



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 323 651**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06703578 .2**

(96) Fecha de presentación : **05.01.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1699826**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

(54) Título: **Dominios sintéticos de inmunoglobulina con propiedades de unión elaborados por ingeniería en regiones de la molécula diferentes de las regiones que determinan la complementariedad.**

(30) Prioridad: **05.01.2005 US 641144 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.07.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.07.2009

(73) Titular/es: **f-star Biotechnologische Forschungs-
und Entwicklungsges. mbH**
Gastgebasse 5-13
1230 Wien, AT

(72) Inventor/es: **Wozniak-Knopp, Gordana;**
Rüker, Florian y
Himmeler, Gottfried

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Dominios sintéticos de inmunoglobulina con propiedades de unión elaborados por ingeniería en regiones de la molécula diferentes de las regiones que determinan la complementariedad.

La presente invención se refiere a un método para el diseño y fabricación de una inmunoglobulina modificada.

El campo general es la ingeniería de proteínas con la finalidad de conferirles propiedades de enlace específicas. Más específicamente, las proteínas de diseño de relevancia aquí son inmunoglobulinas (anticuerpos), y aún más específicamente, dominios sencillos o pares o combinaciones de dominios sencillos de inmunoglobulinas. Las propiedades de enlace específicas de inmunoglobulinas son características importantes ya que controlan la interacción con moléculas tales como antígenos, y hacen útiles a las inmunoglobulinas para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

La estructura de anticuerpos básica se explicará aquí utilizando como ejemplo una inmunoglobulina IgG1 intacta.

Dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos ligeras idénticas (L) se combinan para formar la molécula de anticuerpo en forma de Y. Las cadenas pesadas tienen cada una cuatro dominios. Los dominios variables amino terminales (VH) están en las puntas de la Y. A estos siguen tres dominios constantes: CH1, CH2 y el CH3 carboxi terminal, en la base del tronco Y. Un tramo corto, el conmutador, conecta las regiones constantes y variables de la cadena pesada. La bisagra conecta los CH2 y CH3 (el fragmento Fc) al resto del anticuerpo (los fragmentos Fab). Un Fc y dos fragmentos Fab idénticos se pueden producir por escisión proteolítica de la bisagra en una molécula de anticuerpo intacta. Las cadenas ligeras están construidas con dos dominios, el variable (VL) y el constante (CL), separados por un conmutador.

Los enlaces disulfuro en la región bisagra conectan dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se acoplan a las cadenas pesadas por enlaces disulfuro adicionales. Las porciones de hidratos de carbono enlazadas por Asn se conectan en diferentes posiciones en dominios constantes dependiendo de la clase de inmunoglobulina. En la IgG1, dos enlaces disulfuro en la región bisagra, entre los pares Cys235 y Cys238, unen las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se acoplan a las cadenas pesadas a través de dos enlaces disulfuro adicionales, entre Cys229s en los dominios CH₁ y Cys214s en los dominios CL. Las porciones de hidratos de carbono se conectan a la Asn306 de cada CH₂, generando un bulto pronunciado en el tronco de la Y.

Estas características tienen consecuencias funcionales profundas. Las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras (VH) y (VL) se encuentran en las "puntas" de la Y, donde se ubican para reaccionar con el antígeno. Esta punta de la molécula es el lado en el que se ubica el extremo N de la secuencia de aminoácidos. El tronco de la Y se proyecta de forma que medie eficientemente en funciones efectoras tales como la activación del complemento y la interacción con receptores Fc ó ADCC y ADCP. Sus dominios CH2 y CH3 se abultan para facilitar la interacción con proteínas efectoras. El terminal C de la secuencia de aminoácidos se ubica en el lado opuesto de la punta, que puede denominarse "fondo" de la Y. La estructura de una IgG1 intacta se ilustra en la Figura 1a.

En los anticuerpos se encuentran dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda (λ) y kappa (κ). Una inmunoglobulina dada, tiene ó cadenas κ ó cadenas λ , nunca una de cada. No se ha encontrado diferencia funcional entre anticuerpos que tengan cadenas ligeras λ ó κ .

La organización estructural de los monómeros de la clase de inmunoglobulina humana principal se ilustra en la Figura 1b. Las clases difieren en la composición y la secuencia de sus cadenas pesadas respectivas. Tanto IgM como IgE carecen de una región bisagra pero cada una contiene un dominio de cadena pesada extra (CH4). Los números y las ubicaciones de los enlaces disulfuro (líneas) que enlazan las cadenas difieren entre los isotipos. También difieren en la distribución de los grupos hidrato de carbono N-enlazados, mostrados simbólicamente como círculos.

Cada dominio en una molécula de anticuerpo tiene una estructura similar de dos hojas beta empaquetadas apretadamente entre sí en un barril beta antiparalelo comprimido. Esta estructura conservada se denomina pliegue de la inmunoglobulina. El pliegue de la inmunoglobulina de dominios constantes contiene una hoja de 3-hebras empaquetadas contra una hoja de 4-hebras. El pliegue se estabiliza por puentes de hidrógeno entre las hebras beta de cada hoja, por enlace hidrofóbicos entre los residuos de hojas opuestas en el interior, y por un enlace disulfuro entre las hojas. La hoja de 3-hebras comprende las hebras C, F y G, la hoja de 4-hebras tiene las hebras A, B, E y D. Las letras A a G representan las posiciones secuenciales de las hebras beta sobre la secuencia de aminoácidos del pliegue de la inmunoglobulina.

El pliegue de los dominios variables tiene 9 hebras beta dispuestas en dos hojas de 4 y 5 hebras. La hoja de 5-hebras es estructuralmente homóloga a la hoja de 3-hebras de los dominios constantes, pero contiene las hebras extra C' y C''. El resto de las hebras (A, B, C, D, E, F, G) tienen la misma topología y una estructura similar a sus complementarias en el dominio constante de los pliegues de la inmunoglobulina. Un enlace disulfuro une las hebras B y F en hojas opuestas, como en los dominios constantes. El pliegue de la inmunoglobulina se ilustra en la Figura 2 para un dominio constante y uno variable de una inmunoglobulina.

Los dominios variables tanto de las cadenas de inmunoglobulina ligeras como de las pesadas contienen tres bucles hipervariables, o regiones para la determinación de complementariedad (CDRs). Las tres CDRs de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDRs son bucles que conectan las hebras

beta B-C, C'-C'' y F-G del pliegue de la inmunoglobulina. Los radicales de las CDRs varían de una molécula de inmunoglobulina a otra, impartiendo especificidad de antígeno a cada anticuerpo.

Los dominios VL y VH en las puntas de las moléculas de anticuerpo están estrechamente empaquetados de tal manera que las 6 CDRs (3 en cada dominio) cooperan para construir una superficie (o cavidad) para el enlace específico al antígeno. Así, el sitio de enlace del antígeno natural de un anticuerpo se compone de los bucles que conectan las hebras B-C, C'-C'' y F-G del dominio variable de la cadena ligera y las hebras B-C, C'-C'' y F-G del dominio variable de la cadena pesada.

Utilizando la estructura 3D de una proteína como ayuda para el diseño, los residuos aminoácidos ubicados en la superficie de muchas proteínas se han distribuido aleatoriamente utilizando como patrón la estructura del núcleo de la proteína. Ejemplos de esta estrategia se describen o resumen en las siguientes referencias, incorporadas aquí como referencia: Nygren PA, Uhlen M., Curr Opin Struct Biol. (1997) 7:463-9; Binz HK, Amstutz P, Kohl A, Stumpp MT, Briand C, Forrer P, Grutter MG, Pluckthun A. Nat Biotechnol. (2004) 22:575-82; Vogt M, Skerra A. Chembiochem. (2004) 5:191-9; US 6.562.617.

