termoestabilidad intrínseca. Los métodos del estado de la técnica para seleccionar pares de unión VH/VL en general implican la unión covalente forzada de dominios VH y VL (por ejemplo, como fragmentos Fab o scFv) y selección de pares VH/VL basado solamente en afinidad de unión de los dominios VH y VL unidos a un antígeno diana, sin prestar atención a la potencia de la interacción no covalente entre los dominios VH y VL. En contraste, los métodos divulgados en el presente documento seleccionan pares VH/VL estables basados en la potencia de la interacción no covalente entre dominios VH y VL no apareados (además de su afinidad de unión para un antígeno diana). Como resultado, los métodos novedosos divulgados en el presente documento dan pares VH/VL con mayor termoestabilidad intrínseca que los obtenidos usando métodos en el estado de la técnica.

Según esto, en un aspecto la invención proporciona un método para producir un dominio pesado variable (VH) que se une específicamente a un antígeno diana. El método comprende: (a) proporcionar una genoteca de dominios VH no apareados, quiméricos en donde la diversidad está en las regiones FR1-FR3, en donde las secuencias de las regiones FR1-FR3 de dichos dominios son secuencias humanas, y en donde cada miembro de la genoteca comprende la secuencia de la región CDR3 del dominio VH de un anticuerpo de referencia que se une específicamente al antígeno; (b) poner en contacto la genoteca con el antígeno; y (c) seleccionar de la genoteca al menos un dominio VH no apareado, quimérico que se une específicamente al antígeno diana, produciendo de esta manera un dominio VH que se une específicamente al antígeno.

En ciertas formas de realización, el método comprende además introducir diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en la genoteca de la etapa (a). En una forma de realización, la diversidad adicional de secuencia de aminoácidos se introduce por mutagénesis aleatoria.

En ciertas formas de realización, el método comprende además la etapa de (d) introducir diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en el/los dominio(s) VH seleccionado(s) en la etapa (c).

En ciertas formas de realización, la secuencia de la región CDR3 es del dominio VH de un anticuerpo de roedor, de lagomorfo, aviar, de camélido, de tiburón, o humano.

En ciertas formas de realización, el método comprende además la etapa de combinar el/los dominio(s) VH seleccionado(s) en la etapa (c) con un dominio VL complementario.

5 En ciertas formas de realización, cada miembro de la genoteca comprende una secuencia de la región CDR3 idéntica.

En ciertas formas de realización, las secuencias de la región FR4 de dichos dominios son secuencias humanas.

10 En ciertas formas de realización, cada miembro de la genoteca comprende secuencias FR1-FR3 codificadas por un único gen VH de anticuerpo humano.

En ciertas formas de realización, la genoteca se genera usando al menos un oligonucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, y 102.

15 En ciertas formas de realización, la genoteca es una genoteca de presentación de ácidos nucleicos, por ejemplo, una genoteca de presentación de ADNbc.

20 En ciertas formas de realización, el método comprende además la etapa de expresar el dominio VH seleccionado, o un anticuerpo que comprende el dominio VH en una célula.

En otro aspecto, la invención proporciona una genoteca de presentación de ácidos nucleicos de dominios VH no apareados, quiméricos en donde la diversidad está en las regiones FR1-FR3 de dichos dominios, en donde las secuencias de las regiones FR1-FR3 de dichos dominios son secuencias humanas, y en donde cada miembro de la genoteca comprende la secuencia de la región CDR3 del dominio VH de un anticuerpo de referencia.

25 En ciertas formas de realización, la secuencia de la región CDR3 es del dominio VH de un anticuerpo de roedor, de lagomorfo, aviar, de camélido, de tiburón, o humano.

30 En ciertas formas de realización, cada miembro de la genoteca comprende una secuencia de la región CDR3 idéntica.

En ciertas formas de realización, las secuencias de la región FR4 de dichos dominios son secuencias humanas.

35 En ciertas formas de realización, cada miembro de la genoteca comprende secuencias FR1-FR3 codificadas por un único gen VH de anticuerpo humano.

En ciertas formas de realización, la genoteca se genera usando al menos un oligonucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, y 102.

40 En ciertas formas de realización, la genoteca de presentación de ácidos nucleicos es una genoteca de presentación de ADNbc.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar un par VH/VL estable que se une específicamente a un antígeno diana. El método comprende: (a) proporcionar una primera genoteca, preferiblemente una genoteca de presentación de ácidos nucleicos, de dominios VH no apareados, quiméricos en donde la diversidad está en las regiones FR1-FR3, en donde las secuencias de las regiones FR1-FR3 de dichos dominios son secuencias humanas, y en donde cada miembro de la primera genoteca comprende la secuencia de la región CDR3 del dominio VH de un anticuerpo de referencia, preferiblemente un anticuerpo de roedor, de lagomorfo, aviar, de camélido, de tiburón o humano, que se une específicamente al antígeno diana; (b) opcionalmente introducir, preferiblemente por mutagénesis aleatoria, diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en la primera genoteca de la etapa (a); (c) poner en contacto la primera genoteca con el antígeno diana; (d) seleccionar de la primera genoteca al menos un VH no apareado, quimérico que se une específicamente al antígeno diana, produciendo de esta manera un dominio VH que se une específicamente al antígeno diana; (e) poner en contacto el dominio VH no apareado con una segunda genoteca de dominios VL no apareados de modo que se forma la genoteca de pares VH/VL; (f) poner en contacto la genoteca de pares VH/VL con el antígeno diana; y (g) seleccionar de la genoteca de pares VH/VL al menos un par VH/VL que se une específicamente al antígeno diana, seleccionando de esta manera un par VH/VL estable que se une específicamente al antígeno diana.

60 En ciertas formas de realización, el método comprende además la etapa de introducir diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en la segunda genoteca de dominios VL de la etapa (e). En una forma de realización, la diversidad adicional de secuencia de aminoácidos se introduce por mutagénesis aleatoria.

65

En ciertas formas de realización, la segunda genoteca de dominios VL de la etapa (e) comprende dominios VL humanos.

5 En ciertas formas de realización, el método comprende además la etapa de expresar el par VH/VL seleccionado, o un anticuerpo que comprende el par VH/VL en una célula.

10 En ciertas formas de realización, la genoteca se genera usando al menos un oligonucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, y 102.

En ciertas formas de realización, la segunda genoteca es una genoteca de presentación de ácidos nucleicos, por ejemplo, una genoteca de presentación de ADNbc.

15 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática de métodos ejemplares de reorganización CDR3/marco como se divulga en el presente documento.

20 La figura 2 es una representación esquemática de la construcción de genotecas de presentación de ácidos nucleicos de VH ejemplares para uso en los métodos divulgados.

25 La figura 3 es una representación esquemática de métodos de presentación de ácidos nucleicos ejemplares para uso en los métodos divulgados. La letra "b" representa biotina y los círculos representan una molécula de unión a biotina tetramérica.

30 La figura 4 representa los resultados de ensayos de unión *in vitro* que miden la unión a PDGFRb humano o de ratón del dominio XB1511VH, una genoteca de presentación de ADN reorganizado CDR3/marco XB1511 sin seleccionar (R0), y un grupo de genotecas de presentación de ADN reorganizado CDR3/marco XB1511 después de cuatro rondas de selección (R4).

La figura 5 representa los resultados de estudios de unión de resonancia en plasmón de superficie que miden la cinética de unión de XB1511 y los derivados reorganizados de la región marco XB2202 y XB2708 a PDGFRb humano.

35 La figura 6 representa los resultados de estudios de unión de resonancia en plasmón de superficie que miden la cinética de unión de XB2202 a PDGFRβ humano (A) y de ratón (B).

40 La figura 7 representa los resultados de estudios de unión de resonancia en plasmón de superficie que miden la cinética de unión de XB2708 a PDGFRβ humano (A) y de ratón (B).

La figura 8 es una representación esquemática de la construcción de genotecas de presentación de ácidos nucleicos de VL ejemplares para uso en los métodos divulgados.

45 La figura 9 es una representación esquemática de métodos ejemplares para la identificación de pares VH/VL estables.

La figura 10 representa los resultados de ensayos ELISA que miden la unión a PDGFRb humano de scFv XB1511/VL que comprende VL aislado del conjunto cribado de la segunda ronda de un cribado de presentación de ADN de pares VH/VL.

50 La figura 11 representa los resultados de ensayos ELISA que miden la unión a PDGFRb humano de scFv XB1511/VL que comprende VL aislado del conjunto cribado de la tercera ronda de un cribado de presentación de ADN de pares VH/VL.

55 La figura 12 representa los resultados de ensayos ELISA que miden la unión a PDGFRb humano de scFv XB2202/VL que comprende VL aislado del conjunto cribado de la segunda ronda de un cribado de presentación de ADN de pares VH/VL.

La figura 13 representa los resultados de ensayos ELISA que miden la unión a PDGFRb humano de VL no apareado del scFv XB1511/VL mostrado en la figura 9.

60 La figura 14 representa los resultados de estudios de afinidad de unión en solución que miden la unión a PDGFRb humano del dominio VH XB1511 marcado con ³⁵S Met y scFv que contiene XB1511 obtenido de cribados de presentación de ADN de pares VH/VL.

La figura 15 representa los resultados de estudios de afinidad de unión en solución que miden la unión a PDGFRb humano del dominio VH XB2202 marcado con ³⁵S Met y scFv que contiene XB2202 obtenido de cribados de presentación de ADN de pares VH/VL.

- 5 La figura 16 representa los resultados de ensayos de migración sin marcador que miden la capacidad de una IgG1 que contiene XB1511 para inhibir la migración de fibroblastos de prepucio humano.

La figura 17 representa los resultados de ensayos ELISA que miden la unión a PDGFRb humano de VH XB2202 y scFv XB2202/A4 después de incubación a varias temperaturas.

10

Descripción detallada

En el presente documento se divulgan métodos y composiciones para la producción de anticuerpos novedosos que se unen específicamente a un antígeno diana. Los métodos y composición divulgados en el presente documento son particularmente útiles para producir anticuerpos que tienen la especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo de referencia, pero con propiedades mejoradas (por ejemplo, afinidad de unión, inmunogenicidad, y estabilidad termodinámica) relativas al anticuerpo de referencia.

15

I. Definiciones

20

Como se usa en el presente documento, los términos “dominio VH” y “dominio VL” se refieren a dominios variables pesado y ligero de anticuerpos individuales, respectivamente, que comprenden las FR (regiones marco) 1, 2, 3, y 4 y las CDR (regiones determinantes de complementariedad) 1, 2, y 3 (véase, por ejemplo, Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda). Los límites de las CDR se pueden definir usando cualquier sistema de numeración reconocido en la técnica.

25

Como se usa en el presente documento, el término “dominio V” se refiere a un único polipéptido que comprende un dominio VH o dominio VL que carece de secuencias de la región constante que facilita el apareamiento covalente de dicho dominio VH o dominio VL con un dominio VL o dominio VH complementario, respectivamente.

30

Como se usa en el presente documento, el término “FR1-FR3” se refiere a la región de un VH que abarca FR1, CDR2, FR2, CDR2 y CDR3, pero que excluye las regiones CDR3 y FR4.

35

Como se usa en el presente documento, el término “quimérico” se refiere a un dominio variable de anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de dos o más dominios variables de anticuerpos diferentes, por ejemplo, un dominio variable con secuencias CDR3 de un anticuerpo de referencia y secuencias FR1-FR3 de uno o más anticuerpos diferentes.

40

Como se usa en el presente documento, el término “no apareado” se refiere a VH o VL que no están unidos (ya sea de forma covalente o no covalente) a un dominio VL o VH complementario, respectivamente.

45

Como se usa en el presente documento, el término “dominio VL o VH complementario” se refiere a un dominio VL o VH que se asocia con un dominio VH o VL, respectivamente, para formar un par VH/VL.

50

Como se usa en el presente documento, el término “par VH/VL” se refiere a un dímero no covalente de un dominio VH único y VL único, en donde los dominios VL y VH se asocian a través de la interfase dimérica VH/VL natural de una manera similar a la observada en una molécula de inmunoglobulina tetramérica completa, y el dímero se puede unir específicamente a al menos un antígeno diana. Un “par VH/VL estable” es un par VH/VL que no muestra disociación significativa de los dominios VH y VL sustituyentes en condiciones fisiológicas.

55

Como se usa en el presente documento, el término “biespecífico” se refiere a un par VH/VL, en donde los dominios VH y VL se unen a diferentes antígenos.

60

Como se usa en el presente documento, el término “genoteca de presentación de ácidos nucleicos” se refiere a cualquier presentación ligada a fenotipo-genotipo sin células *in vitro* reconocida en la técnica incluyendo, sin limitación, las mostradas en, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 7.195.880; 6.951.725; 7.078.197; 7.022.479; 6.518.018; 7.125.669; 6.846.655; 6.281.344; 6.207.446; 6.214.553; 6.258.558; 6.261.804; 6.429.300; 6.489.116; 6.436.665; 6.537.749; 6.602.685; 6.623.926; 6.416.950; 6.660.473; 6.312.927; 5.922.545; y 6.348.315, y en el documento WO2010/011944.

65

Como se usa en el presente documento, el término “se une específicamente a” se refiere a la capacidad de una molécula de unión (por ejemplo, un dominio VH o VL) de unirse a un antígeno con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o más, y/o unirse a una diana con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

Como se usa en el presente documento, el término “antígeno” se refiere al sitio de unión o epítipo reconocido por una molécula de unión (por ejemplo, dominio VH o VL).

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo de referencia” se refiere a cualquier anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de interés.

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a IgG, IgM, IGA, IgD o IgE o un fragmento de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, VH y/o VL), sea derivado de cualquier especie que produce anticuerpos de forma natural, o creado por tecnología de ADN recombinante.

II. Métodos para la reorganización CDR3/marco de dominios variables de anticuerpos

En el presente documento se divulga un método para producir un dominio V que se une específicamente a un antígeno diana. Este método permite la generación rápida de una molécula de anticuerpo enteramente novedosa empezando solo de una CDR3 de especificidad de unión a antígeno conocida. El método en general comprende las etapas de: (a) proporcionar una genoteca de dominios VH o VL no apareados, quiméricos en donde la diversidad está en las regiones FR1-FR3 de cada dominio, y en donde cada miembro de la genoteca comprende la secuencia de la región CDR3 que se une específicamente al antígeno; (b) poner en contacto la genoteca con el antígeno; y (c) seleccionar de la genoteca al menos un dominio VH o VL no apareado, quimérico que se une específicamente al antígeno.

La secuencia de la región CDR3 puede ser artificial, derivada naturalmente, o una combinación de las mismas. Las secuencias de la región CDR3 derivadas naturalmente pueden ser de cualquier organismo que produce un anticuerpo incluyendo, pero no limitado a, roedor, lagomorfo, aviar, camélido, tiburón o humano.

La secuencia CDR3 puede ser de un cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que la CDR3 debe corresponder al contexto del dominio V en el que se coloca, por ejemplo, una CDR3 de cadena pesada se debe usar en una genoteca de dominios VH y una CDR3 de cadena ligera se debe usar en una genoteca de dominios VL.

La genoteca puede contener una especie única de secuencia CDR3. Por ejemplo, la secuencia CDR3 puede ser un único anticuerpo de referencia que se une al antígeno diana. La genoteca también puede contener múltiples especies de secuencia CDR3. Por ejemplo, las múltiples especies de secuencia CDR3 pueden ser variantes de una única secuencia CDR3 de un único anticuerpo de referencia. Tales variantes se pueden producir por alteración (por ejemplo, sustitución, adición, delección y/o modificación) de al menos un aminoácido en la secuencia CDR3 del anticuerpo de referencia. Las alteraciones se pueden generar aleatoriamente (por ejemplo, por mutagénesis aleatoria) o de forma dirigida usando cualquier medio reconocido en la técnica.

En general, la genoteca comprende una diversidad pluralidad de diversas secuencias de aminoácidos de la región FR1-FR3. La pluralidad de secuencias de aminoácidos de la región FR1-FR3 puede ser de cualquier fuente incluyendo, sin limitación, regiones variables naturales (por ejemplo, del repertorio de genes de VH o VL de anticuerpos de un animal), regiones variables de anticuerpo artificiales, o una combinación de las mismas. Cada miembro de la genoteca puede comprender secuencias FR1-FR3 codificadas por un único gen VH o VL de anticuerpo (por ejemplo, un gen VH o VL humano). Las secuencias de la región FR1-FR3 pueden ser secuencias humanas. En particular, las secuencias de la región FR1-FR3 pueden ser secuencias de la región variable de anticuerpo humano naturales de las células B de donantes sanos.

El dominio V puede comprender además una región FR4. La región FR4 puede ser del anticuerpo de referencia o de otra fuente. Las fuentes adecuadas incluyen, sin limitación, regiones variables de anticuerpos humanos naturales, regiones variables de anticuerpos artificiales, o una combinación de las mismas.

La genoteca de dominios V se puede generar usando cualquier método reconocido en la técnica incluyendo, sin limitación, síntesis de ácido nucleico *ab initio* y ensamblaje mediado por ADN o ARN polimerasa. Preferiblemente, la genoteca se ensambla por PCR usando oligonucleótidos solapantes. Los oligos adecuados para ensamblar una genoteca de dominio VH incluyen los mostrados en SEQ ID NO: 4-21. Los oligos adecuados para ensamblar una genoteca de dominio VL incluyen los mostrados en SEQ ID NO: 70-102.

El/Los dominio(s) VH o VL no apareados, quiméricos, seleccionados usando los métodos divulgados en el presente documento, se pueden emparejar con un VL o VH complementario, respectivamente, para generar un par VH/VL usando los métodos divulgados en el presente documento.

III. Métodos para la identificación de pares VH/VL estables

También se divulga en el presente documento un método para seleccionar pares VH/VL estables. Este método selecciona pares de unión VH/VL estables basado en la potencia de la interacción no covalente entre dominios VH y VL no apareados y permite la rápida identificación de pares novedosos de dominios VH y VL que tienen una alta termoestabilidad intrínseca. El método en general comprende las etapas de: (a) proporcionar un dominio VH que se

une específicamente a un antígeno; (b) poner en contacto el dominio VH con una genoteca de dominios VL de modo que se forme una genoteca de pares VH/VL; (c) poner en contacto la genoteca de pares VH/VL con el antígeno; y (d) seleccionar de la genoteca de pares VH/VL al menos un par VH/VL que se une específicamente al antígeno.

5 El dominio VH que se usa para cribar pares VH/VL estables puede ser de cualquier fuente (artificial, naturalmente derivado, o una combinación de los mismos). El dominio VH puede ser de un anticuerpo de referencia. El dominio VH también puede ser un dominio VH quimérico seleccionado usando los métodos de CDR3/marco divulgados en el presente documento.

10 La genoteca de dominios VL que se usa para cribar pares VH/VL estables puede ser de cualquier fuente (artificial, naturalmente derivado, o una combinación de los mismos). La genoteca de dominios VL puede ser una genoteca de dominios VL humanos. La genoteca de dominios VL humanos puede comprender secuencias de la región VL de anticuerpos humanos naturales de células B de donantes sanos. Las genotecas de dominios VL divulgadas en el presente documento son particularmente adecuadas para uso en estos métodos.

15 Aunque es preferido cribar una genoteca de dominios VL usando un dominio VH como cebo, el experto en la materia apreciará que también se prevé en el presente documento realizar el cribado opuesto, es decir, cribar una genoteca de dominios VH usando un dominio VL como cebo. Este método general comprende las etapas de: (a) proporcionar un dominio VL que se une específicamente a un antígeno; (b) poner en contacto el dominio VL con una genoteca de dominios VH de modo que se forme una genoteca de pares VH/VL; (c) poner en contacto la genoteca de pares VH/VL con el antígeno; y (d) seleccionar de la genoteca de pares VH/VL al menos un par VH/VL que se une específicamente al antígeno, seleccionando de esta manera un par VH/VL estable.

20 También se divulga en el presente documento un método para seleccionar un par VH/VL estable, en donde el método en general comprende: (a) proporcionar una primera genoteca de presentación de ácidos nucleicos de dominios VH, en donde los miembros de la genoteca comprenden un dominio VH unido a su secuencia codificante de ácido nucleico afín; (b) proporcionar una segunda genoteca de presentación de ácidos nucleicos de dominios VL, en donde los miembros de la genoteca comprenden un dominio VL unido a su secuencia codificante de ácido nucleico afín; (c) poner en contacto la primera genoteca de presentación de ácidos nucleicos con la segunda genoteca de presentación de ácidos nucleicos de modo que se forme una genoteca de pares VH/VL; (d) poner en contacto la genoteca de pares VH/VL con un antígeno; y (e) seleccionar de la genoteca de pares VH/VL al menos un par VH/VL que se une específicamente al antígeno, y (f) ligar las secuencias codificantes de ácido nucleico de los dominios VH y VL en los pares VH/VL seleccionados en la etapa (e). Este método es particularmente ventajoso en que permite el cribado simultáneo de genotecas de dominios VH y VL y la determinación precisa de las secuencias de los dominios VH y VL en cada par VH/VL estable, seleccionado.

25 Las secuencias codificantes de ácidos nucleicos en cada par VH/VL seleccionado se pueden ligar usando cualquier medio apropiado reconocido en la técnica (por ejemplo, químico y/o enzimático). El ARN se puede ligar con, por ejemplo, ARN ligasa. El ADN se puede ligar con, por ejemplo, ADN ligasa. La ligación de las secuencias codificantes de ADN de los dominios VH y VL se puede facilitar mediante el uso de, por ejemplo, enlazadores de ácido nucleico, adaptadores y/o digestión de enzimas de restricción. Las secuencias codificantes de ácido nucleico del dominio VH y VL en cada par VH/VL seleccionado se pueden ligar para formar una única secuencia de ácido nucleico continua (lineal o circular), y las secuencias de los dominios VH y VL presentes en la secuencia de ácido nucleico continua se determinan. La determinación de las secuencias de ácidos nucleicos se puede lograr por cualquier medio reconocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, secuenciación de ADN de molécula única.

30 Los métodos anteriores para la identificación de pares VH/VL estables son particularmente adecuados para uso en combinación con los métodos de reorganización CDR3/marco, divulgados en el presente documento. Esta combinación de métodos permite la selección de un par VH/VL estable, novedoso específico para un antígeno diana usando solo una secuencia CDR3 específica de antígeno como punto de partida.

35 Los métodos divulgados en el presente documento son particularmente útiles para cribar pares VH/VL estables. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los métodos divulgados en el presente documento se pueden usar en un sentido más amplio para cribar cualquier dímero de proteínas estable, en donde al menos un monómero del dímero se une a un ligando. Los dímeros proteicos adecuados incluyen, sin limitación, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (por ejemplo, receptores de células T), hormonas, citoquinas, factores de transcripción, y similares.

60 **IV. Métodos de producir anticuerpos biespecíficos** (no es parte de la invención reivindicada)

También se divulga en el presente documento un método para seleccionar un par VH/VL estable, biespecífico (por ejemplo, un par VH/VL en el que los dominios VH y VL se unen a dos antígenos diferentes). El método en general comprende las etapas de: (a) proporcionar un dominio VH que se une específicamente a un primer antígeno; (b) poner en contacto del dominio VH con una genoteca de dominios VL de modo que se forme una genoteca de pares VH/VL; (c) poner en contacto la genoteca de pares VH/VL con un segundo antígeno; (d) seleccionar de la genoteca de pares VH/VL al menos un par VH/VL que se une específicamente al segundo antígeno; y (e) poner en contacto el/los par(es)

VH/VL seleccionado(s) en la etapa (d) con el primer antígeno; y (f) seleccionar al menos un par VH/VL que se une específicamente al primer antígeno.

El primer y segundo antígenos pueden ser diferentes epítomos presentes en una única molécula, o el primer y segundo antígenos pueden ser epítomos en dos moléculas separadas.

Puede ser deseable seleccionar una cadena ligera promiscua que se pueda unir a al menos dos dominios VH diferentes (con diferentes especificidades de antígeno), pero que no pueda, ella misma, específicamente unirse a un antígeno (por ejemplo, tiene una baja afinidad para todos los antígenos). Tales cadenas ligeras son particularmente útiles en que se pueden usar en el ensamblaje de anticuerpos heterotetraméricos, biespecíficos de longitud completa. Estos anticuerpos biespecíficos en general comprenden una primera cadena pesada con una primera especificidad de antígeno, una segunda cadena pesada con una segunda especificidad de antígeno, y dos moléculas de la cadena ligera promiscua seleccionada, en donde cada cadena pesada se aparea con una molécula de cadena ligera promiscua diferente.

V. Métodos de cribado de genotecas

El experto en la materia apreciará que cualquier tipo de genoteca de expresión de dominios VH o VL se puede emplear en los métodos divulgados en el presente documento. Las genotecas de expresión adecuadas incluyen, sin limitación, genotecas de presentación de ácidos nucleicos, presentación en fagos, presentación retroviral, y presentación en superficie celular (por ejemplo, células de levadura, mamífero, y bacterianas). La genoteca puede ser una genoteca de presentación de ácidos nucleicos. Preferiblemente, la genoteca de presentación de ácidos nucleicos es una genoteca de presentación de ADN construida como se ejemplifica en el presente documento o en el documento WO2010/01194.

Los métodos para cribar genotecas de presentación se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Antibody Engineering: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology Volumen 248, (B.K.C. Lo, Ed) Humana Press, 2004 (ISBN: 1-58829-092-1. Los métodos adecuados de cribar genotecas de presentación de ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, los mostradas en, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 7.195.880; 6.951.725; 7.078.197; 7.022.479; 6.518.018; 7.125.669; 6.846.655; 6.281.344; 6.207.446; 6.214.553; 6.258.558; 6.261.804; 6.429.300; 6.489.116; 6.436.665; 6.537.749; 6.602.685; 6.623.926; 6.416.950; 6.660.473; 6.312.927; 5.922.545; y 6.348.315, y en el documento WO2010/011944. Preferiblemente, el cribado de genotecas de presentación de ácidos nucleicos se realiza como se ejemplifica en el presente documento o en el documento WO2010/01194.

Los métodos divulgados en el presente documento son particularmente adecuados para generar dominios VH o VL, y/o pares VH/VL que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. Para aumentar la afinidad por el antígeno, se pueden realizar múltiples rondas de cribado de genoteca, introduciendo diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en cada ronda de cribado, si se desea. Si se desea, la rigurosidad del método se puede aumentar alterando las condiciones del ensayo para reducir la afinidad de los dominios VH o VL por el antígeno, por ejemplo, alterando el pH y/o la concentración de sal de la reacción de unión al antígeno. Tales métodos enriquecen selectivamente para dominios VH o VL con la mayor afinidad y estabilidad.

Los métodos divulgados en el presente documento también permiten la selección de dominios VH o VL, y/o pares VH/VL que tiene una especificidad de antígeno diferente a la del anticuerpo de referencia inicial. Por ejemplo, la HCDR3 de un anticuerpo que solo se une a PDGFRb humano se puede usar para seleccionar un dominio VH, y/o un par VH/VL que se une a PDGFRb tanto humano como de ratón. Tal selección se ejemplifica en el ejemplo 2 en el presente documento.

Se puede introducir diversidad adicional de secuencias de aminoácidos en la genoteca de dominios VH o VL, o el/los dominio(s) VH o VL seleccionado(s) de la genoteca. Se puede introducir diversidad de secuencias de aminoácidos por cualquier medio reconocido en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir diversidad de secuencias de aminoácidos por alteración de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) la genoteca de dominios VH o VL, o el dominio VH o VL. También se puede introducir diversidad de secuencias de aminoácidos por mutagénesis aleatoria. Tal mutagénesis aleatoria se puede lograr, por ejemplo, por amplificación por PCR de baja fidelidad de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) la genoteca de dominio VH o VL, o el dominio VH o VL.

VI. Formatos de anticuerpos

Los dominios VH y/o VL empleados en los métodos divulgados en el presente documento se pueden usar en aislamiento o fusionados a aminoácidos (por ejemplo, etiquetas epítomo) y/o dominios adicionales. Al menos un dominio VH en una genoteca se puede fusionar a al menos un dominio CH1, dominio CH2, dominio CH3 o una combinación de los mismos. En particular, al menos un dominio VH en una genoteca se puede fusionar con al menos una región constante de la cadena pesada que comprende al menos un dominio CH1, dominio CH2 y dominio CH3. Al menos un dominio VL en una genoteca se puede fusionar con al menos una región constante de la cadena ligera.

Los dominios VH o VL, y/o pares VH/VL seleccionados usando los métodos divulgados en el presente documento se pueden incorporar a otro formato de anticuerpo incluyendo, sin limitación, scFv, Fab y/o anticuerpo tetramérico completo.

5 VII. Ejemplos

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que no se deben considerar como más limitantes.

10 Ejemplo 1. Aislamiento de dominio VH que se unen específicamente a PDGFRb humano

Se seleccionaron dominios VH que se unen específicamente a PDGFRb humano usando presentación de ADN como se muestra en el documento WO2010/011944. Específicamente, una genoteca de presentación de ADN de dominios VH humanos, sin exposición previa, que contenía derivada de 10 donantes de médula ósea se sometió a seis rondas de selección frente a PDGFRb humano. Los unidores seleccionados se clonaron y secuenciaron. De este cribado se seleccionaron los clones de dominio VH A4, B4 y G2, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de dominios VH que se unen a PDGFRb ejemplares

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos de VH	SEQ ID NO.
A4 XB1511	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAIHGGDRSYWGQGLTVTVSS	1
B4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAIHGGDRSYWGQGLTVTVSS	2
G2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS KDTAVYYCAIHGGDRSYWGQGLTVTVSS	3

20 Ejemplo 2. Reorganización de HCDR3

A. Construcción de la genoteca de VH

25 Para cribar dominios VH con características de unión mejoradas, la secuencia HCDR3 del clon A4 (designado XB1511) se reorganizó en una genoteca de VH humana sin exposición previa, que se seleccionó adicionalmente para unión a PDGFRb humano y de ratón. Específicamente, la secuencia de ADN que codifica la HCDR3 del clon A4 (SEQ ID NO: 1) se sintetizó y ensambló en una genoteca que comprende las regiones marco 1-3 de dominios VH humanos sin exposición previa amplificados de células B de médula ósea y CMSP usando oligonucleótidos específicos de la región marco. Las regiones marco 1-3 de VH humanos se amplificaron usando cebadores 5' específicos de la familia VH y 3' inversos de FR3 genéricos para crear genotecas separadas de regiones marco de la familia VH. Las genotecas marco de la familia VH y la HCDR3 XB1511 se reorganizaron por amplificación por PCR adicional usando oligos 5' T7TMV y 3' XB1511 FR3CDR3FR4. Esto también añadió una secuencia promotora T7TMV en el extremo 5' para la transcripción/traducción *in vitro*. También se añadieron una secuencia Cu3 C-terminal y una etiqueta FLAG (para la purificación después de la traducción) por PCR usando cebadores FR4 Cu3 inverso y Y109, respectivamente, junto con el cebador 5' T7TMV. Las secuencias de ácidos nucleicos de los oligonucleótidos usados para la preparación de la genoteca de VH con HCDR3 reorganizada se muestran en la tabla 2. Una representación esquemática del concepto general de la reorganización CDR3/marco se muestra en la figura 1, y una representación esquemática de la construcción de la genoteca de VH se muestra en la figura 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos para la construcción de genotecas de VH con HCDR3 reorganizada

Oligo	Secuencia	SEQ ID NO.
FR3 Inverso	CGCACAGTAATACACGGC	4.
VH1a	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCAGCTGGTGCAGTCTG	5.
VH1b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTG	6.
VH1c	CAATTACTATTTACAATTACAATGSAGGTCCAGCTGGTACAGTCTG	7.
VH1d	CAATTACTATTTACAATTACAATGCARATGCAGCTGGTGCAGTCTG	8.
VH2	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGRTCACCTTGAAGGAGTCTG	9.
VH3a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	10.
VH3b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG	11.
VH3c	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG	12.
VH4a	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGSTGCAGCTGCAGGAG	13.
VH4b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG	14.
VH5	CAATTACTATTTACAATTACAATGGARGTGCAGCTGGTGCAGTCTG	15.
VH6	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG	16.
VH7	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTG	17.
T7TMVUTR	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA	18.

Oligo	Secuencia	SEQ ID NO.
XB1511 FR3CDR3FR4 Inverso	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTAGCTCCTGTCTG CCCCCATGTTCTCGCACAGTAATACACGGC	19.
FR4 Cu3 Inverso	GGAGACGAGGGGGAAAAGGGTTGAGGAGACGGTGACCAG	20.
Y109	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAGCGGATGCTAAGGACGACTTG TCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGGAGACGAGGGGGAAAAGGGT	21.