El principio básico de esta técnica se basa en la observación de que muchas proteínas tienen un núcleo estable, formado por configuraciones específicas de elementos de estructura secundaria, tales como hojas beta o hélices alfa, que se interconectan a través de estructuras tales como bucles, giros o vueltas o espirales al azar. Típicamente, estos tres elementos estructurales son poco cruciales para la estructura total de la proteína, y los residuos aminoácidos en estos elementos estructurales pueden intercambiarse a menudo sin destruir el pliegue general de la proteína. Un ejemplo de origen natural para este principio de diseño son las CDRs de los anticuerpos. Ejemplos artificiales incluyen lipocalinas, anquirinas y otras estructuras de proteínas.

Los bucles que no son bucles CDR en una inmunoglobulina nativa no tienen especificidad de unión a antígeno o a epítipo pero contribuyen al pliegue correcto de la molécula de inmunoglobulina y/o su efector u otras funciones y por lo tanto se denominan bucles estructurales para el propósito de esta invención.

En la patente US N° 6.294.654 se muestra que pueden elaborarse anticuerpos alterados donde un antígeno peptídico se puede incorporar en un bucle no-CDR de un anticuerpo (Ab) en la región CH1 entre la región bisagra y la región variable, y el Ab resultante puede ser recuperado en una APC de tal manera que el antígeno peptídico se presente en la superficie de la APC en el contexto de MHC II, produciendo de este modo una respuesta inmune. Estos péptidos insertados son epítopos y la estructura total de la molécula portadora no es importante. Se demostró que un péptido ras puede situarse en un bucle (no-CDR) de una inmunoglobulina y ésta aún ser secretada. Hay un "control de calidad" severo en las células que evita que la inmunoglobulina sea secretada a menos que se pliegue adecuadamente, y alterando la secuencia de aminoácidos del bucle puede provocar que la proteína pliegue en una estructura que la célula detectará como incorrecta, y por lo tanto la degradará. De esta manera, además de los ejemplos mostrados, se considera difícil modificar adicionalmente los bucles estructurales sin cambiar la naturaleza de la inmunoglobulina.

La solicitud de patente de U.S. n° 2004/0101905 describe el enlace de moléculas que comprenden un sitio de enlace diana y un péptido efector Fc. El péptido efector Fc es un péptido que interactúa con la molécula efectora. Se muestra la inserción de un péptido efector en un bucle no-CDR de un dominio CH1 de un fragmento de inmunoglobulina.

Los péptidos efectores Fc son estructuras de origen natural en bucles no-CDR de anticuerpos y por lo tanto se espera que no perturben la estructura de la inmunoglobulina si se injertan en diferentes sitios equivalentes en una inmunoglobulina.

Sin embargo, todo péptido injertado en un bucle no-CDR de acuerdo con esta descripción tiene una alta probabilidad de ser inactivo por el diferente entorno estructural que se ha seleccionado.

Se establece en los dos documentos de la técnica anterior mencionados previamente, que es difícil insertar péptidos en el bucle que debe retener su estructura y su función, siendo crítico no perturbar la estructura de pliegue de la inmunoglobulina, ya que esto es importante para su funcionamiento y secreción.

Las solicitudes de patente US n° 2004/0132101 y 2005/0244403 describen inmunoglobulinas mutantes con afinidad alterada de unión a un ligando efector, que son ligandos naturales para bucles estructurales de anticuerpos. En este documento se describe una variedad de mutaciones en diversas regiones a lo largo de toda la molécula de inmunoglobulina, que influyen la función efectora del anticuerpo completo.

La patente WO 01/83525 se refiere a proteínas que comprenden dominios Fc fundidos con péptidos biológicamente activos, en que dichos péptidos están fundidos a los dominios Fc en sus extremos N ó C.

La patente US 2002/0106370 da a conocer polipéptidos quiméricos que comprenden una porción de enlace que muestra una afinidad específica de unión a la superficie de la célula eucariótica diana y una porción efectora.

La patente WO 02/32925 da a conocer proteínas capaces de una función anticuerpo similar. Para conseguirlo, se introducen también estructuras de bucle en dichas proteínas, que corresponden en estructura y posición a bucles CDR.

La patente WO 2006/036834 da a conocer moléculas y métodos en los que los péptidos biológicamente activos se incorporan en una región del bucle de un dominio Fc. El péptido biológicamente activo con la actividad biológica deseada se selecciona en primer lugar y después se introduce en los dominios Fc, bien enlazando en péptido con la proteína o por inserción del ácido nucleico respectivo en el ácido nucleico que codifica el dominio Fc.

Otras patentes de la técnica anterior muestran que el patrón tipo inmunoglobulina se ha empleado hasta ahora con el propósito de manipular el sitio de unión al antígeno existente, introduciendo de este modo nuevas propiedades de unión. Sin embargo, hasta la fecha sólo las regiones CDR han sido sometidas a ingeniería para el enlace al antígeno, en otras palabras, en el caso del pliegue de la inmunoglobulina sólo se ha modificado el sitio de unión del antígeno natural para cambiar su afinidad o especificidad de unión. Existe una gran cantidad de bibliografía que describe diferentes formatos de estas inmunoglobulinas manipuladas, expresadas frecuentemente en forma de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) ó fragmentos Fab, ya sean presentados en la superficie de partículas fago o expresados en forma soluble en diversos sistemas de expresión procarióticos o eucarióticos. Entre los autores principales en este campo están Greg Winter, Andreas Plückthun y Hennie Hoogenboom.

Un objeto de la presente invención es el de proporcionar inmunoglobulinas con nuevos sitios de unión al antígeno introducidos y métodos para diseñar por ingeniería y fabricar dichas inmunoglobulinas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para la obtención por ingeniería de una inmunoglobulina la cual comprende una región bucle estructural modificada para proporcionar un sitio de unión no CDR y la determinación de la unión de dicha inmunoglobulina a un epítipo de un antígeno, en donde la región bucle estructural no modificada no se une significativamente a dicho epítipo, el cual comprende los pasos de:

- provisión de un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende por lo menos una región bucle estructural,

- modificación de por lo menos un residuo de nucleótido de dicha región bucle estructural mediante mutagénesis, en donde dicha modificación, o bien

- a) se selecciona mediante un método de mutagénesis del grupo formado al azar, semi-azar, randomización dirigida al sitio, mutagénesis por scanning y métodos combinatorios, o

- b) hay más de un bucle estructural para proporcionar un sitio de unión a dicho epítipo, o

- c) excluye la incorporación de un péptido biológicamente activo de 2 a 40 aminoácidos en un dominio Fc.

- transferencia de dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión

- expresión de dicha inmunoglobulina modificada,

- puesta en contacto de la inmunoglobulina modificada expresada con un epítipo, y

- determinación de si dicha inmunoglobulina modificada se une a dicho epítipo.

En particular, la presente invención se refiere a un método para la obtención por ingeniería de una inmunoglobulina que se une específicamente con un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales. A través de la modificación en la región del bucle estructural, la inmunoglobulina puede ser diseñada por ingeniería para unirse al epítipo. En una versión preferida, la inmunoglobulina se une específicamente a por lo menos dos de dichos epítipos, que difieren entre sí, ya sean del mismo antígeno o de diferentes antígenos.