B. Cribado de genoteca

La genoteca de dominio VH con HCDR3 reorganizada se transcribió después a una genoteca de ARNm y se sometió a selección con tecnología de presentación de ADNbc como se muestra en el documento WO2010/011944. Una representación esquemática del método de cribado se muestra en la figura 3. La selección se llevó a cabo con PDGFRb humano y de ratón en rondas alternas durante 4 rondas. Se aplicó selección de asociación y disociación controlada cinética en rondas sucesivas para aumentar la rigurosidad de la selección para mejorar la afinidad. Específicamente, la selección se realizó como sigue: Ronda 1 (R1) con 10 nM de PDGFRb humano inmovilizado; R2 con PDGFRb de ratón 100 nM inmovilizado; R3 con PDGFRb humano soluble 10 nM y competía con PDGFRb humano inmovilizado 200 nM durante 24 horas y 120 horas; y R4 con PDGFRb de ratón 10 nM. El conjunto de unión de R4 se subclonó para secuenciación de ADN. El análisis de las secuencias del conjunto de unión de R4 mostró que la HCDR3 de XB1511 estaba presente en una variedad de contextos de marco diferentes. No se obtuvo secuencia parental de tipo salvaje del conjunto de secuencias analizadas. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH seleccionados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de dominios VH que se unen a PDGFRb ejemplares seleccionados de genotecas de VH con HCDR3 reorganizada

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos de VH	SEQ ID NO.
	marco de XB1511 reorganizado y seleccionado con 2 rondas en dianas de PDGFRb humano y 2 rondas de ratón	
XB2202	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAI SWVRQAPGQG LEWIGGILPILKTPNYAQRFGGRVTINAEDESTSTVYMEMSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	22.
C4.	QMQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAI SWVRQAPGQG LEWIGGILPILKTPNYAQRFGGRVTINAEDESTSTVYMEMSGLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	23.
B12.	QMQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAI SWVRQAPGQG LEWIGGILPILKTPNYAQRFGGRVTINAEDESTSTVYMEMSSLRS ENTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	24.
D07.	QMQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAI SWVRQAPGQG LEWIGGILPILKTPNYAQRFGGRVTINAEDESTSTVYMEMSSLRS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	25.
C05.	QMQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAI SWVRQAPGQG LEWIGGVLPILKTPNYAQRFGGRVTINAEDESTSTVYME LSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	26.
E05.	QVQLVQSGPKVKKPGSSVRVSCASGGTFSRHAI SWVRQAPGQG LEWIGGILPILKTPNYAQRFGGRVTINAEDESTSTVYMEMSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	27.
E2.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKISCKTSGYTFTDYYIQWVRQAPGQG LEWVGWINPNSGNTGYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDYSYWGQGLVTVSS	28.

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos de VH	SEQ ID NO.
	marco de XB1511 reorganizado y seleccionado con 2 rondas en dianas de PDGFRb humano y 2 rondas de ratón	
A3.	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYTFSDYYIQWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTYFAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	29.
C3.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQG LEWIGGILPILKTPNYAQRFFQGRVTINADESTSTVYMEMSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	30.
F10.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTYFAQKFQGRVAMTRDTSINTAYMELSSLRS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	31.
C12.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYIQWVRQAPGEG LEWMGWMNPDSGGTIYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRLP DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	32.
H2.	QMQLVQSGAEVKNPGASVKVSKASGYPFSAYYIQWVRQAPGQG LEWMGWLNPNSGDTHSAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLTS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	33.
F11.	QMQLVQSGAEVKNPGASVKVSKASGYPFSAYYIQWVRQAPGQG LEWMGWLNPNSGDTHSAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGPTS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	34.
B1.	QMQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGSFSDYYIHWVRQAPGQG LEWIGWINPNNGNTTYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSELRS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	35.
E11.	QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSKASGYTFTDYYIHWVRQAPGQG LEWMRGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	36.
H1.	EVQLLESQAEVKQPGASVKVSKTSYTFDYYHLHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNSAPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLTS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	37.
E6.	QMQLVQSGAEVKRPGASVKVPCKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQG LKWGMWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRLS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	38.
A1.	QVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGFTFTSSAVQWVRQARGQR LEWIGWIVVSGSNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	39.
H7.	QVQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGFTFTSSAMQWVRQARGQR LEWIGWIVVSGSNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	40.
G04.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTSYAISWVRQARGQR LEWIGWIVVSGSNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	41.
B2.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTNYQVQWVRQAPGQG LEWLGWINTGVGSTNYAQKFQGRVTMTRDTATSTVYEMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLVTVSS	42.

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos de VH	SEQ ID NO.
	marco de XB1511 reorganizado y seleccionado con 2 rondas en dianas de PDGFRb humano y 2 rondas de ratón	
A7.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTFTNYPVQWVRQAPGQG LEWLGVINFGVSTNYAQKFQGRVTMTTDTATSTVYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	43.
H3.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGYTFTNSFMQWVRQVPGQR LEWVGLSNPSGDYTVYAPKFQGRVTMTTDTATSTFYMELFSLRS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	44.
B4.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGYTFTNSFMQWVRQVPGQR LEWVGLSNPSGDYTVYAPKLQGRVTMTTDTATGTFYMELFSLRS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	45.
H05.	EVQLVQSGGGVVPVPGGSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKG LEWVAFILFDGNNKYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	46.
D06.	QVQLVQSGGGVVPVPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKHGGDRSYWGQGLTVTVSS	47.
F3.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFISHGMSWVRQAPGQG LEWMGWISADNGNTNYAQKFQERVITITRDMSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	48.
A12.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFISHGMSWVRQAPGQG LEWMGWISADNGNTKYAQKFQDRVLTITDTSTSTAYLELRLSLRS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	49.
G3.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKG LEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRLRS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	50.
F05.	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSKASGYTLTELSMHWVRQAPGKG LEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	51.
H12.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDNYVHWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	52.
G12.	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGAFNAYPISWVRQAPGQG LEWMGGIIPVSGTPNYAQKFQGRVTITADKSTYTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	53.
C06.	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCMASGYTFTGHYIHWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYTELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	54.
C11.	QVQLVQSGAAVKKPGASVKVSRKASGYTFTNDYIHWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	55.
F08.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSYIHWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAMYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	56.

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos de VH	SEQ ID NO.
	marco de XB1511 reorganizado y seleccionado con 2 rondas en dianas de PDGFRb humano y 2 rondas de ratón	
E9.	QVQLVESGAEVKPGESLQISCKASGYRFTNYWIGWVRQMPGKG LEWMGITYPADSTTVYSPSFQGGVTISADKSISTVFLQWSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	57.
E11.	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKG LVWVSRINNDGSSTSYADSVKGRFTISRDTAKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	58.
H11.	QVQLLESAGAEVKNPGASVKVSCASGYPFSAYYIQWVRQAPGQG LEWMGWLNPNSGDTHSAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSGLTSS DDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	59.
C08.	EVQLLESEGGVLVQPGGSLRLSCTASGFSFNAFWMHWRQAPGKG LEWVSRISIDGTTTTYADSVQGRFTISRDNARNTLYLQMNSLRA EDAAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	60.
	marco de XB1511 reorganizado y seleccionado con PDGFRb humano y selección de disociación	
XB2708	QVQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSRSYGMHWVRQAPGKG LEWVAFILFDGNKKYYADSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	61.
D03.	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFGNDWMHWVRQAPGKG LVWVSRINADGTSTAYAESVKGRFTVSRDNTAKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	62.
A10.	QVQLVQSGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFDDYAMNWRQAPGKG LEWVSLIYSDGSTYYADSVKGRFTISRDNSSKNTLYLQMNSLRA DTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	63.
C09.	QVQLVQSGGALVQPGGSLRLSCAASGFTLSNNAMSWVRQAPGKR LEWVSAIDSGGTTYAGSVKGRFTISSDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	64.
A06.	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGHWMHWVRQVPGKG LVWVSHISNDGSITRYADSVKGRFTVARDNAKNTMYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	65.
C05.	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSNWMHWVRQVPGKG LEWVSRITDGSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	66.
H01.	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSDWMHWVRQAPGKG LVWVSRISDGSSTAYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	67.
G04.	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSDWMHWVRQAPGKG LVWVSRISDGSSTAYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	68.
G07.	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDWMHWVRQAPGEG LVWVSRISDGSSTAYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMNSLRA EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGLTVTVSS	69.

C. Especificidad de unión de dominios VH con HCDR3 reorganizada seleccionados

- 5 El grupo de unión de R4 seleccionado anteriormente se evaluó para unión a PDGFRb tanto humano como de ratón usando una genoteca traducida *in vitro* marcada con ³⁵S Met. Específicamente, se evaluó la unión del grupo a bolas de epoxi, 100 nM de IgG humana, PDGFRb humano y PDGFRb de ratón. Como se muestra en la figura 4, el dominio VH XB1511 parental mostró unión específica a PDGFRb humano, y unión indetectable a PDGFRb de ratón. La genoteca preseleccionada con región marco reorganizada mostró unión débil a PDGFRb humano. Sin embargo, al
- 10 contrario, la genoteca de región marco reorganizada en R4 mostró unión significativa a PDGFRb tanto humano como de ratón.

D. Afinidad de unión de dominios VH con HCDR3 reorganizada seleccionados

El grupo de dominios VH enriquecido para PDGFRb humano y de ratón con región marco reorganizada de R4 se clonó en vectores de expresión de *E. coli*, se produjo y purificó. La cinética de unión de los dominios VH a PDGFR humano y de ratón se determinó usando resonancia de plasmón de superficie en un Biacore T100. Brevemente, proteínas de fusión quiméricas PDGFR humano y de ratón-Fc de hlgG1 se inmovilizaron por separado usando un chip sensor serie CM5 (CM5) acoplado a anticuerpo monoclonal anti-Fc de hlgG1. Para cada ciclo, la proteína de fusión de PDGFR se capturó primero, seguido por la inyección de VH durante 115 segundos a una velocidad de flujo de 100 ul/min (asociación). Inmediatamente después de la fase de asociación hay una fase de disociación de 600 segundos. La superficie se regeneró en cada ciclo con una única inyección de MgCl₂ 3 M (10 ul/ml, 60 segundos). Se inyectaron múltiples concentraciones de VH (0,55 nM – 40 nM) y el sensograma resultante se analizó con software de evaluación T100. La cinética de unión se determinó usando ajuste de curva de unión 1:1. La cinética de unión de los clones de dominio VH XB2202 y XB2708 a PDGFRb humano y de ratón se muestran en las figuras 4, 5 y 6. Estos resultados muestran que XB2202 y XB2708 tienen una mejora de la afinidad de 50-150 veces comparado con XB1511 parental. Específicamente, XB2202 y XB2708 tienen K_d de 249 pM y 93 pM, respectivamente y disociaciones (K_{off}) de 1,86 x 10⁻³ y 9,267 x 10⁻⁴, respectivamente. Tanto XB2202 como XB2708 se unieron a PDGFRb humano y de ratón. Es de interés particular que, aunque comparten la misma HCDR3, XB2202 derivaba de una secuencia de línea germinal de la familia VH1 y XB2708 derivaba de una secuencia de la línea germinal de la familia VH3.

Ejemplo 3. Identificación de pares VH/VL estables

A. Construcción de genotecas de ADN de VL

Se construyeron genotecas de VL humanas (Vkappa y Vlambda) a partir de células B de donantes sanos jóvenes (Allcells) por RT-PCR. Para asegurar la diversidad de la genoteca, se obtuvieron 300 millones de células mononucleares de médula ósea de cada donante y total de 10 donantes y 100 millones de células mononucleares de sangre periférica de cada donante y total de 10 donantes para la construcción de genotecas de VH y VL sin exposición previa. Un esquema del método de generación de la genoteca se muestra en la figura 8.

Los cebadores oligonucleotídicos para la síntesis de ADNc y posterior amplificación por PCR de las secuencias Vkappa y Vlambda se diseñaron como se muestra en la tabla 4. Específicamente, se diseñaron múltiples oligos sentido para las regiones FR1 de Vk y Vλ de cada familia con una secuencia UTR anterior. Los cebadores antisentido para la amplificación de los genes κ y λ se diseñaron a partir de las regiones constantes anidados a Cκ1 (Cκ2) o Jλ con la misma Cκ2 posterior (JκCκ2). Las genotecas de Vk y Vλ portan la misma secuencia C-terminal para la amplificación por PCR durante los ciclos de selección.

Se preparó ARNm con donantes individuales usando un kit de preparación de ARNm FastTrack (Invitrogen) según el protocolo proporcionado por el kit. La primera hebra de ADNc se sintetizó a partir del ARNm aislado usando cebadores específicos para las regiones constantes kappa y lambda de la cadena ligera (Cκ1 y Cλ1).

La amplificación por PCR de las secuencias de Vkappa y Vlambda se realizó con oligos específicos de familia Cκ2 y Vk o mezcla JλCκ2 y oligos específicos de familia Vλ usando ADNc sintetizado del ARNm preparado de las varias fuentes de células B como molde. La PCR se realizó con familias individuales y donantes individuales durante 18-20 ciclos. Después de la purificación en gel, las genotecas de Vk y Vλ de diferentes fuentes se juntaron para generar genotecas Vk y Vλ.

Tabla 4. Oligonucleótidos para construir genotecas de presentación de ADN de Vλ y Vk humanas.

Oligo	Secuencia	SEQ ID NO.
Cκ1	CAACTGCTCATCAGATGGCGG	70.
Cλ1	CAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG	71.
Cκ2	AGATGGTGCAGCCACAGTTTCG	72.
JH1-3Cκ2	AGATGGTGCAGCCACAGTTTCGTAGACGGTSASCTTGTTCCC	73.
J17Cκ2	AGATGGTGCAGCCACAGTTTCGGAGACGGTCAGCTGGGTGCC	74.
T7TMVUTR	TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACA	75.
Oligos Vλ		
UTRVκ1a	CAATTACTATTTACAATTACAATGRACATCCAGATGACCCAG	76.

Oligos V λ		
UTRVk1b	CAATTACTATTTACAATTACAATGGMCATCCAGTTGACCCAG	77.
UTRVk1c	CAATTACTATTTACAATTACAATGGCCATCCRGATGACCCAG	78.
UTRVk1d	CAATTACTATTTACAATTACAATGGTCATCTGGATGACCCAG	79.
UTRVk2a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGATATTGTGATGACCCAG	80.
UTRVk2b	CAATTACTATTTACAATTACAATGGATRTTGTGATGACTCAG	81.
UTRVk3a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAATTGTGTTGACRCAG	82.
UTRVk3b	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAATAGTGATGACGCAG	83.
UTRVk3c	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAATTGTAATGACACAG	84.
UTRVk4a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGACATCGTGATGACCCAG	85.
UTRVk5a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAACGACACTCACGCAG	86.
UTRVk6a	CAATTACTATTTACAATTACAATGGAAATTGTGCTGACTCAG	87.
UTRVk6b	CAATTACTATTTACAATTACAATGGATGTTGTGATGACACAG	88.
Oligos V λ		
UTRVL1a	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGTCTGTGCTGACKCAG	89.
UTRVL1b	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGTCTGTGYTGACGCAG	90.
UTRVL2	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGTCTGCCCTGACTCAG	91.
UTRVL3a	CAATTACTATTTACAATTACAATGTCCTATGWGCTGACTCAG	92.
UTRVL3b	CAATTACTATTTACAATTACAATGTCCTATGAGCTGACACAG	93.
UTRVL3c	CAATTACTATTTACAATTACAATGTCTTCTGAGCTGACTCAG	94.
UTRVL3d	CAATTACTATTTACAATTACAATGTCCTATGAGCTGATGCAG	95.
UTRVL4	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGCYTGTGCTGACTCAA	96.
UTRVL5	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGSCTGTGCTGACTCAG	97.
UTRVL6	CAATTACTATTTACAATTACAATGAATTTTATGCTGACTCAG	98.
UTRVL7	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGRCTGTGGTGACTCAG	99.
UTRVL8	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGACTGTGGTGACCCAG	100.
UTRVL4/9	CAATTACTATTTACAATTACAATGCWGCCTGTGCTGACTCAG	101.
UTRVL10	CAATTACTATTTACAATTACAATGCAGGCAGGGCTGACTCAG	102.
	R = A/G, Y = C/T, K = G/T, M = A/C, S = G/C, W = A/T	

B. Generación de genotecas de fusión de VL por presentación de ADNbc

Las genotecas de ADN de Vk y VL generadas usando los métodos mostrados en este ejemplo se transcribieron a genotecas de ARNm usando el kit T7 Megascript (Invitrogen, Cat# AM1334). El ARNm se purificó por RNeasy MiniElute Cleanup Kit (Qiagen, Cat# 74204) según el protocolo proporcionado en el kit. Un total de 600 pmol de ARN (300 pmol de genotecas Vk y Vl) se ligó y ensambló con enlazadores de presentación de ADNbc y componentes como se describe en el documento WO2010/011944. La genoteca de VL ensamblada se sometió a un sistema de traducción *in vitro* para crear una genoteca de fusión en la que cada dominio VL (fenotipo) está establemente fusionado a su secuencia codificante (genotipo). Se incorporó ³⁵S Met en el proceso de traducción para radiomarcas las fusiones. La genoteca se purificó después con oligo dT celulosa, se convirtió a una genoteca de presentación de ADNbc usando las técnicas de biología molecular estándar de transcripción inversa, digestión con RNasa H, síntesis de la 2ª hebra de ADN, seguido por purificación por etiqueta flag. Un esquema de este proceso se muestra en la figura 3.

C. Identificación de pares de VL para dominio VH XB1511, y XB2202

Como prueba de concepto, se tradujo el dominio de unión de VH a PDGFRb XB1511 como proteína libre (con incorporación de ³⁵S Met en la reacción de traducción) y se purificó por afinidad a través de una etiqueta flag C-terminal. XB1511 y una genoteca de fusión de VL purificada (preparada como antes) se mezclaron después a una proporción molar igual y se incubaron a 25°C durante la noche para permitir la asociación *in vitro* de los dominios de fusión VH y VL a través de su parche hidrofóbico. La mezcla se puso en contacto después con la diana PDGFRb preinmovilizado en bolas de Epoxi450 o en solución y se capturó mediante bolas de proteína A. Los complejos que se

unieron a la diana PDGFRb inmovilizado se lavaron y eluyeron con KOH 0,1 N. Se realizó PCR con conjuntos de cebadores específicos para VL para recuperar los VL que se unieron a la diana de PDGFRb, tanto como pares VH-VL y como dominios VL no apareados. El emparejamiento de VL se realizó durante 3 rondas, con baja rigurosidad (PDGFRb 100 nM) para las 2 primera rondas y mayor rigurosidad (PDGFRb 10 nM) para la tercera ronda. El dominio de unión de VH a PDGFRb XB2202 también se emparejó con genoteca VL similarmente durante 2 rondas. Para cada ronda de emparejamiento y selección de VL a XB2202, la rigurosidad se aumentó por estrategia de asociación y disociación controlada cinética para identificar los VL que se pueden emparejar con VH de forma estable y aumentar la unión de VH. Un esquema de este proceso se muestra en la figura 9.

Los grupos de VL identificados anteriormente se clonaron después en el vector Blunt Zero TOPO (Invitrogen) y las secuencias de ADN que codifican VL se amplificaron de las colonias bacterianas resultantes por PCR usando cebadores directo e inverso de M13. Las secuencias de ADN codificantes de VL amplificadas individuales se secuenciaron después. Los datos de secuencia obtenidos de los conjuntos de VL mostraron que un repertorio diverso de VL se enriquecía mediante el proceso. Múltiples familias y marcos estaban presentes en el grupo. Varios VL estaban presentes como replicados o familias. Se pudieron identificar distintas familias de VL y varios VL estaban presentes más de una vez. Las secuencias de VL ejemplares identificadas usando los métodos de la invención que se emparejan con los dominios VH de unión a PDGFRb XB1511 y XB2202 se muestran en la tabla 4 en el presente documento.

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de dominios variables (VL) de la cadena ligera de anticuerpos anti-PDGFR β ejemplares.

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos VL	SEQ ID NO.
	Secuencias de VL PR2 de apareamiento con XB1511	
B10.	QSVLTQSPDLQSVTPREKLTITCRASQTIGSTLHWYQQKPGQSPRLVIKYAYQSVSGVPSRFSGSGTEFTLTINGLEAEDAATYYCHQSSSLPWTFGQGTKLTVL	103
H10.	QSVLTQSPDFQSVSPKDKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPGQSPKLLIKYSSQSFSGVPSRFSGSASGTEFTLTITGLEAEDAATYYCHQSSSLPHTFGQGTKVTVL	104
F10.	QSVLTQSPEFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSGLHWYQQKPHQSPKLLIRYASQSMGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISRLEVEDAAMYCHQSSSLPWTFGQGTKVTVL	105
B12.	QSVLTQSPDFQSVTPKQNVTFPCRASQSIGIKLHWYQQKPDQSPKVLIKYASQPFSGVPSRFSGRSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQTSSLPLTFGGGKTKVTVL	106
B11.	QSVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRASGIPVRVSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQGSSPWTFGQGTKLTVL	107
E7.	QSVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQGSSPQTFGQGTKLTVL	108
E8.	QSVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQGSSPPYTFGQGTKLTVL	109
H8.	QSVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYAGSPFTFGPGTKLTVL	110
H12.	QSVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSYVAVYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFTGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYHCQYQGSSPWTFGQGTKLTVL	111

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos VL	SEQ ID NO.
	Secuencias de VL PR2 de apareamiento con XB1511	
F8.	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGGRSNIGGNVNWYQQKPGQAP RLLIHVASRRVTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYCQ QYGSSPLTFGGGTKLTVL	112
D11.	QSVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQNIITSNFFAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRISGSGSGTDFTLTISRLEPEDFALYYCQ QYGASPRTFGQGTQLTVL	113
G8.	QSVLTQSPGTLSLSPGDRATLSCRASQSLSGTYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRAAGIPKRFSGSGSRTDFTLTISRVDPADSAVYYCQ QYGSALLTFGGGTKVTVL	114
H9.	QSVLTQSPGTLSLSPGESATLSCRASEDIYNNYLAWYQHKRGQPP RLLI FRASTRATGIPTRFSGSGSGRDFVLTINRLEPEDFAVYYCQ QYGNSTWTFGQGTQLTVL	115
H11.	QSVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPK LLITFASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQ SRNLPFTFGPGTKLTVL	116
G12.	QSVLTQSPDFQSVTPKEEVTITCRASESIGTALHWYQQKPDQSPK LLIKYSSQSIGVPSRFVGRGSETEFTLTINSLEAENAATYYCHQ SRSFPLTFGQGTQLTVL	117
E11.	QSVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRSTQILHSQYLAWYQQKRGQAP RLLI FRASTRATGIPERFSGSGSGRDFVLTISRLEPEDSAVYYCQ QYETSWTFGQGTQKTVL	118
F12.	QSVLTQDPVVSVALGQTVRITCQGDTRLRTCYASWYQQRPRQAPIL VIYGENNRPSGIPARFSGSSSGSTASLTITGAQAEDEGDYYCHCR DGLNHLVFGGGTKVTVL	119
C8.	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITSCSGSTSNIGKNFVSWYQHLPGTAP KLLIYDNYQRFSGIPDRFSGFKSGTSATLSITGLQTAEADYYCG TWDSSLSVVFVGGGTKLTVL	120
A8.	QAGLTQSPDFQSVTPKERVITITCRASRYIGSNLHWYQQKPDQPPK LLIKLASQSFSGVPPRFSGGGSGTDFTLTINGLEAEDAATYYCHQ TGSFPYTFGQGTQLTVL	121
B8.	QAVLTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHSPFWFQQRPGQA PRTLIDYDTSNKQSWTPARFSGSLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC LLSYSGPRVVFVGGGTKVTVL	122
F7.	QAVVTQSPDSLAVSLGERATISCKSSXSLLYRSNNKNYLAWYQQK PGQPPRLLI SWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEAEDAA VYYCQSYRTPFSGPGTKVTVL	123
B7.	SYVLTQPLSVSVALGQTARISCGGANIANKNVHWYQLQPGQAPVL VIYRDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTITRAQARDEADYYCQVW DSSSVIIGGGTKVTVL	124
G9.	SYVLTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYRQKPGQAPVL VFYKDNRPSPGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSR DSSAMRWVFGGGTKLTVL	125
A9.	NFMLTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHYFYWFQKPGQV PRTFIYDTHNRHSWTPVRFSGLFGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC LLYFNPTRVFGGGTKLTV	126

ES 2 873 375 T3

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos VL	SEQ ID NO.
	Secuencias de VL PR2 de apareamiento con XB1511	
A11.	NFMLTQPPSASASLGASVTLTCTLSSGYSNYKVDWYQQRPGKGP FVMRVGTGGIVGSKGDGIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESD YHCGADHGRVFGGGTKLTVL	127
E12.	QPVLTPPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYHLRPGQAPVL VIYFDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW HSGVIFGGGTKLTVL	128
H7.	QPVLTSQSLDFQSVTPKEKVTITCRASQNIQNSLHWYQQKPNQSPK VLIKYASQSFSGVPSRFSGSGFGTDFTLTINSLEPEDAATYYCHQ SRSSHTFGQGTCLTVL	129
A10.	EIVLTQSPGNLSLSPGERATLSCRTCTGNIASHFVQWYQQRPGSS PTTVIFGNNQRPSPGVSDRFSGSDSSNSASLTISRLEPEDAATYYCQ YCSFQVYSHVVFGGGTKLTVL	130
C11.	QTVVLTQTPVSLSVTPGQPASISCKSSQSLNSDDGKTYLYWYLQR PGQPPHLLIYEVSKRFSRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVG VFYCMQSTHFPFTFGPGTKVTVL	131
D10.	NIQMTQSPVSLASLGDTVSTICQASHDISNYLNWYQQKPGKAPK LLIYDASHLEAGVPSRFSGSGSGTDFTLTINRLEPEDFAVYYCQ YDSPFWTFGQGTCLTVL	132
D12.	DVVLTSQSPGTMSPGERATLSCRASQSVSRTYLAHWQQKPGQAP RLLIYGASSRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQ QHDTSQWTFGQGTCLTVL	133
C7.	DIVMTQTPSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTHLFWYLQRP GQSPQLLIYEVSGRFSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQGLHIPHTFGQGTKEIK	134
D7.	DIVMTQSPSLPVTGLGQPASISCRSSSHLVHSDGNIYLNWYHQR GQSPRLLIYSVSKRDSGVPDRFSGSGSRTDFTLKISRVEAEDVGV YFCMQSTHQWTFGQGTKEIK	135
C9.	VIWMTQSPSTVSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPN LLIYEASRLSEGIPIRFSGSGSGTEFTLTSSLQPDFAVYYCQ YDSYSRTFGQGTKEIK	136
C12.	DVMTQSPSSLSASVGDRTITCRSTQGIIRNYLSWYQQKPAKAPK LLIHGASGLQSGVPSRFSGSGSGTNFTLTISLQPEDFAVYYCQ SFSMRTFGQGTKEIK	137
D8.	EIVMTQSPGTLTSLPGEGATLSCRASQSVTSNYLAWYQQRPGASS LQSGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGFGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQYVNSRTFGQGTKEIK	138
D9.	EIVMTQSPVTLSPGERATLSCRASQSVSSKLAWYQQKPGQAPR LLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYCQ YNDFFTFGPGTKVDIK	139
G7.	EIVLTQTPSLSPVTGLGQPASISCRSSSPVHSDGNIYLSWLHQR GQPPRLLLYKISNRMSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQATQFPFSGQGTKEIK	140
G11.	EIVLTQSPGTLTSLPGEGATLSCRASQSVSSRLAWYQQKPGQAP RLLIYGGSIRASGTSTRFSGSGSGTDFTLTINRLEPEDFAVYYCQ QYGDVFTFGPGTKVDIK	141

Nombre del clon	Secuencia de aminoácidos VL	SEQ ID NO.
	Secuencias de VL PR2 de apareamiento con XB1511	
F9.	NIQMTQSPSSLSASVGDRVNITCRASDNIGNYLNWYQHKPGKAPT VLIYAASLTHYGVPSRFRSGSGTDFTVTISSLQPEDSATYYCQQ SYSTPRTFGQGTRVELK	142
E9.	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESISNYLNWYQQKPGKAPK LLLSAASRLQSGVPSRFRSGSGTDFTLTITSLQPEDLATYYCQE SYSTLLYTFGGGKLEIK	143
	Secuencias VL de apareamiento con VL XB2202	
B1.	SYELTQPPSVSVAPGKTASITCGGNNIGYDSVHWYQQKPGQAPVL VVFDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW ESGSEHYVFGTGTQLTVL	144
E6.	LPVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGNNIGATTVHWYQHRPGQAPVS VIFYDNDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW ESTSDHPTFGGGTQLTVL	145
F3.	QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVL VIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW DSSSDHWVFGGGTKLTVL	146
H4.	SYELTQSPSVSVPPGQTARITCGGNNIVSKGVHWYQQRPGQAPVL VVYDDSDRPSGIPERFAGFNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVW DSSSGHRGVFGGGTKVTVL	147
H5.	SYELTQPPSVSMAVGKTARITCGGNNLGSKIVHWYQQKPGQAPVV VIYSDRDRPSGVPERFSGSNSGNSATLTISGVEAGDEADYYCQVW DSATDHVVFGGGTKLTVL	148
B5.	SYELTQPPSVSVAPGQTATITCAGNNIGKSVQWYQQKPGQAPVV VVYDDYGRPSGIPERVSGSNSGNTATLTILTRVEAGDEADYYCQVW DSDRHHVVFGGGTKLTVL	149
G6.	QLVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGHNTACWYQQNPGQSPVL VIYQDTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIXRVXAGDEANYCQVW DINDDYAVFGTGTXLTVL	150
C1.	QSVLTQSPGTLSLSPGERATLSCTASQSVSSTYLTWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYVSSPPMYTFGQL	151
F1.	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITISCRASQNIIDYDLAWYQXKPGKAPX LLIYGASNLEGGVPSXFSGXGSGTEFTLTISLQPDXSATYYCQQ YVTPYPLTFGGGTRLEIK	152
A3.	AIQMTQSPSSLSASVGDRVMTTCQASQVIDKYVNWYRQRPKAPK LLIYGASTLESVPSRFRSGSGSGTQFTFSITSVQPEDFATYICQQ YDSVPLTFGGGTILDVKRTVA	153
B4.	DIQLTQSPSSLSASIGDRVITITCQASQDIFHYLNWFQQKPGKAPK LLIYEASNLETGVPSRFRSGSGSVTDFTFTISSLQPEDLATYYCQQ YEDLPSFGGGTKVDIKRTVA	154
B6.	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSFSGSNYLAWYQHKPGQAP RLLIIFAASNRTGIPDRFTGSASGTDFTLTINRVEPEDLAVYYCQ QYGSFPYSFGGKLEIK	155
F2.	NIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQFIHIYLNWYQQKLGKAPK LLIYGASNLERGVPSRFRSGRSETDFTFTIDSLQPEDLATYFCQQ YQNPPFTFGGGTKVEINGTVA	156