Por ejemplo, el método de acuerdo con la invención se refiere al diseño de una unión específica de inmunoglobulina con por lo menos un primer epítipo y que comprende por lo menos una modificación en por lo menos una región del bucle estructural de dicha inmunoglobulina y la determinación del enlace específico de por lo menos dicha región del bucle hasta por lo menos un segundo epítipo, seleccionándose éste del grupo de antígenos mencionados anteriormente, donde la región no modificada del bucle estructural (región no-CDR) no se une específicamente por lo menos a dicho segundo epítipo, comprendiendo los pasos de:

- provisión de un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente con por lo menos un primer epítipo que comprende por lo menos una región del bucle estructural,

- modificación por lo menos de un residuo nucleótido de por lo menos una de dichas regiones del bucle codificadas por dicho ácido nucleico,

- transferencia de dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,

- expresión de dicha inmunoglobulina modificada,

- puesta en contacto de la inmunoglobulina modificada expresada con por lo menos dicho segundo epítipo, y
- determinación de si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente al segundo epítipo.

5

El método, de acuerdo con la invención, se refiere de preferencia a por lo menos una modificación en por lo menos una región del bucle estructural de la inmunoglobulina y a la determinación de por lo menos dicha región del bucle con por lo menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumor, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios, en donde la inmunoglobulina que contiene una región del bucle estructural no modificada no se une específicamente a por lo menos dicho antígeno.

El término “inmunoglobulinas” que se modifican de acuerdo con la presente invención (como se emplea aquí, los términos inmunoglobulina y anticuerpo son intercambiables) pueden mostrar propiedades de unión mono- o multi-específicas o multivalentes, por lo menos dos, de preferencia por lo menos tres sitios de unión específicos para epítopos de, por ejemplo, antígenos, moléculas/proteínas efectoras. Las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención también son fragmentos funcionales aceptados en la técnica, tales como Fc, Fab, scfv, dímeros de cadena sencilla de los dominios CH/CL, Fv, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas, dominios de las cadenas pesadas y ligeras de la región variable (tales como Fd, VL, VK, VH) y la región constante de un anticuerpo intacto tal como CH1, CH2, CH3, CH4, C-landa y C-kappa, así como mini-dominios consistentes en dos hebras beta de un dominio de inmunoglobulina conectado por un bucle estructural.

Se entiende que el término “inmunoglobulina”, “inmunoglobulina modificada” ó “inmunoglobulina de acuerdo con la invención”, incluye también un derivado de inmunoglobulinas. Un derivado es cualquier combinación de una o varias inmunoglobulinas de la invención y/o una proteína de fusión en la que cualquier dominio o mini-dominio de la inmunoglobulina de la invención se puede fundir en cualquier posición de una o varias proteínas (tales como otras inmunoglobulinas, ligandos, proteínas patrón, toxinas enzimáticas y similares). Un derivado de la inmunoglobulina de la invención también se puede obtener mediante el enlace con otras sustancias mediante diversas técnicas químicas, tales como el enlace covalente, una interacción electrostática, enlaces disulfuro, etc.

30

Las otras sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de ellas (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también es una inmunoglobulina con la misma secuencia de aminoácidos, pero construida completa o parcialmente a partir de aminoácidos no naturales o químicamente modificados.

35

Las moléculas diseñadas de acuerdo con la presente invención serán útiles como proteínas autónomas, así como proteínas de fusión o derivados, más típicamente fusionadas de manera tal que sean parte de estructuras de anticuerpo mayores o anticuerpo completo mo-action, enlaces disulfuro, etc..

Las otras sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de ellas (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también es una inmunoglobulina con la misma secuencia de aminoácidos, pero construida completa o parcialmente a partir de aminoácidos no naturales o químicamente modificados.

Las moléculas diseñadas de acuerdo con la presente invención serán útiles como proteínas autónomas, así como proteínas de fusión o derivados, más típicamente fusionadas de manera tal que sean parte de estructuras de anticuerpo mayores o moléculas de anticuerpo completas o partes de ellas, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc, fragmentos Fv y otros. Será posible utilizar las proteínas diseñadas para producir moléculas que son monoespecíficas, biespecíficas, triespecíficas e incluso pueden soportar más especificidades al mismo tiempo, y también será posible controlar y preseleccionar la valencia de enlace al mismo tiempo de acuerdo con los requerimientos del uso planeado de dichas moléculas.

De acuerdo con la presente invención, las regiones de unión a antígenos o sitios de unión de antígenos, de todo tipo de alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos víricos, pueden introducirse en un bucle estructural de una estructura de anticuerpo dada.

El término “antígeno” de acuerdo con la presente invención representa moléculas o estructuras que se sabe que interactúan o son capaces de interactuar con la región del bucle CDR de las inmunoglobulinas. Las regiones del bucle estructural de la técnica anterior no interactúan con antígenos sino que más bien contribuyen a la estructura total y/o al enlace a moléculas efectoras.

El término “alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos víricos” de acuerdo con la presente invención debe incluir todos los alérgenos y antígenos capaces de ser reconocidos por una estructura de anticuerpo y fragmentos de dichas moléculas (en especial subestructuras a las que se refiere generalmente como “epítopos” (por ejemplo, epítopos de células B)), siempre que sean inmunológicamente relevantes, es decir, que también sean reconocibles por anticuerpos naturales o monoclonales.

El término “epítopo” de acuerdo con la presente invención representa una estructura molecular que puede constituir completamente un socio de unión específica o ser parte de un socio de unión específica al dominio de enlace o la inmunoglobulina de la presente invención.

5 Químicamente, un epítopo puede estar compuesto por un hidrato de carbono, un péptido, un ácido graso, una sustancia inorgánica o sus derivados y cualquier combinación de las mismas. Si el epítopo es un polipéptido, usualmente incluirá por lo menos 3 aminoácidos, de preferencia 8 a 50 aminoácidos, y con más preferencia, entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos en el péptido. No hay límite superior crítico para la longitud del péptido, que puede comprender casi toda la longitud de la secuencia del polipéptido. Los epítopos pueden ser lineales o epítopos conformacionales. Un epítopo lineal comprende un solo segmento de una secuencia primaria de una cadena de polipéptido. Los epítopos lineales pueden ser contiguos o superpuestos. Los epítopos conformacionales comprenden aminoácidos reunidos por plegado del polipéptido, para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal.

15 Específicamente, los epítopos son por lo menos parte de moléculas relevantes para el diagnóstico, es decir, la ausencia o presencia de un epítopo en una muestra se correlaciona cualitativa o cuantitativamente ya sea con una enfermedad o con un estado de salud o con el estado de un proceso de fabricación o un estado ambiental y alimentario. Los epítopos también pueden ser por lo menos parte de moléculas terapéuticamente relevantes, es decir, moléculas que pueden ser diana del dominio de unión específica que cambia el curso de la enfermedad.

20 Los “alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos víricos” preferidos, son aquellos alérgenos o antígenos que ya han demostrado su capacidad de ser inmunológica o terapéuticamente relevantes o que lo son, en especial aquéllos en los que se ha probado su eficacia clínica.

25 Por otra parte, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, también pueden introducirse otras capacidades de enlace en las regiones del bucle estructural, por ejemplo capacidades de enlace para moléculas pequeñas, tales como fármacos o enzimas, sitios catalíticos de enzimas o sustratos enzimáticos o para un análogo del estado de transición de un sustrato enzimático.

30 De preferencia, el nuevo sitio de unión del antígeno en los bucles estructurales es ajeno a la inmunoglobulina no modificada. De esta manera, las dianas como moléculas efectoras o receptoras Fc se excluyen de preferencia de las moléculas de enlace y la especificidad de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención.

35 De preferencia, los nuevos sitios de enlace del antígeno en los bucles estructurales se introducen por sustitución, delección y/o inserción de la inmunoglobulina codificada por el ácido nucleico seleccionado.

40 De acuerdo con otra versión preferida de la presente invención, la modificación de por lo menos un nucleótido da como resultado una substitución, delección y/o inserción de la inmunoglobulina codificada por dicho ácido nucleico.

45 La modificación de por lo menos una región del bucle puede dar como resultado una substitución, delección y/o inserción de 1 ó varios aminoácidos, de preferencia una mutación puntual, intercambio de bucles enteros, con más preferencia el cambio de por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 30 aminoácidos.

También es preferible la mutación aleatoria dirigida al sitio. Con este método uno o varios residuos aminoácidos específicos del bucle se intercambian o introducen utilizando insertos generados aleatoriamente en dichos bucles estructurales. De forma alternativa, es preferible el uso de métodos combinatorios.

50 De preferencia por lo menos una región del bucle se muta o modifica de forma aleatoria, semi-aleatoria, o en particular por métodos de mutagénesis aleatoria dirigida al sitio. Estos métodos pueden emplearse para hacer modificaciones de aminoácidos en posiciones deseadas de la inmunoglobulina de la presente invención. En estos casos las posiciones se eligen al azar, o los cambios de aminoácidos se realizan utilizando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los residuos pueden mutarse en alanina, en referencia al cribado de alanina. Estos métodos pueden acoplarse con métodos de ingeniería más sofisticados que emplean métodos de selección para cribar niveles superiores de diversidad de secuencia. Un método preferido de acuerdo con la invención se refiere a la molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente que comprende por lo menos una unidad de repetición de nucleótido que tiene la secuencia 5'-NNS-3', 5'-NNN-3' ó 5'-NNK-3'.

60 La molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente puede comprender las unidades repetitivas identificadas anteriormente, que codifican todos los aminoácidos de origen natural conocidos.

65 Como es bien conocido en la especialidad, hay una variedad de técnicas de selección que pueden emplearse para la identificación y el aislamiento de proteínas con ciertas características y afinidades de enlace, incluyendo por ejemplo tecnologías de expresión tales como presentación en fago, presentación en ribosoma, presentación en superficies celulares y similares, como se describe a continuación. Los métodos para producción y cribado de variantes de anticuerpos son ya bien conocidos en la técnica. Los métodos generales para biología molecular de anticuerpos, expresión, purificación y cribado se describen en Antibody Engineering, editado por Duebel & Kontermann, Springer-

Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76.

Un “bucle estructural” o “bucle no-CDR” de acuerdo con la presente invención debe entenderse de la forma siguiente: las inmunoglobulinas están formadas de dominios con el llamado pliegue de la inmunoglobulina. En esencia, las hojas beta antiparalelas se conectan mediante bucles formando un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, varios de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión al antígeno. Estos bucles se denominan bucles CDR. Todos los otros bucles de dominios de anticuerpo contribuyen más bien a la estructura de la molécula y/o a la función efectora. Estos bucles se definen aquí como bucles estructurales o bucles no-CDR.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las inmunoglobulinas modificadas (e incluidas siempre a través de toda la especificación siguiente: fragmentos de inmunoglobulina) pueden clonarse en células anfitrionas, expresadas y ensayadas para sus especificidades de unión. Estas prácticas se llevan a cabo utilizando procedimientos bien conocidos y una variedad de métodos que pueden usarse en la presente invención se describen en *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, 3.^{sup}.rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Los ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar dichas inmunoglobulinas. Los vectores de expresión comprenden típicamente una inmunoglobulina enlazada operativamente que se coloca en una relación funcional, con control de secuencias reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier socio de fusión y/o elementos adicionales. Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se pueden producir por cultivo de una célula anfitriona transformada con ácido nucleico, de preferencia un vector de expresión que contiene ácido nucleico que codifica las inmunoglobulinas modificadas, bajo las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de las inmunoglobulinas modificadas. Los métodos de introducción de moléculas de ácido nucleico exógenas en un anfitrión son bien conocidas por la técnica y variarán según el anfitrión empleado. Por supuesto, también se pueden emplear sistemas de expresión libre celular o acelular para la expresión de inmunoglobulinas modificadas.

En una versión preferida de la presente invención, las inmunoglobulinas modificadas se purifican o aíslan después de la expresión. Las inmunoglobulinas modificadas pueden aislarse o purificarse en una variedad de formas ya conocidas por los especialistas en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis, filtración, concentración y cromatofocalización. La purificación se puede facilitar a menudo mediante un socio de fusión particular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser purificados utilizando resina de glutatión si se emplea una fusión GST, usando cromatografía de afinidad Ni^{+2} si se emplea un His-tag o usando un anticuerpo anti-flag inmovilizado y se utiliza un flag tag. Como guía general sobre técnicas de purificación apropiadas, véase *Antibody Purification: Principles and Practice* (“Purificación de los anticuerpos: Principios y Práctica”), 3.^{sup}.rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. Por supuesto, también es posible expresar las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención en la superficie de un anfitrión, en particular en la superficie de una célula bacteriana, de insecto o de levadura o en la superficie de fagos o virus.

Las inmunoglobulinas modificadas se pueden cribar utilizando una variedad de métodos, incluyendo pero sin limitarse a ellos, los que utilizan ensayos *in vitro*, ensayos *in vivo* y basados en células, y técnicas de selección. Las técnicas de automatización y cribado de alto rendimiento pueden utilizarse en los procedimientos de cribado. El cribado puede emplear un socio o marcador de fusión, por ejemplo una enzima, un marcador inmunológico, un marcador isotópico o un marcador de molécula pequeña como un colorante fluorescente o colorimétrico o una molécula luminogénica.

En una versión preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las inmunoglobulinas se criban en un ensayo *in vitro*. En una versión preferida, se criba la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo su capacidad de catalizar una reacción o su afinidad de enlace a su diana.

Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección, incluyendo pero sin limitarse a marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicos.

Como ya es conocido en la técnica, un subconjunto de métodos de cribado son aquellos métodos que seleccionan miembros favorables de una biblioteca. Los métodos se refieren aquí como “métodos de selección”, y estos métodos se usan en la presente invención para el cribado de inmunoglobulinas modificadas. Cuando se criban las bibliotecas de inmunoglobulinas utilizando un método de selección, sólo aquellos miembros de una biblioteca que son favorables, es decir, que satisfacen algún criterio de selección, se propagan, aíslan y/u observan. Como se apreciará, debido a que se observan sólo las variantes más aptas, estos métodos permiten la criba de bibliotecas más grandes que las que se pueden cribar por métodos que analizan individualmente la aptitud de los miembros de bibliotecas. La selección es posible por cualquier método, técnica o socio de fusión que une de forma covalente o no covalente el fenotipo de inmunoglobulinas con su genotipo, que es la función de un anticuerpo con el ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, el uso de presentación en fagos como método de selección es permitido por la fusión de miembros de la biblioteca a la proteína gen III. De esta forma, la selección o el aislamiento de inmunoglobulinas modificadas que satisfacen algunos criterios, por ejemplo la afinidad del unión a la diana de la inmunoglobulina, también selecciona o aísla el ácido nucleico que la codifica. Una vez aislado, el gen o los genes que codifican las inmunoglobulinas modificadas pueden ser amplificadas. Este proceso de aislamiento y amplificación, referido como selección por ciclos de adsorción-desorción puede repetirse, permitiendo que se enriquezcan las variantes de anticuerpo favorables en la biblioteca. La secuenciación del ácido nucleico del ácido nucleico unido permite finalmente la identificación del gen.