	Secuencias VL de apareamiento con VL XB2202	
D3.	AIRMTQSPSSLSASIGDRISVTCRASQDVGIIYVAWFQQKPGKPPR SLIIYAASYLQTAVPPKFRSGSGSGTDFTLTISDLQPDDEFATYYCQQ YKTFPHTFGQGTKLDFKRTVA	157
G2.	VIWMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQDINTWLAWYQQKPGKAPK LLMFKVSTLESQDFSRFSGSGSGTEFTLTIVSSLQPDDEAIYYCQQ YHSYPYTFGQGTRLEIK	158
A4.	DVVTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNWLWYQQKPGKAPK LLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDFATYYCQQ YNNVLRFTFGQGTKVEIK	159
G4.	EIVMTXSPATLSVSPGERVTLSRVSNVFSDLAWYQRKTGQSPR LLIHGASTRATGIPTRFSGSGSGTEFTLTISLXSDDFAVYYCQQ YNKWPTFGQGTKVEIK	160
D5.	AIQLTQSPSSLSASVGDRVNITCRASDNIGNYLNWYQHKPGKAPT VLIYAASLTHYGVPSRFSGSGSGTDFVTITISLRSDDFAVYYCQQ YYNWPPWTFGQGTVDIKRTVA	161
A1.	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPR LLIFEASTRATGISARFSGSGSGTDFTLTISTLEPEDFAVYYCQQ RNGVTFGQGTRLEIK	162
H2.	DIQMTQSPSTLSASVGDTVTITCRATESISIWLAWYQQEPGKAPN LLVSQASSLKTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLHPDDFATYVCQH YHTYPFTFGPGTKVDMKRTVA	163
E2.	EIVLTQSPDSXAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQK PGQPPRLLIYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISRLQAEDVA VYYCQQYYLTPTFTVTFTFGQGTKLEIK	164
F4.	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPK FLIYRATNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPGDFATYYCQQ TNTFPLTFGGGKVEVKRTVA	165
C5.	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQKK PGQPPKLLFYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQQYHTTPYTFGQGTKLEIK	166
E5.	VIWMTQSPSSLSASVGDRVSITCRASQTFSTHLNWLWYQQKPGQPPK LLIFAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINGLQATDFATYYCQQ SFSSFWTFGQGTVDVKRTVA	167
F6.	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVNVYLNWYQQKPGKAPK LLIYSASTLQSGVPSRFTGSGSRTDFTLTINGLQPEDFATYYCQQ SFTTLVTFGPGTRVDVTRTVA	168
G5.	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSSLAWYQQKPGKAPK PLIYDASTLQTVPSRFSGRASGTDFTLTIDSLQPEDFATYCCQQ FNSYPLSFGGGKVELKRTVA	169
A5.	SYELTQPPSASASLGASVTLTCTVSSGYRSYEVDFWQQRPGKGR FVMRVGTGGIVGSRGDGIPDRFSVWGSGLNRYLTIEDIQEEDSD YYCGADHSGSGLNVYVFGTGKVTVL	170
D6.	QLVLTQPPSASASLGASVTLTCTLSDDYSSYNVDWYQQRPGMGPR FLMRVGTGGIVGSRGDGIPDRFSVKGSGLNRYLTIKNIQEEDSD YYCGADHSGSDFVYVFGIGTKLTVL	171

	Secuencias VL de emparejamiento con VL XB2202	
E4.	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGSSNIGSNVNWYQQLPRTAP KLLIYTNNQRPSPGVPDRFSGSGSGTSASLAISGLQSEDEANYCA AWDDSLNGPVFGGGTQLTVL	172
F5.	QSVLTQPPSASGTPGQTVIISCSSGSSNIGSNFGYWYQQFPGTAP KLLIYTDDRPSGVPDRFSGSGSGTTASLAISGLRSEDEADYYCA AWDDRLSGPVFGGGTQLTVL	173
G1.	QTVVTQPPSVSGTPGQRTVISCSSGSSNIGSNSVDWYQQFPGSAP KLLIYTNNQRPSPGVPDRFSGSGSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA TWDDDLNPKWVFGGGTQLTVL	174
E3.	DIVMTQSPSLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHNGYNFLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGI YYCMQALQTSWTFGQGTKLEIK	175
A2.	DICRIRPLIRLTIGTITIYNYNGCCDDTVSTLPAHPWTAGLHLQ SPRRLMYQVSTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYY CMQGTHWPYTFGQGTKLEIRRTVA	176
D1.	DIVMTQTPSLSLSVTPGQPAASICKSSQSLVHRDGKTYLYWYLQKP GHSPQLLVYEASSRFSGVPDRISGSASGTQFTLNISRVEAEDVGL YYCMQSRNLPKTFGQGTKVEIK	177
C4.	SYELTQPTSLSASPGASASLTCTLSGFGNVVSYNIYWYQQKPGSP PQYLLRYRSDSDRHQSGVPSRFSGSGKASANAGILVISALQSD EADYYCMVWYSAWVFGGG	178
E1.	SYELTQPLSVSVALGQTATITCAGNNIGTYVHWYQQRPQAPVL VMYRDTNRPSGISDRFSGSNSGDTATLTICGVQVQDEADYYCHVL DSSTIVIFGGGTQLTVL	179
A6.	QSVLTQSPATLSVSPGERASLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPR LLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCHQ YNNWPLYTFGQGTKLTVL	180
H1.	QSVLTQDPAVPVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPGQAPLL VIYGNTRPSGIPVRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSR DSSGYLLLFGTGKTLTVL	181
B2 .	QAVLTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGHYPYWFQQKPGQA PRTLIDYDASNKHSWTARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYC LLSYSGAGVFGGTGKVTVL	182
C2.	DIQMTQSPSSLSASVGRVAIACRPSQDIGTDLGWYQQKPGKAPK LLIFDSSTLQSGVPSRFSGLSGTDFILITITNLQPEDFATYYCLQ DYSFPYTFGQGTKLQIKRTVA	183
G3.	SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELKYKTCWYHQKPGQSPVL LIYQDTRPSGIPERFSGSRSENTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSHAVFGRGTQLTVL	184
H3.	H3SYVLTQPPSVSVFPGQTARITCSGSTFPKLYSFWYQQKTGQAP LLVIYKDTERPISGIPERFSGSTSGTTVTLLISGVQPEDDADYYCQ SEDSRGPVFGGGTKVTVL	185
D4.	GVVMTQTPSLSLVTLGQPASISCRSSESVDHDDGNTYLSWLQQR GQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEPEDVGV YYCVQATHFPVTFGGGTRVEIK	186
	Secuencias VL de apareamiento con VL XB2202	
C6.	QSALTQPASVSASPGQSVTISCTGTSDDVGRYDYVSWYQQHPGGA PKLILYDVNRRPSGVSDRFSGSKSANKASLTISGLQADDEGDYYC CSYTTGSTLYLFGTGTQLTVL	187

5 D. Evaluación de los pares de VH y VL identificados.

Para evaluar las características de los pares VH-VL identificados, 10-12 scFv de cada conjunto se construyeron y produjeron o bien por traducción *in vitro* o por expresión en *E. coli*, seguido por purificación de afinidad.

Se realizó un ensayo ELISA de unión a PDGFRb para evaluar la unión de los scFv a PDGFRb inmovilizado y determinar la CE50. Específicamente, 2 ug/ml de PDGFRb humano y Fc o IgG humano en PBS se inmovilizaron en placas Maxisorp a 4°C durante la noche. La placa después se lavó y bloqueó con superblock. El lisado de scFv crudo traducido *in vitro* se diluyó 1:3 en PBST 1X. Se cargaron 100 ul de lisado scFv diluido en cada pocillo de placas Maxisorp y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectó el scFv que se unía a PDGFRb inmovilizado por anticuerpo anti-flag-HRP a dilución 1:5000 y un sustrato TMB. La placa se leyó en un lector de placas de Molecular Device con ensayo de punto final a DO 450 nm. Como se muestra en las figuras 10, 11 y 12, en el ensayo de unión por ELISA, más del 50 % de los scFv generados para XB1511 y XB2202 mostraron unión específica a hPDGFRb. Por el contrario, los VL sin aparear solos no mostraron unión a PDGFRb (véase, la figura 13).

La afinidad de varios scFv se determinó por ensayo de unión en equilibrio basado en solución. Específicamente, 120 pmol de ARN de scFv se tradujeron a proteína libre con ³⁵S Met incorporada. La mezcla de reacción traducida se diluyó 3 veces en tampón de unión que contenía PBS 1X con tritón al 0,025 %, BSA 1 mg/ml y ADNmc 0,1 mg/ml. El PDGFRb humano se diluyó en el mismo tampón de unión a concentraciones finales de 100 nM a 0 nM. La mezcla de scFv diluida se incubó con hPDGFRb en un volumen final de 100 ul en placas Kingfisher (Thermofisher Scientific, 97002084). Después de la incubación, se usaron 25 ul de bolas magnéticas de proteína A (Invitrogen) para capturar el PDGFRb de la solución. El PDGFRb capturado se lavó y eluyó en lector kingfisher (Thermofisher Scientific). La cantidad de scFv (marcado con ³⁵S Met) unido al PDGFRb inmovilizado en las bolas magnéticas se contó usando un contador de centelleo y la K_D se calculó con Graph Pad Prism 5. Para los scFv derivados de XB1511 ensayados, 2 scFv mostraron una K_D 8-10 veces mayor, 1 mostró una K_D 2,5 veces mayor y 4 mostraron una K_D similar cuando se compara con VH XB1511 solo (Figura 14). Solo 1 scFv mostró una K_D menor que VH XB1511 solo. Como se muestra en la figura 15, ambos de los scFv derivados de XB2202 ensayados mostraron aproximadamente 8-10 veces mejor KD en comparación con VH XB2202 solo.

Ejemplo 4. Conversión de pares VH-VL a IgG heterotetramérica y demostración de actividad biológica

VH XB1511 y VL D8 se expresaron como IgG heterotetramérica en células 293T. El sobrenadante del cultivo celular se recogió después de 48 horas y 96 horas y la IgG expresada se purificó con bolas de proteína A agarosa. La IgG se produjo a 8 mg/ml sin ninguna optimización. Para evaluar la actividad biológica de la IgG XB1511/D8, se sembraron fibroblastos de prepucio humano HFF-1 en biosensores BIND de 384 pocillos y se dejaron unir durante la noche en medio sin suero. Las células fibroblastos se estimularon después con 5 ng/ml o 10 ng/ml de ligando PDGFBB y se dejaron migrar durante 18 horas. Se capturaron imágenes de escáner BIND cada 15 minutos y se usaron herramientas de análisis de software para medir las longitudes de las huellas de respuestas de migración celular individual. La longitud de la huella se representa mediante un "mapa de calor" desde azul (sin migración) hasta rojo (migración máxima). Como se muestra en la figura 16, la IgG XB1511/D8 fue capaz de bloquear por completo la migración inducida por PDGFBB de fibroblastos humanos.

Ejemplo 5. Termoestabilidad de scFv

Se determinaron la termoestabilidad de VH XB2202 y scFv XB2202-A4. Específicamente, 1 mg/ml de XB2202 y XB2202-A4 se incubaron a 4C, 37C, 60C y 70C durante 12 horas y se realizó ELISA de unión a PDGFRb para ensayar la actividad de unión de la proteína después de la incubación. Como se muestra en la figura 17, VH XB2202 perdió actividad de unión a PDGFRb significativa después de incubación a 60C y perdió por completo la actividad de unión después de la incubación a 70C. La T_m de XB2202 se midió que era aproximadamente 62C. En contraste, scFv XB2202-A4 era completamente activo después de incubación de 12 horas a 70C, lo que indica que la T_m del scFv de XB2202 era mayor de 70C.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un dominio pesado variable (VH) que se une específicamente a un antígeno diana, el método comprende:
 - a) proporcionar una genoteca, preferiblemente una genoteca de presentación de ácidos nucleicos, de dominios VH no apareados, quiméricos, en donde la diversidad está en las regiones FR1-FR3, en donde las secuencias de las regiones FR1-FR3 de dichos dominios son secuencias humanas, y en donde cada miembro de la genoteca comprende la secuencia de la región CDR3 del dominio VH de un anticuerpo de referencia, preferiblemente un anticuerpo de roedor, de lagomorfo, aviar, de camélido, de tiburón o humano, que se une específicamente al antígeno diana;
 - b) opcionalmente introducir, preferiblemente por mutagénesis aleatoria, diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en la genoteca de la etapa (a);
 - c) poner en contacto la genoteca con el antígeno;
 - d) seleccionar de la genoteca al menos un VH no apareado quimérico que se une específicamente al antígeno diana, produciendo de esta manera un dominio VH que se une específicamente al antígeno diana; y
 - e) opcionalmente introducir, preferiblemente por mutagénesis aleatoria, diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en el/los dominio(s) VH seleccionado(s) en la etapa (d).
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además combinar el/los dominio(s) VH seleccionado(s) en la etapa (d) con un dominio VL complementario.
3. Una genoteca de presentación de ácidos nucleicos, de dominios VH no apareados, quiméricos en donde la diversidad está en las regiones FR1-FR3 de dichos dominios, en donde las secuencias de las regiones FR1-FR3 de dichos dominios son secuencias humanas, y en donde cada miembro de la genoteca comprende la secuencia de la región CDR3 del dominio VH de un anticuerpo de referencia, preferiblemente un anticuerpo de roedor, de lagomorfo, aviar, de camélido, de tiburón o humano.
4. El método o genoteca de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada miembro de la genoteca comprende una secuencia de la región CDR3 idéntica.
5. El método o genoteca de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las secuencias de la región FR4 de dichos dominios son secuencias humanas.
6. El método o genoteca de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada miembro de la genoteca comprende secuencias FR1-FR3 codificadas por un único gen VH de anticuerpo humano.
7. Un método para seleccionar un par VH/VL estable que se une específicamente a un antígeno diana, el método que comprende:
 - a) proporcionar una primera genoteca, preferiblemente una genoteca de presentación de ácidos nucleicos, de dominios VH no apareados quiméricos en donde la diversidad está en las regiones FR1-FR3, en donde las secuencias de las regiones FR1-FR3 de dichos dominios son secuencias humanas, y en donde cada miembro de la primera genoteca comprende la secuencia de la región CDR3 del dominio VH de un anticuerpo de referencia, preferiblemente un anticuerpo de roedor, de lagomorfo, aviar, de camélido, de tiburón o humano, que se une específicamente al antígeno diana;
 - b) opcionalmente introducir, preferiblemente por mutagénesis aleatoria, diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en la primera genoteca de la etapa (a);
 - c) poner en contacto la primera genoteca con el antígeno diana;
 - d) seleccionar de la primera genoteca al menos un VH no apareado quimérico que se une específicamente al antígeno diana, produciendo de esta manera un dominio VH que se une específicamente al antígeno diana;
 - e) poner en contacto el dominio VH no apareado con una segunda genoteca, preferiblemente una genoteca de presentación de ácidos nucleicos, de dominios VL no apareados de modo que se forme una genoteca de pares VH/VL;
 - f) poner en contacto la genoteca de pares VH/VL con el antígeno diana; y
 - g) seleccionar de la genoteca de pares VH/VL al menos un par VH/VL que se une específicamente al antígeno diana, seleccionando de esta manera un par VH/VL estable que se une específicamente al antígeno diana.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende además la etapa de introducir, preferiblemente por mutagénesis aleatoria, diversidad adicional de secuencia de aminoácidos en la segunda genoteca de dominios VL de la etapa (e).
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde la segunda genoteca de dominios VL de la etapa (e) comprende dominios VL humanos.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además la etapa de expresar el dominio V seleccionado, par VH/VL, o un anticuerpo que comprende el dominio V o par VH/VL en una célula.
- 5 11. El método o genoteca de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la genoteca se genera usando al menos un oligonucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, y 102.
- 10 12. La genoteca de ácidos nucleicos de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la genoteca es una genoteca de presentación de ADNbc.