Una variedad de métodos de selección se conocen en la técnica que pueden emplearse en la presente invención para el cribado de bibliotecas de inmunoglobulina. Estos incluyen, sin estar limitados a ellos, la presentación de fagos (Phage display of peptides and antibodies: a laboratory manual, Kay *et al.*, 1996, Academic Press, San Diego, Calif., 1996; Lowman *et al.*, 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317) y sus derivados tales como la infección selectiva por fagos (Malmberg *et al.*, 1997, J Mol Biol 273:544-551), fagos infectivos selectivos (Krebber *et al.*, 1997, J Mol Biol 268:619-630) y selección por ciclos de adsorción-desorción de infectividad retardada (Benhar *et al.*, 2000, J Mol Biol 301:893-904), expresión en superficie celular (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399) tales como presentación en bacterias (Georgiou *et al.*, 1997, Nat Biotechnol 15:29-34; Georgiou *et al.*, 1993, Trends Biotechnol 11:6-10; Lee *et al.*, 2000, Nat Biotechnol 18:645-648; Jun *et al.*, 1998, Nat Biotechnol 16:576-80), levadura (Boder & Wittrup, 2000, Methods Enzymol 328:430-44; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557) y células de mamíferos (Whitehorn *et al.*, 1995, Bio/technology 13:1215-1219), así como tecnologías de presentación *in vitro* (Amstutz *et al.*, 2001, Curr Opin Biotechnol 12:400-405) tales como expresión de polisoma (Mattheakis *et al.*, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:9022-9026) expresión de ribosoma (Hanes *et al.*, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942), expresión de ARNm (mRNA) (Roberts & Szostak, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:12297-12302; Nemoto *et al.*, 1997, FEBS Lett: 414:405-408) y el sistema de expresión por inactivación de ribosoma (Zhou *et al.*, 2002, J Am Chem Soc 124, 538-543).

Otros métodos de selección que se pueden usar en la presente invención incluyen métodos que no se basan en expresión, como métodos *in vivo*, incluyendo pero sin limitarse a ellos, la criba citométrica y la expresión periplásmica (Chen *et al.*, 2001, Nat Biotechnol. 19:537-542), el ensayo de complementación de fragmentos de anticuerpo (Johnsson & Varshavsky, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10340-10344; Pelletier *et al.*, 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:12141-12146) y la criba de dos híbridos de levadura (Fields & Song, 1989, Nature 310:245-246) empleada en el modo de selección (Visintin *et al.*, 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:11723-11728). En una versión alternativa, la selección se activa por un socio de fusión que se une a una secuencia específica en el vector de expresión, enlazándose así de forma covalente o no covalente al socio de fusión y al miembro de la biblioteca variante de Fc asociado, con el ácido nucleico que los codifica. Por ejemplo, las patentes PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702 y PCT WO 02/07466 describen un socio de fusión y una técnica tales, que se pueden usar en la presente invención. En una versión alternativa, se puede producir la selección *in vivo* si la expresión del anticuerpo imparte alguna ventaja de crecimiento, reproducción o supervivencia a la célula.

Un subconjunto de métodos de selección referidos como métodos de “evolución dirigida” son aquellos que incluyen el acoplamiento o desarrollo de secuencias favorables durante la selección, en ocasiones con la incorporación de nuevas mutaciones. Como apreciarán los expertos en la materia, los métodos de evolución dirigida pueden facilitar la identificación de las secuencias más favorables en una biblioteca y pueden incrementar la diversidad de las secuencias que se criban. Una variedad de métodos de evolución dirigida conocidos en la técnica se puede usar en la presente invención para cribar variantes de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a ellos, el barajado de ADN (PCT WO 00/42561 A3; PCT WO 01/70947 A3), el barajado de exones (patentes US n° 6.365.377; Kolkman & Stemmer, 2001, Nat Biotechnol 19:423-428), el barajado de familias (Cramer *et al.*, 1998, Nature 391:288-291; la patente US n° 6.376.246), RACHITT.TM (Coco *et al.*, 2001, Nat Biotechnol 19:354-359; PCT WO 02/06469), “STEP” y cebado aleatorio de la recombinación *in vitro* (Zhao *et al.*, 1998, Nat Biotechnol 16:258-261; Shao *et al.*, 1998, Nucleic Acids Res 26:681-683), ensamblaje de genes mediado por exonucleasa (patente US n° 6.352.842; patente US n° 6.361.974), Gene Site Saturation Mutagenesis TM (Patente US n° 6.358.709), Gene Reassembly.TM. (Patente US n° 6.358.709), SCRATCHY (Lutz *et al.*, 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:11248-11253), métodos de fragmentación de ADN (Kikuchi *et al.*, Gene 236:159-167), barajado de ADN de una sola hebra (Kikuchi *et al.*, 2000, Gene 243:133-137) y tecnología de ingeniería de anticuerpos de evolución dirigida AMEsystem (Applied Molecular Evolution) (patente US n° 5.824.514; patente US n° 5.817.483; patente US n° 5.814.476; patente US n° 5.763.192; patente US n° 5.723.323).

En una versión preferida, las variantes de los anticuerpos se pueden cribar utilizando uno o varios ensayos basados en células o *in vivo*. Para dichos ensayos, las inmunoglobulinas modificadas purificadas o no purificadas se añaden típicamente de forma exógena, de tal manera que las células se exponen a inmunoglobulinas individuales o conjuntos de inmunoglobulinas que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos, típicamente pero no siempre, se basan en la función de la inmunoglobulina; esto es, la capacidad del anticuerpo de unirse a su objetivo y mediar varios eventos bioquímicos, por ejemplo la función efectora, la inhibición de unión ligando/receptor, la apoptosis y similares. Estos ensayos a menudo incluyen la monitorización de la respuesta de las células frente al anticuerpo, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, el cambio en la morfología celular o la activación transcripcional, como la expresión celular de un gen natural o gen reporter. Por ejemplo, estos ensayos pueden medir la capacidad de las variantes de los anticuerpos para producir DAC, ADCP ó CDC. Para algunos ensayos puede ser necesaria la adición de células o componentes adicionales, es decir, además de las células diana, puede ser necesario añadir, por ejemplo, complemento de suero o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMCs, del inglés peripheral blood monocytes), células NK, macrófagos y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, de preferencia de humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Las inmunoglobulinas pueden provocar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar el ataque en células diana por células inmunológicas que se han añadido al ensayo. Los métodos para la monitorización de la muerte o la viabilidad celular son conocidos por la técnica e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunológicos, citotóxicos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción con caspasa pueden permitir la medición de la apoptosis y la absorción o liberación de sustratos radioactivos o colorantes fluorescentes, tales como el azul alamar pueden permitir la monitorización del crecimiento o la activación celular. En una versión preferida, se puede emplear el ensayo de citotoxicidad basado en DELFIA.RTM.EuTDA (Perkin Elmer,

MA). De forma alternativa, se puede monitorizar la muerte o el daño de las células diana midiendo el desprendimiento de uno o varios componentes intracelulares naturales, por ejemplo la lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en los ensayos basados en células. En este caso, se puede monitorizar la respuesta mediante el análisis de genes naturales o inmunoglobulinas que pueden ser reguladas al alza, por ejemplo, se puede medir la liberación de ciertas interleucinas o de forma alternativa, se puede realizar la lectura mediante una construcción reporter. Los ensayos basados en células también pueden incluir la medición de cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de inmunoglobulinas modificadas. Las células para estos ensayos pueden ser de tipo procariótico o eucariótico y se puede emplear una variedad de líneas celulares conocidas en la técnica. De forma alternativa, los tamices basados en células se elaboran usando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Es decir, las variantes de anticuerpos no se añaden de forma exógena a las células. Por ejemplo, en una versión, el tamiz basado en células utiliza la expresión en superficie celular. Puede emplearse un socio de fusión que permita la expresión de inmunoglobulinas modificadas en la superficie de las células (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399).

En una versión preferida, la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas modificadas puede determinarse experimentalmente utilizando uno o más ensayos basados en células. En una versión preferida, los ensayos de activación de células *T ex vivo* se emplean para cuantificar experimentalmente la inmunogenicidad. En este método, las células que presentan antígeno y las células T nativas de donantes apareados se prueban una o varias veces con un péptido o un anticuerpo entero de interés. Entonces, la activación de las células T puede detectarse utilizando una variedad de métodos, por ejemplo, haciendo la monitorización de la producción de citocinas o midiendo la absorción de timidina tritiada. En la versión más preferida, la producción de interferón gamma se monitoriza utilizando ensayos Eilspot (Schmitt et al., 2000, J. Immunol. Meth., 24: 17-24).

Las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden caracterizarse en experimentos en células, tejidos y organismos enteros. Como se conoce en la técnica, a menudo los fármacos se ensayan en animales, incluyendo pero sin limitarse a ellos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, a fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad o un modelo de enfermedad o para medir la farmacocinética, toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Los animales pueden ser referidos como modelos de enfermedad. Los agentes terapéuticos a menudo se prueban en ratones, incluyendo pero sin limitarse a ellos, ratones inmunodeprimidos, ratones SCID, ratones de xenoinjerto y ratones transgénicos (incluyendo “knockins” y “knockouts”). Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo que se debe utilizar como agente terapéutico. Cualquier organismo, de preferencia los mamíferos, puede emplearse para las pruebas. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos apropiados y de esta manera pueden emplearse para analizar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. Finalmente se requieren pruebas en humanos para la aprobación como fármacos y por supuesto se contemplan estos experimentos. De esta manera, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden ensayarse en humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden encontrar utilidad en un amplio margen de productos de anticuerpos. En una versión, la variante de anticuerpo de la presente invención se utiliza para la terapia o la profilaxis, para uso preparativo o analítico, como un compuesto de diagnóstico, un compuesto industrial o un reactivo de investigación, de preferencia un agente terapéutico. La variante del anticuerpo puede utilizarse en una composición de anticuerpos que es monoclonal o policlonal. En una versión preferida, se usa una inmunoglobulina modificada de la presente invención para exterminar células diana que contienen el antígeno diana, por ejemplo células cancerosas. En una versión alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo por antagonización de una citocina o un receptor de citocina. En una versión alternativa preferida las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana y exterminar las células diana que contienen el antígeno diana. En una versión preferida alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento y exterminar las células diana que contienen o requieren el antígeno diana. En una versión preferida alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar enzimas y sustratos de enzimas.

Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden emplearse para diversos propósitos terapéuticos. En una versión preferida, un anticuerpo que comprende las inmunoglobulinas modificadas se administra a un paciente para tratar un trastorno específico. Un “paciente” para los propósitos de la presente invención incluye tanto a humanos como a otros animales, de preferencia mamíferos y con más preferencia humanos. Aquí se entiende por “trastorno específico” un trastorno que puede mejorar por la administración de una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención.

En una versión, una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. De forma alternativa, la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención se administra en combinación con uno o varios agentes terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a ellos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasas, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores u otros agentes terapéuticos. Las inmunoglobulinas modificadas pueden administrarse de forma concomitante con uno e varios regímenes terapéuticos. Por ejemplo, una variante del anticuerpo de la presente invención puede administrarse al paciente junto con

quimioterapia, con terapia de radiación o con ambas terapias de quimioterapia y radiación. En una versión, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden administrarse junto con uno o varios anticuerpos, que pueden o no comprender una variante del anticuerpo de la presente invención. De acuerdo con otra versión de la invención, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y uno o varias terapias anticáncer distintas se emplean para 5 tratar células cancerosas *ex vivo*. Se contempla que dicho tratamiento *ex vivo* pueda ser de utilidad en el trasplante de médula ósea y particularmente en trasplante de médula ósea autólogo. Por supuesto, se contempla que los anticuerpos de la invención se puedan emplear en combinación con aún otras técnicas terapéuticas, como la cirugía.

Una variedad de otros agentes terapéuticos se puede usar para la administración con las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. En una versión, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente anti-angiogénico, que es un compuesto que bloquea o interfiere en cierto grado en el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico, por ejemplo, puede ser una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, fusión Fc, o citosina, que se une a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento involucrado en la estimulación de la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido aquí es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor). En una versión alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente terapéutico que induce o mejora la respuesta inmune adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo que hace diana en CTLA-4. En una versión alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un inhibidor de tirosina quinasa, que es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una versión alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de 10 la presente invención se administran con una citocina. Por “citocina”, tal y como se emplea aquí, se entiende un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúa en otra célula como mediadores intercelulares, incluyendo las quimiocinas.

Se contemplan composiciones farmacéuticas donde se formulan las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y uno o varios agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las variantes de anticuerpo de la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado deseado de pureza, con soportes, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que se tienen que usar para la administración *in vivo* son de preferencia estériles. Esto se logra 15 fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. Las inmunoglobulinas modificadas y otros agentes terapéuticamente activos aquí descritos pueden formularse también como inmunoliposomas y/o encerrados en microcápsulas.

La administración de la composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención, de preferencia en forma de una solución acuosa estéril, puede realizarse en una variedad de formas, incluyendo pero sin limitarse a ellas, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intranasalmente, intraóticamente, transdérmicamente, tópicamente (por ejemplo geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), en forma intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (por ejemplo, la tecnología inhalable AERx™ comercialmente disponible de Aradigm, o el sistema de suministro pulmonar Inhance™ comercialmente disponible en Inhale Therapeutics), en forma vaginal, 20 parenteral, rectal o intraocular.

Como se emplea aquí, la expresión “se une específicamente”, se refiere a una reacción de unión que es determinante del ligando afin, de interés en una población heterogénea de moléculas. De esta manera, bajo las condiciones designadas (por ejemplo, las condiciones de inmunoensayo en el caso de una inmunoglobulina), el anticuerpo especificado se une a su “diana” particular y no se une en cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. De forma comparable a las CDRs de anticuerpos, las regiones modificadas del bucle estructural son porciones de proteínas de unión de antígeno o de unión de molécula y no son antígenos como tales. 25

El término “sistema de expresión”, se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias control en unión operativa, de manera que los anfitriones transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, el sistema de expresión puede estar incluido en un vector; sin embargo, el ADN relevante también puede estar integrado en el cromosoma anfitrión. 30

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención, el sistema de expresión comprende un vector. Cualquier vector de expresión conocido en la técnica puede ser empleado para este propósito como apropiado. 35

La inmunoglobulina modificada se expresa de preferencia en un anfitrión, de preferencia en una célula bacteriana, de levadura, de planta, en una célula de animal o en una planta o en un animal. 40

Se puede emplear una amplia variedad de células anfitrionas apropiadas para expresar la inmunoglobulina modificada, incluyendo pero no limitadas a células de mamíferos (células de animales), células de plantas, bacterias (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), células de insecto y levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*). Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden ser de utilidad en la presente invención se describe en el catálogo de líneas celulares ATCC, disponible en American Type Culture Collection. Además, también pueden emplearse plantas y animales como anfitriones para la expresión de la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención. La expresión así como los vectores o casetes de transfección pueden seleccionarse de acuerdo con el anfitrión empleado. 45 50 55