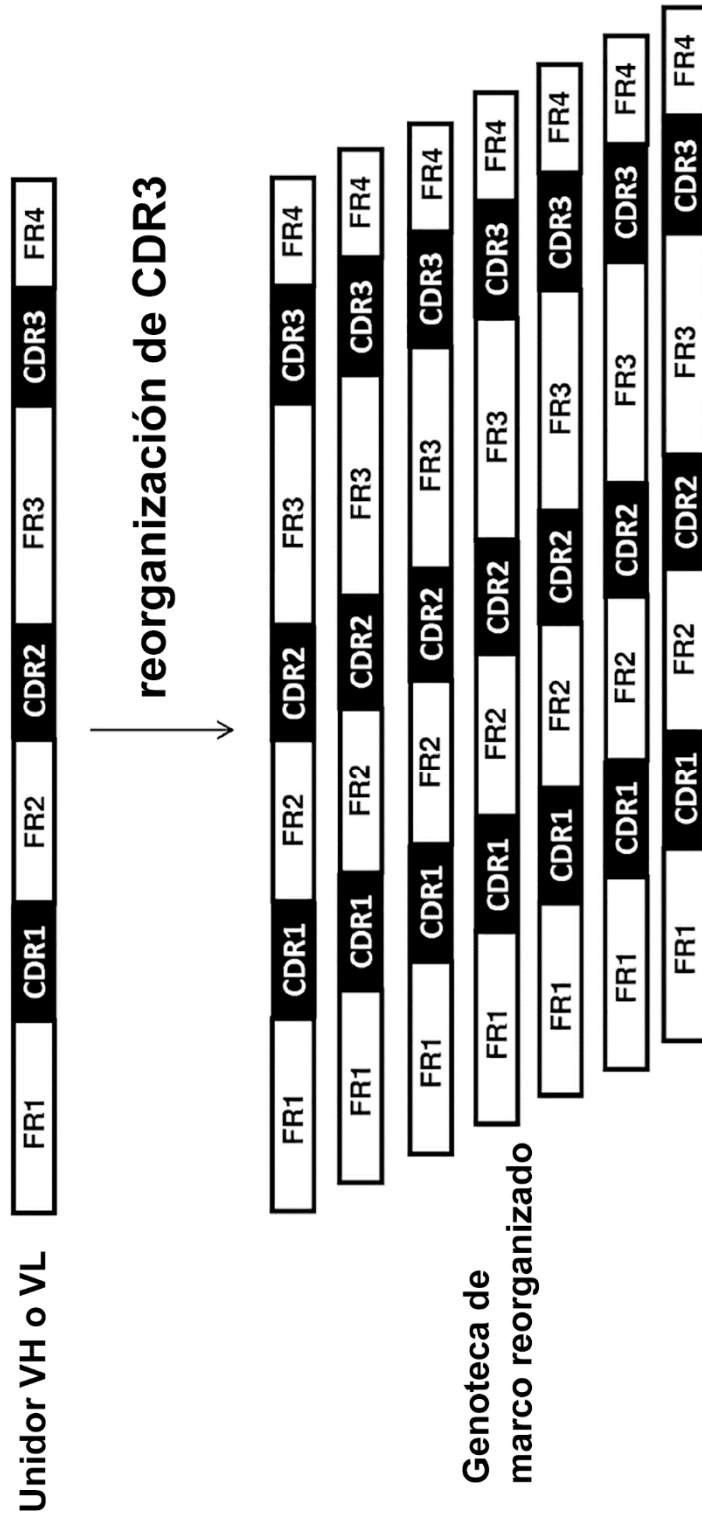


Fig. 1

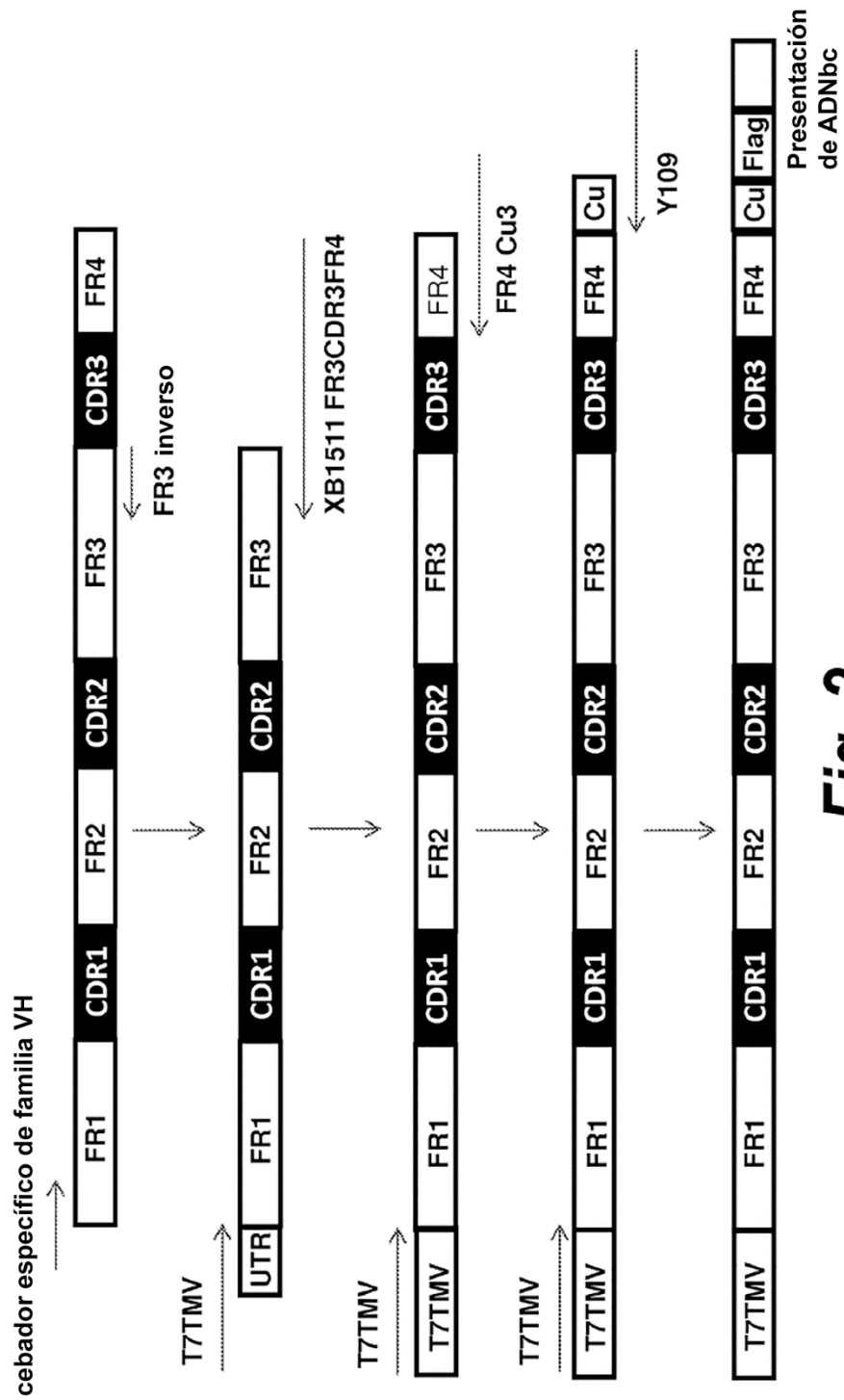


Fig. 2

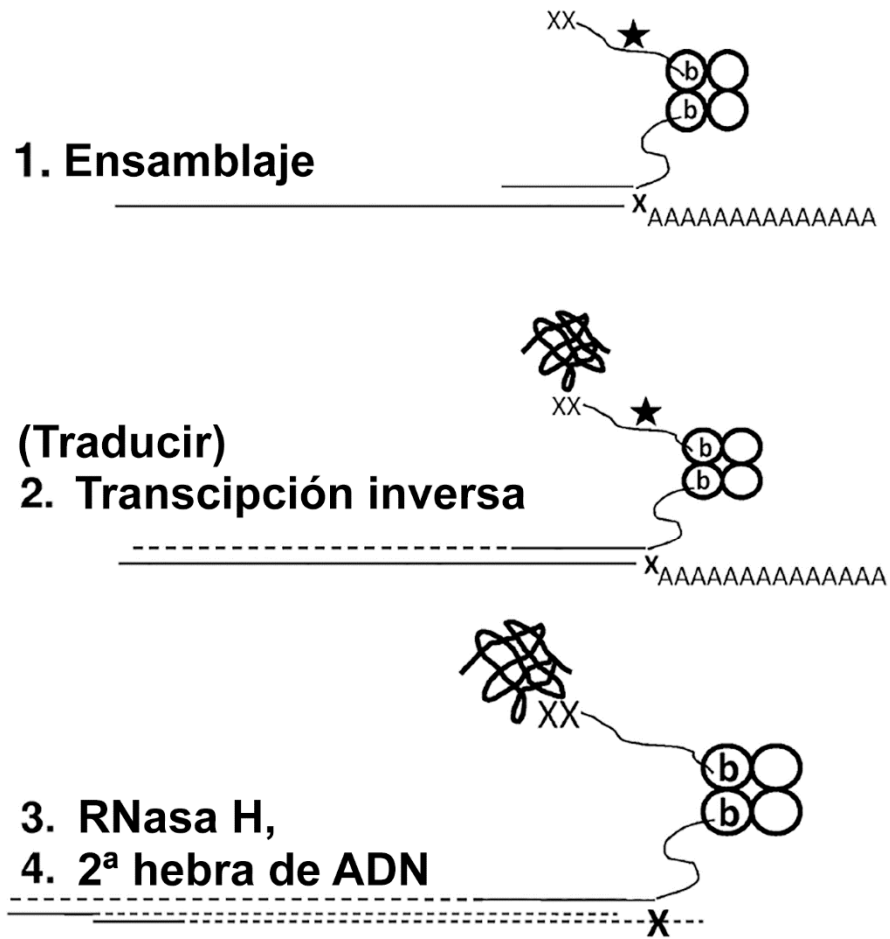


Fig. 3

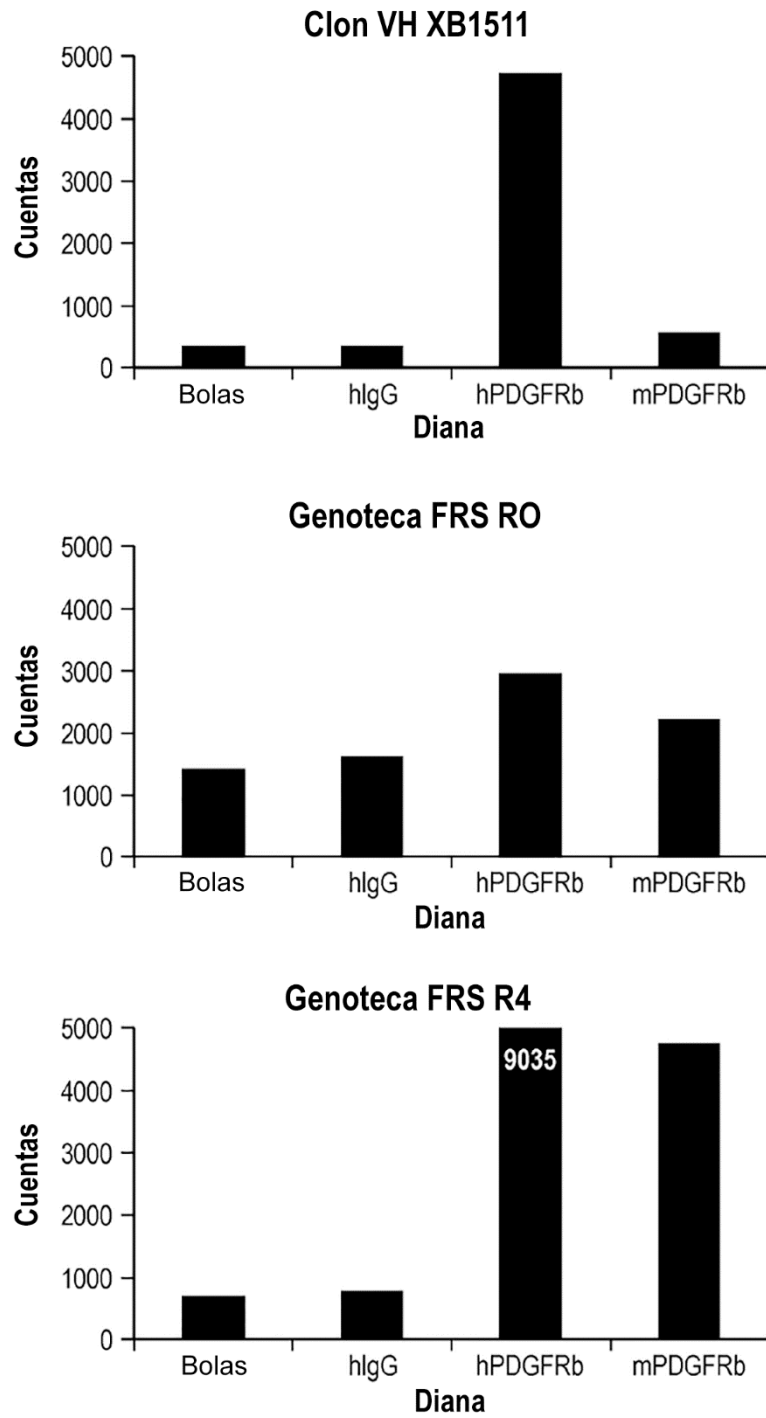


Fig. 4



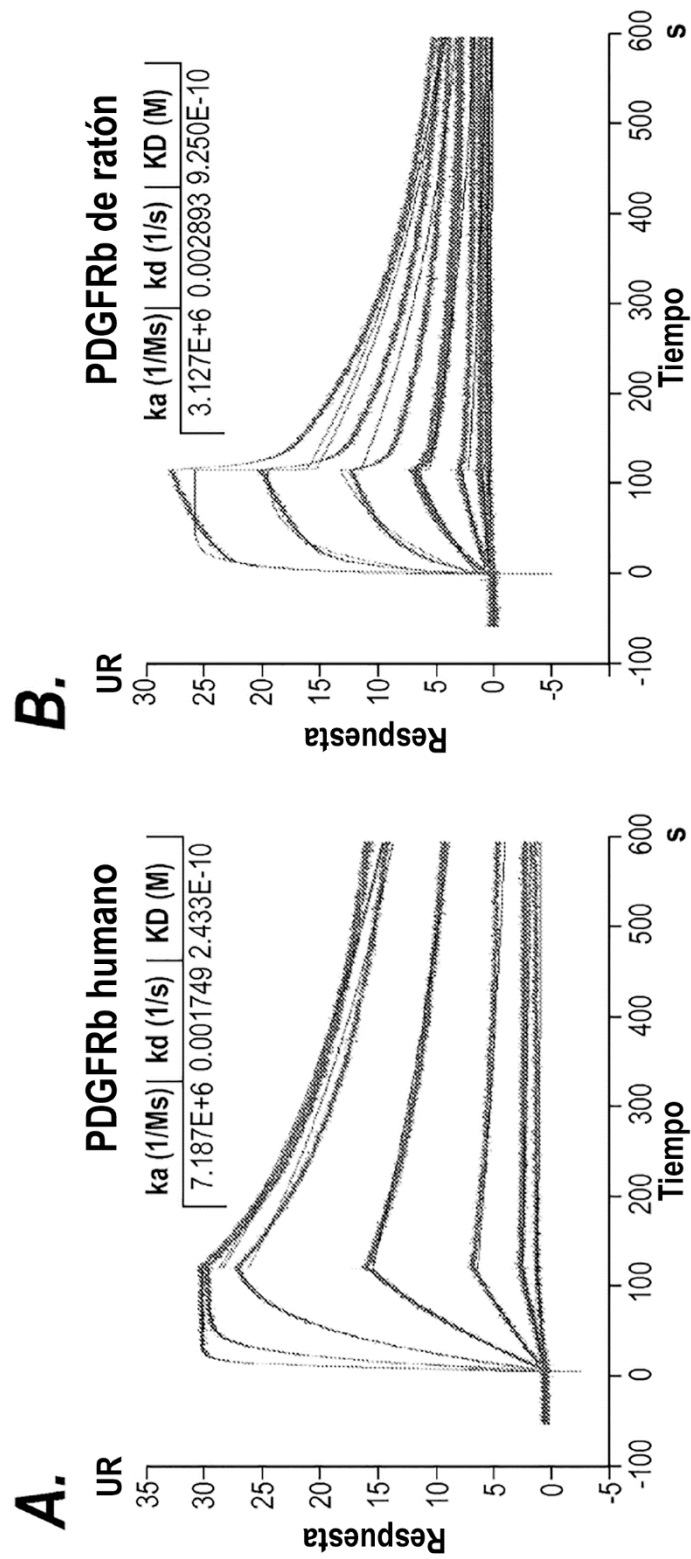


Fig. 6