Por supuesto también se pueden emplear sistemas de expresión de proteínas libres de células o acelulares. Las plataformas de expresión de proteínas de transcripción/traducción *in vitro*, que producen cantidades suficientes de proteínas, ofrecen muchas ventajas de una expresión de proteínas libres de células, eliminando la necesidad de pasos laboriosos corriente arriba y corriente abajo (por ejemplo, transformación de la célula anfitriona, cultivo, o lisis) típicamente asociadas con sistemas de expresión basados en células.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la producción de una inmunoglobulina o una preparación farmacéutica de la misma, que comprende por lo menos una modificación en una región del bucle estructural de la inmunoglobulina y que determina la unión de dicha inmunoglobulina a un epítipo de un antígeno, en donde la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo, el cual método comprende los pasos de:

- provisión de un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende por lo menos una región del bucle,
- modificación por lo menos de un radical nucleótido de por lo menos una de dichas regiones del bucle,
- transferencia de dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión,
- expresión de dicha inmunoglobulina modificada,
- puesta en contacto de la inmunoglobulina modificada expresada, con un epítipo,
- determinación de si dicha inmunoglobulina modificada se une a dicho epítipo, y
- provisión de la unión de la inmunoglobulina modificada a dicho epítipo, y opcionalmente, finalización en una preparación farmacéutica.

En particular, la presente invención se refiere a un método para la fabricación de una inmunoglobulina multi-específica que se une de forma específica por lo menos a una primera molécula o a una preparación farmacéutica de la misma que comprende por lo menos una modificación en por lo menos una región del bucle estructural de dicha inmunoglobulina y determina el enlace específico de por lo menos una región del bucle a por lo menos una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos víricos, en donde la inmunoglobulina que contiene una región del bucle estructural sin modificar no se une específicamente a por lo menos la segunda molécula como mínimo, el cual método comprende los pasos de:

- provisión de un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente por lo menos a una primera molécula que comprende por lo menos una región del bucle estructural,
- modificación por lo menos de un radical nucleótido de por lo menos una de dichas regiones del bucle codificada por dicho ácido nucleico,
- transferencia de dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión,
- expresión de dicha inmunoglobulina modificada,
- puesta en contacto de la inmunoglobulina modificada expresada, con por lo menos dicha segunda molécula, y
- determinación de si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente a la segunda molécula y
- provisión de la inmunoglobulina modificada que se une específicamente a por lo menos dicha segunda molécula y, opcionalmente, finalización en una preparación farmacéutica.

Se prefiere el diseño por ingeniería de más de una especificidad en un miembro de un par de unión específico (Kufner *et al.* (2004) Trends in Biotechnology ("Tendencias en Biotecnología") vol. 22, páginas 238-244).

Se han realizado numerosos intentos para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales multiespecíficos, por ejemplo biespecíficos. Un problema en la producción de anticuerpos biespecíficos hechos de dos cadenas de polipéptido diferentes (cadena pesada y ligera), consiste en la necesidad de expresar 4 cadenas diferentes (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) en una célula, dando como resultado numerosas combinaciones diferentes de moléculas que se tienen que separar de la molécula biespecífica deseada en la mezcla. Debido a su similitud, la separación de estas moléculas es difícil y costosa. Se han empleado numerosas técnicas para reducir al mínimo la concurrencia de estos apareamientos indeseados (Carter (2001) Journal of Immunological Methods ("Revista de Métodos Inmunológicos"), vol 248, páginas 7-15).

ES 2 323 651 T3

Una solución al problema es la producción de una cadena de polipéptido con dos especificidades, como por ejemplo dos scFvs enlazados entre sí o la producción de los denominados diacuerpos. Estas moléculas han demostrado estar muy lejos del pliegue de una molécula natural y son notoriamente difíciles de producir (LeGall *et al.*, (2004) Protein Engineering, Design & Selection ("Ingeniería de Proteínas, Diseño & Selección"), vol 17, páginas 357-366).

Otro problema del presente desarrollo de anticuerpos biespecíficos consiste en el hecho de que incluso si los anticuerpos precursores se unen bivalentemente a su socio de enlace respectivo (p. ej. IgG), el anticuerpo biespecífico resultante es monovalente para cada socio de enlace respectivo.

Las moléculas multiespecíficas preferidas de la presente invención resuelven estos problemas:

Es posible la expresión de una molécula biespecífica como cadena polipeptídica (un dominio Ig modificado con dos especificidades de unión, ver sección de ejemplos) que es más fácil de lograr que la expresión de las dos cadenas polipeptídicas de anticuerpo (Cabilly *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277 (1984)).

También se puede elaborar como una molécula tipo anticuerpo (es decir, hecha de dos cadenas de polipéptido), debido al hecho de que la segunda especificidad se ubica en la parte no variable de la molécula, no hay necesidad de dos cadenas pesadas diferentes o cadenas ligeras diferentes. De esta manera, no hay posibilidad de un apareamiento erróneo de las dos cadenas.

Un anticuerpo de la presente invención puede consistir en una cadena pesada y una cadena ligera, que forman juntamente una región variable que se une a un socio de enlace específico, pudiendo estar formada la segunda especificidad por un bucle modificado de cualquiera de los bucles estructurales ya sea de la cadena pesada o de la cadena ligera. El sitio de unión también puede estar formado por más de un bucle no-CDR que puede ser estructuralmente un vecino (ya sea en la cadena pesada o en la cadena ligera o en ambas cadenas).

El anticuerpo o derivado modificado puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo (p. ej. Fab. CH1-CH2, CH2-CH3).

Se puede unir de forma mono o multivalente a los socios de enlace o incluso con diferente valencia a socios de enlace diferentes, dependiendo del diseño.

Como hay numerosos bucles diferentes disponibles para la selección y el diseño de un sitio de enlace específico en las regiones no-CDR de las cadenas pesadas y ligeras, es posible diseñar derivados de anticuerpo con incluso más de dos especificidades sin los problemas anteriormente mencionados.

Los dominios de enlace específico dentro de una cadena de polipéptido se pueden conectar con o sin un péptido enlazador.

Algunas clases de anticuerpo pueden considerarse multiespecíficas, en particular biespecíficas, por naturaleza: se unen a un antígeno (que típicamente es, por ejemplo, una estructura extraña o una estructura asociada a un cáncer) con la región variable y se unen a moléculas efectoras Fc con la parte Fc (por ejemplo, receptores Fc en diversas células inmunológicas o una proteína de complemento) permitiendo así efectos tales como ADCC, ADCP ó CDC.

Las moléculas Fc efectoras se unen por la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina (para IgG1 consiste en los dominios CH2 y CH3) y se han descrito numerosos métodos para optimizar la función efectora al mejorar el enlace de la parte Fc de una molécula de anticuerpo ya sea por técnicas de glicoingeniería (patente US n° 6.602.684) ó por ingeniería de proteínas o bien directamente en Fc (US 2005/0054832), o indirectamente por ingeniería fuera de Fc (US 2005/02944403). Ambos, la unión de la región Fc al receptor Fc, y/o la unión a las proteínas de complemento, tales como Cq1, se ha alterado por estas técnicas. Usualmente, se busca mejorar la afinidad de unión a estas moléculas Fc efectoras, ya que esto se correlaciona con funciones efectoras mejoradas.