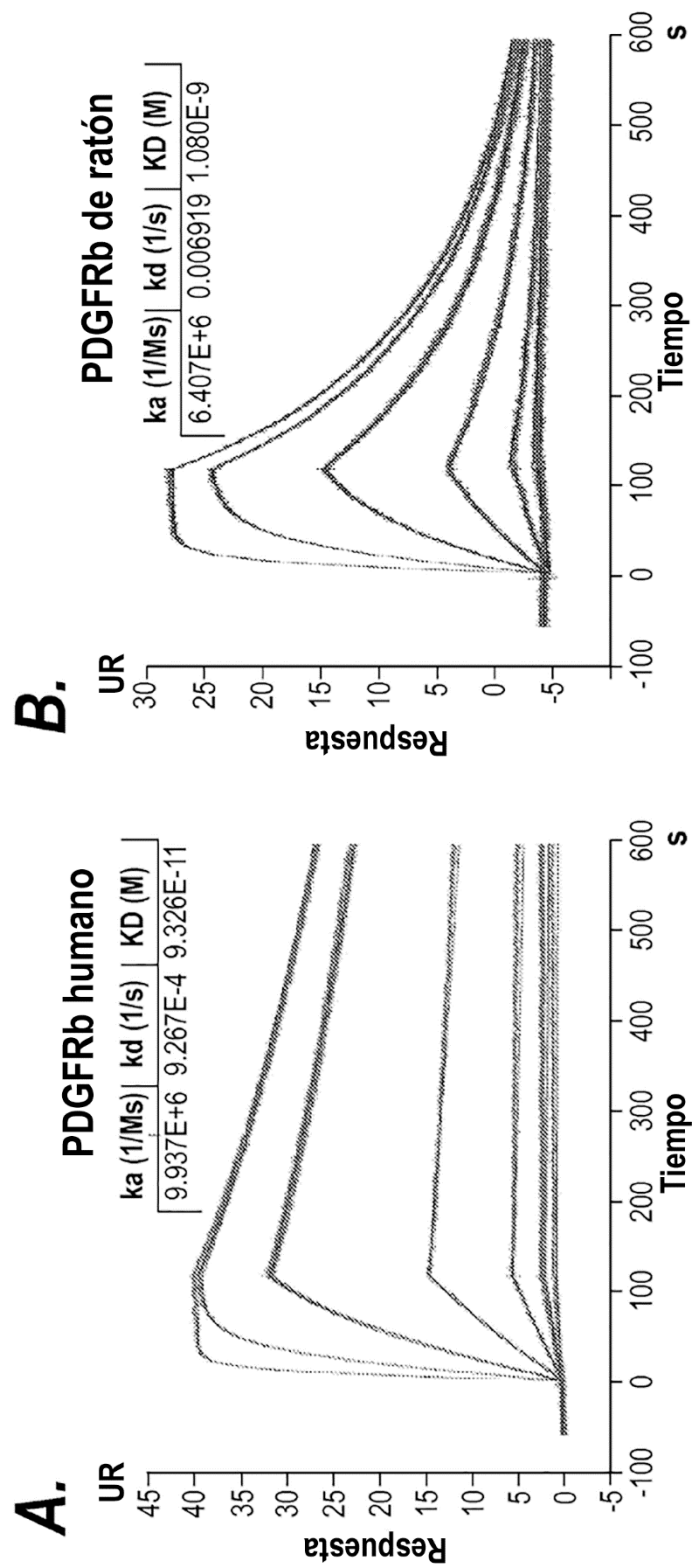


Fig. 7

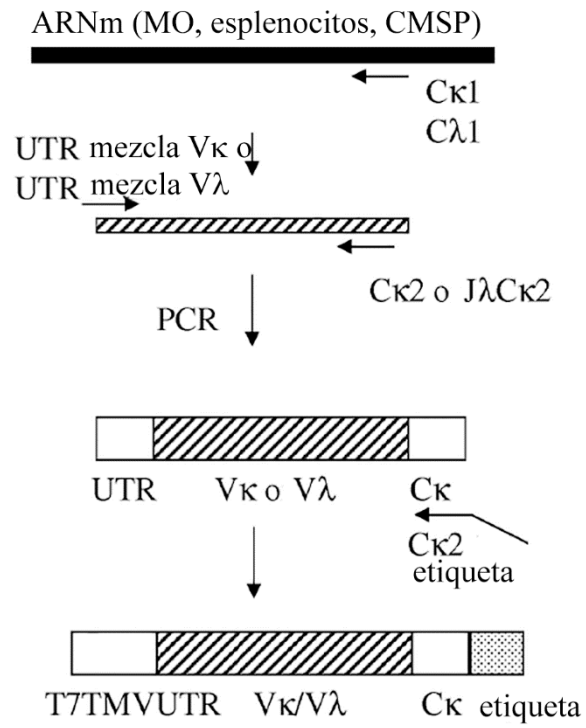


Fig. 8

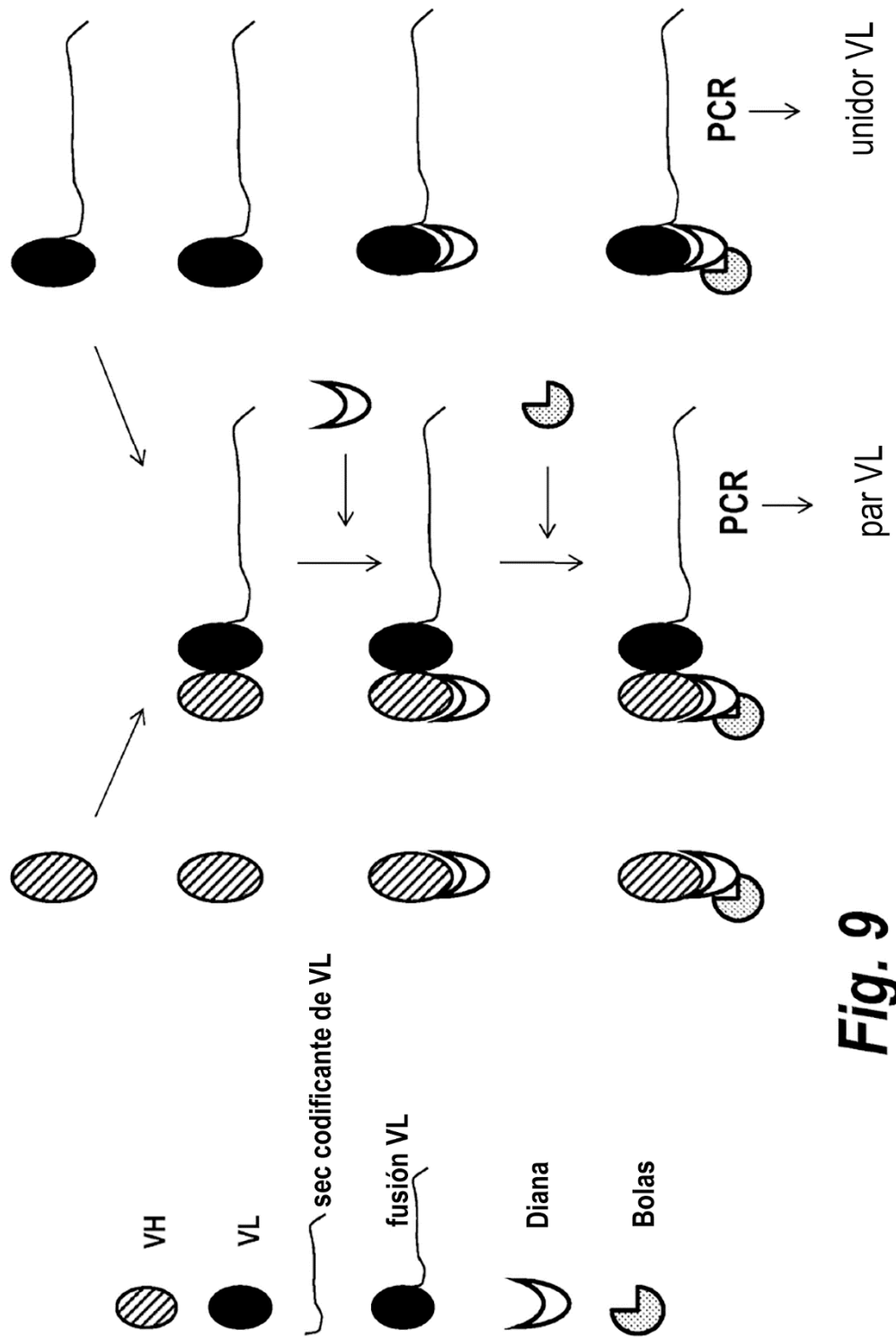


Fig. 9

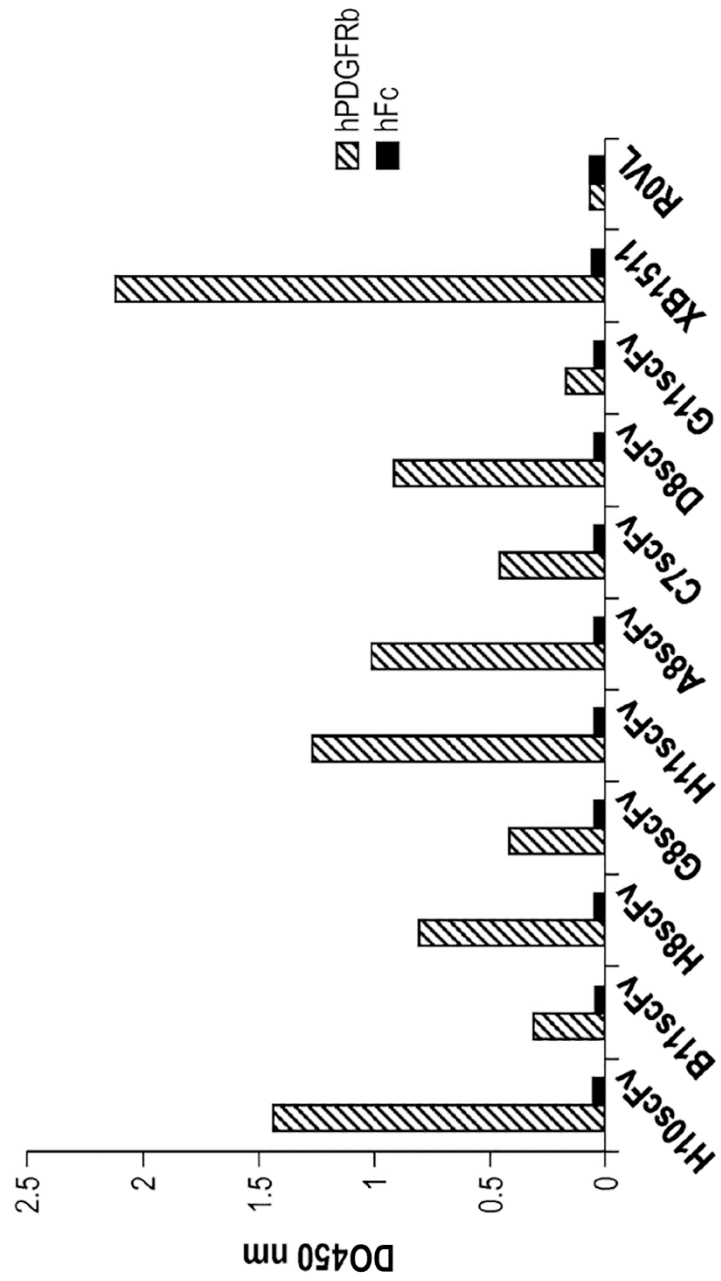
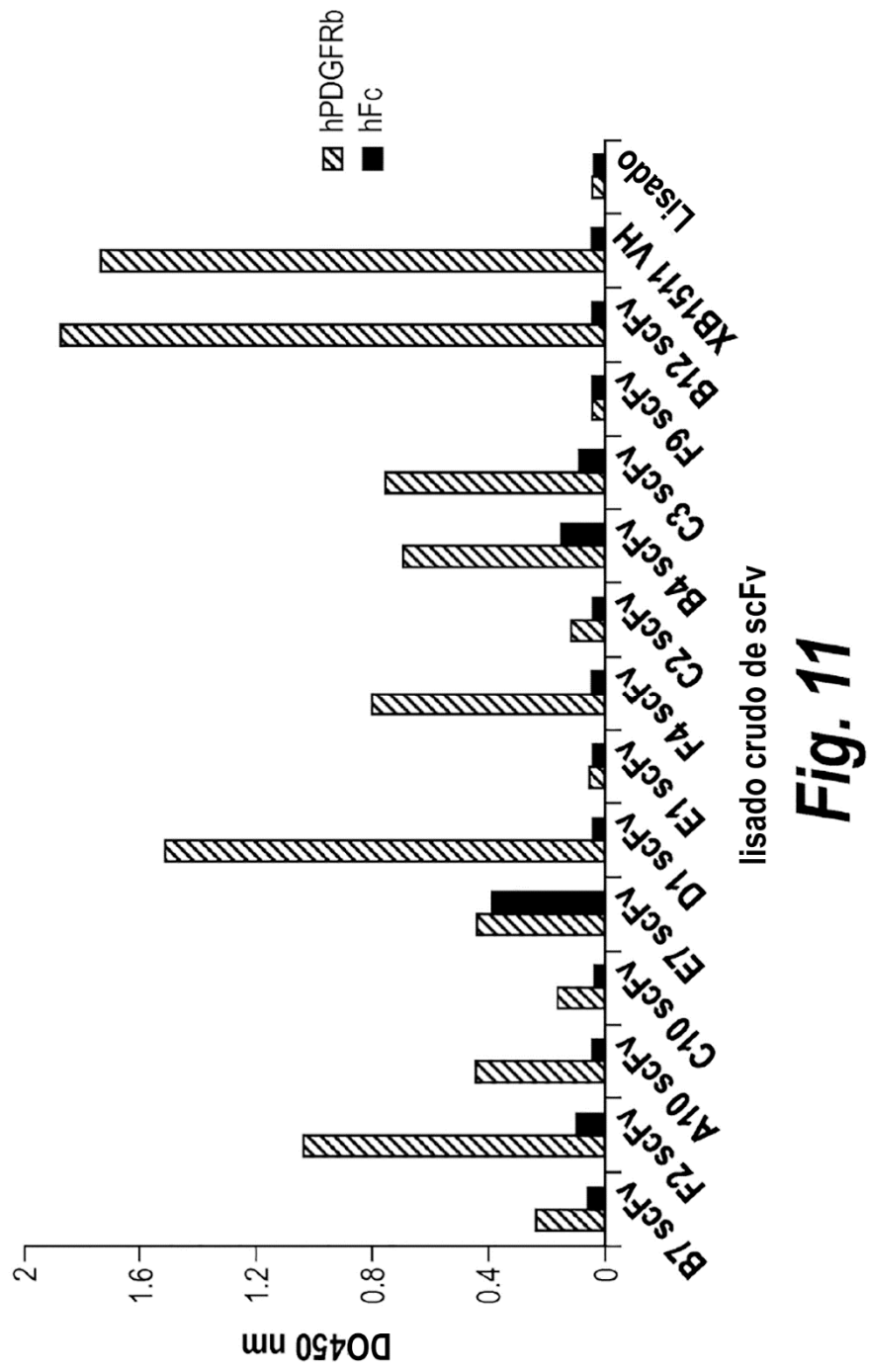
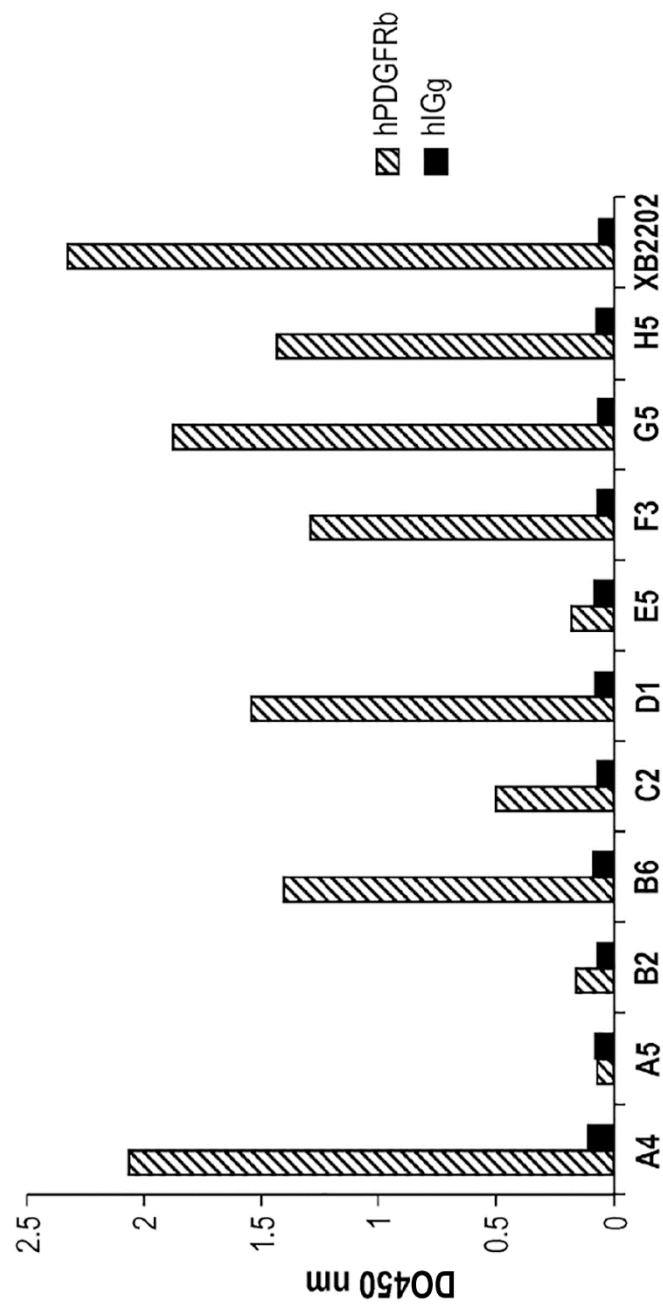


Fig. 10





ScFv, lisado crudo traducido in vitro

Fig. 12

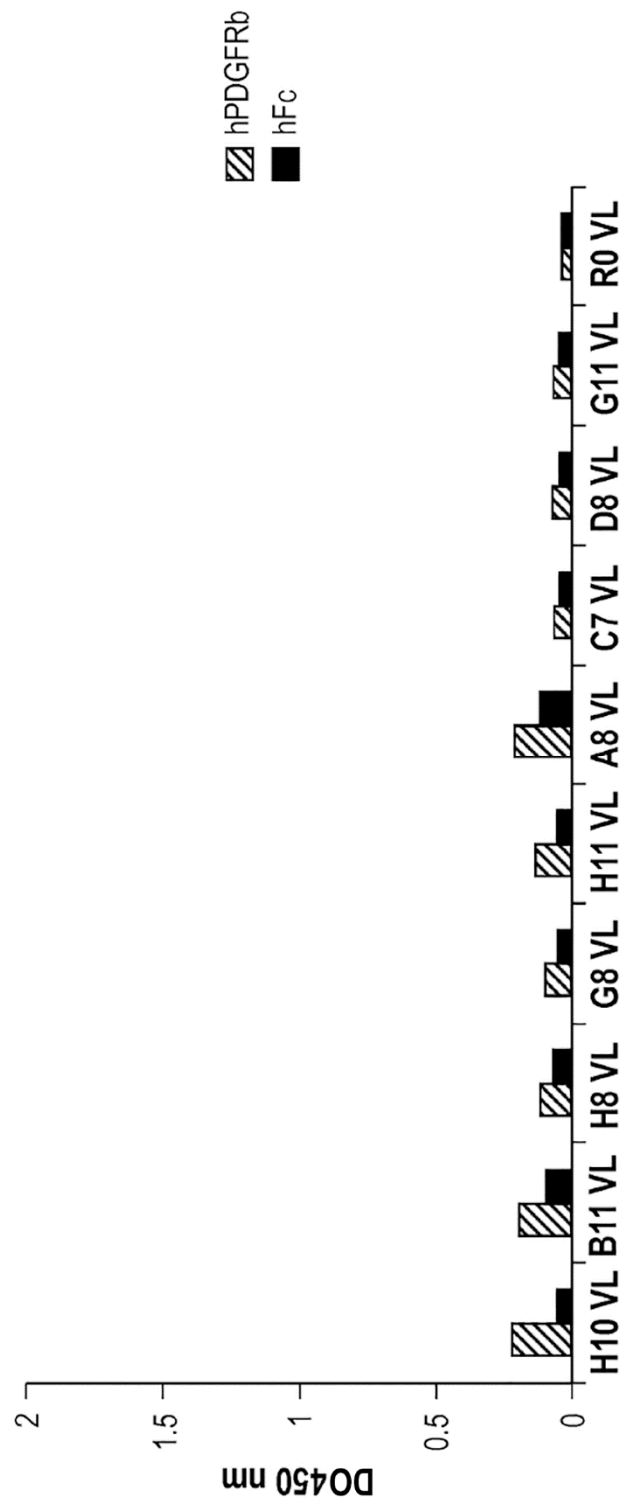


Fig. 13

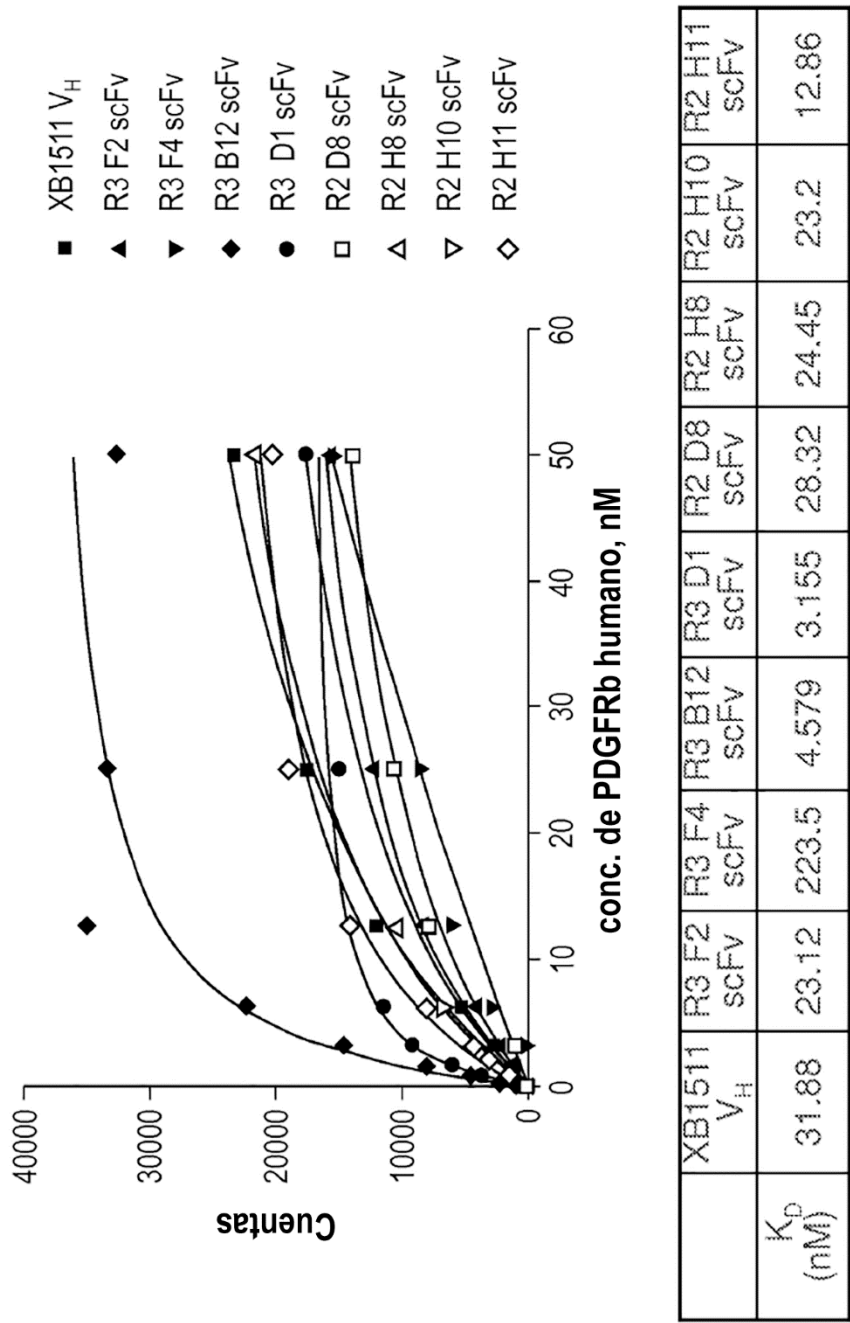


Fig. 14

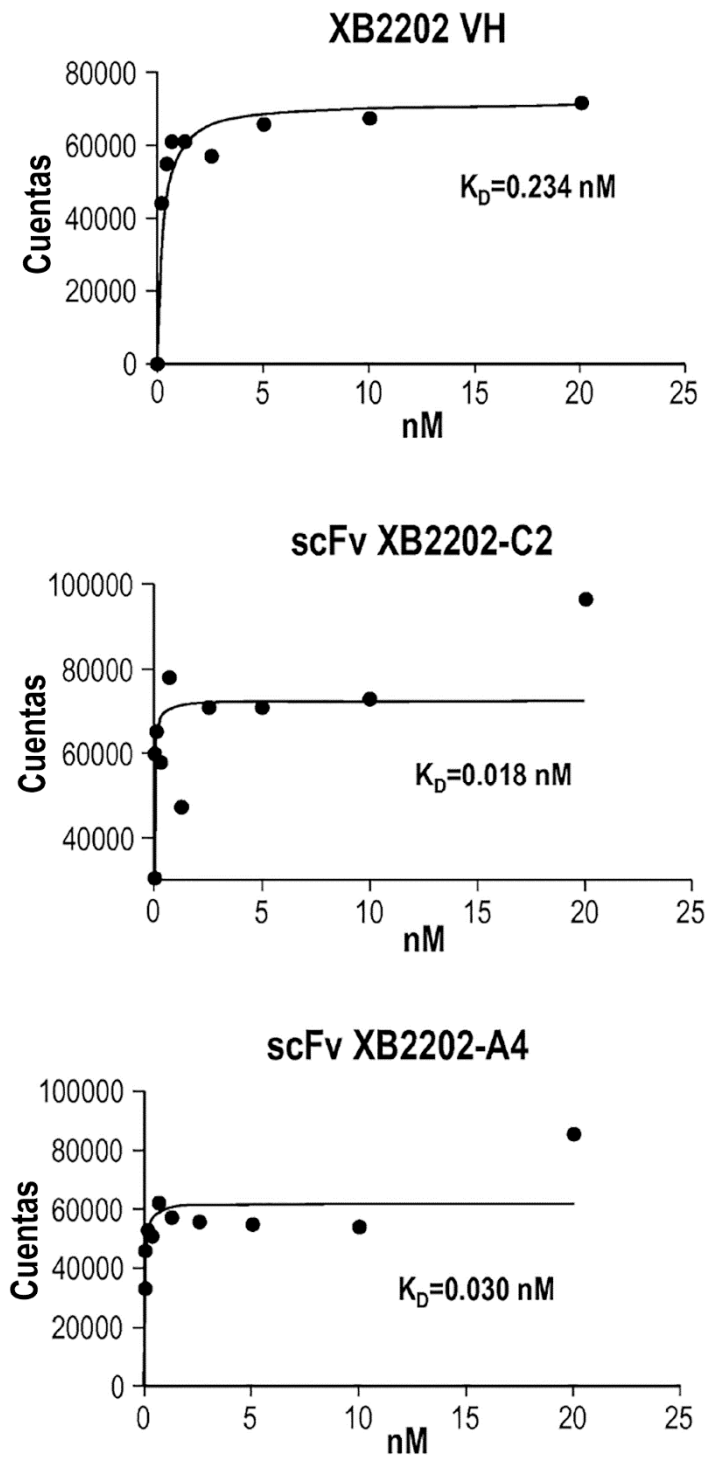


Fig. 15

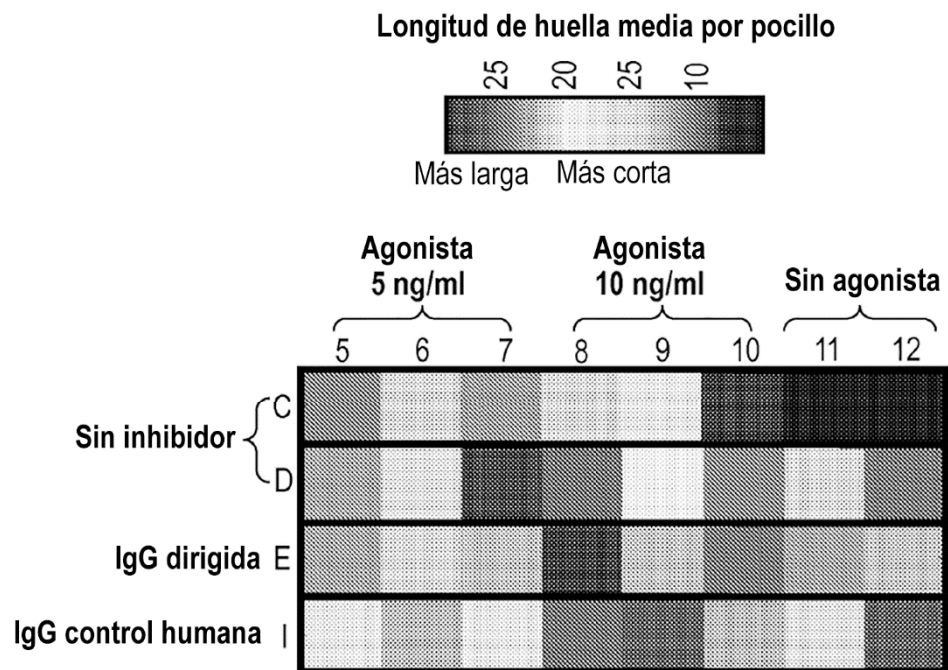


Fig. 16

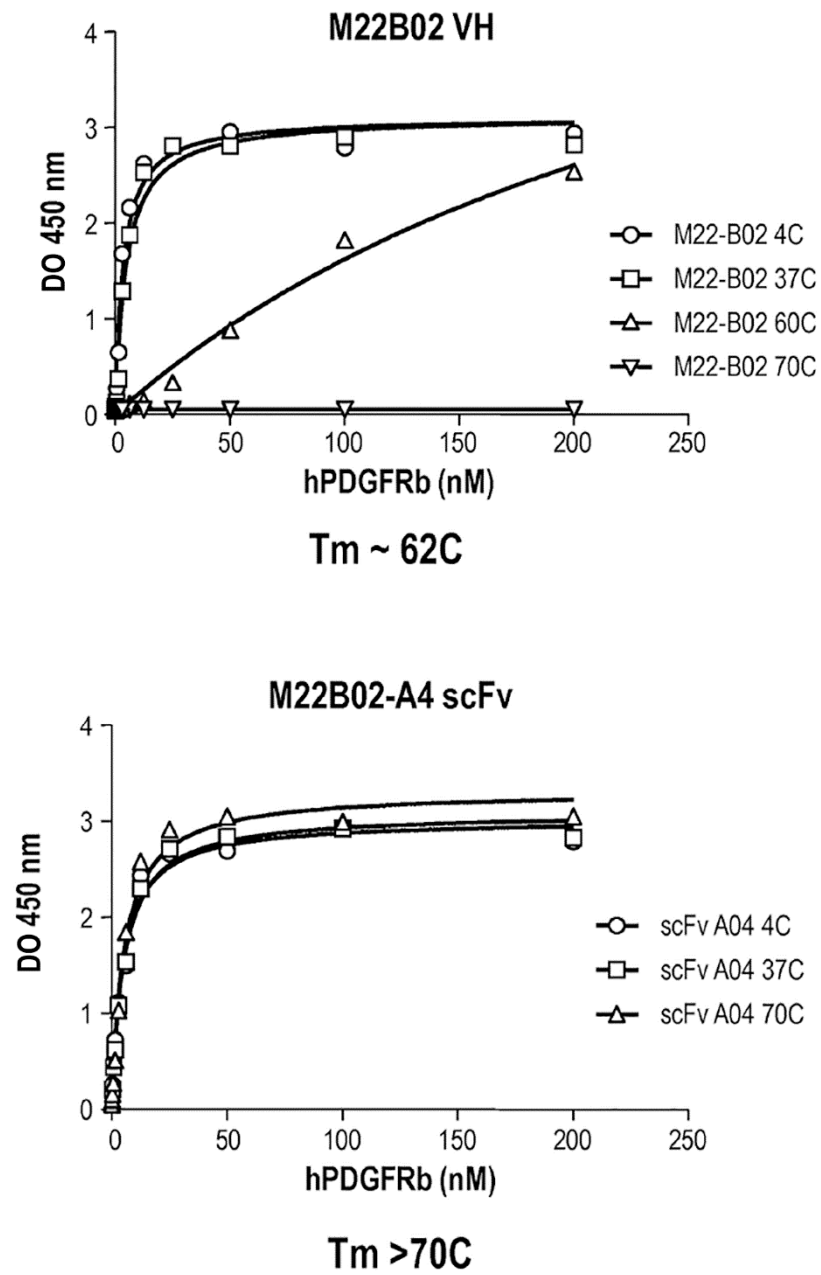


Fig. 17