Con la presente invención es posible diseñar el anticuerpo que se une a las moléculas efectoras Fc fuera de la región natural de unión Fc. Bucle modificado en dominios del anticuerpo distintos de los bucles implicados en una unión "natural" a una molécula efectora Fc, pueden seleccionarse de una biblioteca o diseñarse para unir a una o más moléculas efectoras Fc. Un anticuerpo con tales sitios de unión adicionales a la molécula efectora Fc, tendría o bien una avidez más fuerte a cierta molécula efectora Fc, o bien una célula efectora presentando una molécula efectora Fc, y por lo tanto, puede tener un efecto incluso más fuerte que los anticuerpos obtenidos por glicoingeniería o de otra manera, regiones Fc mejoradas. Sin embargo, para ciertas versiones de la presente invención, las características efectoras de un anticuerpo determinado que se tienen que modificar, no deben cambiarse directamente sino que permanecen sin ser afectadas por la modificación en el bucle estructural, de acuerdo con la presente invención.

Los fragmentos de anticuerpos tienen ciertas ventajas cuando se comparan con los anticuerpos enteros. Los fragmentos tienen habitualmente buenas propiedades de biodistribución y pueden producirse con más facilidad. Sin embargo la mayoría de los diseños de fragmentos de anticuerpos carecen de funciones efectoras y tienen *in vivo* una semi vida corta (Holliger P. *et al.*, Nat Biotechnol. (2005) 23: 1126-36).

Ni el dominio CH1 ni los dominios C κ ó C λ influyen sobre las funciones efectoras, lo cual es la razón por la cual los Fabs no muestran ADCC, ADCCP ó CDC. La patente WO 02/44215 describe la unión de moléculas que consiste del sitio de unión del antígeno de un anticuerpo y una unión peptídica de las moléculas Fc-efectoras. De esta manera puede construirse un fragmento de anticuerpo que muestra funciones efectoras. El péptido se incorpora en la molécula de unión en una posición que ni destruye la unión del antígeno ni la capacidad del péptido para unirse a una molécula efectora Fc.

De acuerdo con la presente invención sin embargo, la unión a las moléculas efectoras Fc puede efectuarse con dominios modificados de inmunoglobulina los cuales han sido seleccionados de la unión de la molécula efectora Fc a partir de bibliotecas de secuencias bucle aleatorias, dentro de una estructura fija de un dominio de la inmunoglobulina. Por lo tanto, es posible seleccionar secuencias del bucle específicas que no se unirían a las moléculas efectoras Fc fuera de la estructura del dominio de la Ig. Los polipéptidos resultantes de la presente invención pueden por lo tanto constar de preferencia de más de 100 aminoácidos.

Con el fin de seleccionar una función efectora potencial de dichos dominios de acuerdo con la presente invención, pueden seleccionarse bibliotecas del mutante CH1, los dominios C κ ó C λ , para la unión a los receptores Fc y/o los factores complementarios tales como el C1q.

con el fin de aumentar la semi vida *in vivo* de una molécula que consiste en, o contiene, dicho dominio (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4, C κ ó C λ), la unión al FcRn puede seleccionarse con bibliotecas de mutante, por ejemplo los dominios CH1-, CH2-, CH3-, CH4-, C κ ó C λ , de acuerdo con la presente invención.

Los receptores FcRn para la selección pueden proporcionarse bien sea sobre la superficie de las células que expresan naturalmente los respectivos receptores, o bien mediante la expresión y purificación de la parte extracelular del respectivo receptor. Para la finalidad de esta invención un primer cribado del FcRn puede seleccionar dominios mutantes que pueden además analizarse *in vitro* e incluso además caracterizarse en experimentos FACS, mediante la unión a células que expresan el receptor FcRn. Puede además caracterizarse mediante el grado de afinidad de la unión a varios FcRn recombinantes, isoformas y alotipos, por ejemplo con técnicas de resonancia plasmón de superficie.

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención, la inmunoglobulina es de origen humano o de ratón.

Como la inmunoglobulina modificada se puede emplear para diversos propósitos, en particular en composiciones farmacéuticas, la inmunoglobulina es de preferencia, de origen humano o de ratón. Por supuesto, la inmunoglobulina modificada puede ser también una inmunoglobulina humanizada o quimérica.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, la inmunoglobulina humana se selecciona del grupo formado por IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y IgM.

La inmunoglobulina de ratón se selecciona, de preferencia, del grupo formado por IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3 e IgM.

La inmunoglobulina modificada puede derivarse de una de las clases de inmunoglobulina identificadas más arriba.

La inmunoglobulina comprende de preferencia una cadena pesada y/o una cadena ligera de la inmunoglobulina o una parte de la misma.

La inmunoglobulina modificada puede comprender una cadena pesada y/o una cadena ligera, por lo menos un dominio variable y/o uno constante.

la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención comprende de preferencia por lo menos un dominio constante y/o por lo menos un dominio variable de la inmunoglobulina o una parte de la misma incluyendo un minidominio.

Un dominio constante es una unidad de pliegue de la inmunoglobulina de la parte constante de una molécula de inmunoglobulina, también referida como un dominio de la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4, C-kappa, C-landa).

Un dominio variable es una unidad de inmunoglobulina plegada de la parte variable de una inmunoglobulina, referida también como un dominio de la región variable (por ejemplo, Vh, Vk, VI, Vd).

Una inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención consiste en un dominio constante que se selecciona del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3, CH4, Ig-kappa-C, Ig-landa-C, o una parte de la misma que incluye un minidominio, con por lo menos una región bucle, y se caracteriza porque por lo menos una región del bucle comprende por lo menos una modificación de aminoácido que forma por lo menos una región del bucle modificada, en la que por lo menos dicha región modificada del bucle se une específicamente por lo menos a un epítopo de un antígeno.

La inmunoglobulina puede comprender por lo menos un dominio simple o parte del mismo, incluyendo un mini-dominio que consta de dos hebras beta de un dominio de inmunoglobulina conectado mediante un bucle estructural, un dominio variable de una inmunoglobulina simple, o una cadena simple Fv.

Otra inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención consiste en un dominio variable de una cadena pesada o ligera, o una parte de la misma que incluye un minidominio, por lo menos con una región bucle, y se caracteriza porque por lo menos dicha región bucle comprende por lo menos una modificación de aminoácidos que forma por lo menos una región bucle modificada, en donde por lo menos dicha región bucle modificada se une específicamente por lo menos a un epítipo de un antígeno.

De acuerdo con una versión preferida, el dominio constante se selecciona del grupo formado por CH1, CH2, CH3, CH4, Ig-kappa-C, Ig-landa-C y combinaciones de los mismos.

La inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o varios dominios constantes (por ejemplo, por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, diez dominios). Si más de un dominio está presente en la inmunoglobulina modificada, estos dominios pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes (por ejemplo, CH1-CH1-CH2, CH3-CH3). Por supuesto, el orden de los dominios simples también puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, CH1-CH3-CH2, CH4-CH1-CN3-CH2).

Toda la numeración de las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas sigue el esquema de numeración IMGT (IMGT, The International ImMunoGeneTics Information system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc *et al.*, 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212; Ruiz *et al.*, 2000 Nucleic Acids Res. 28: 219-221; Lefranc *et al.*, 2001, Nucleic Acids Res. 29: 207-209; Lefranc *et al.*, 2003, Nucleic Acids Res. 31:307-310; Lefranc *et al.*, 2005, Dev Comp Immunol 29:185-203).

De acuerdo con otra versión preferida de la presente invención, las regiones bucle modificadas CH1, CH2, CH3 y CH4 comprenden los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 y los aminoácidos 106 a 117, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

Las regiones del bucle de Ig-kappa-C y I4-landa-C de origen humano comprenden de preferencia los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117, y los aminoácidos 123 a 126, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

Las regiones bucle de Ig-kappa-C e Ig-landa-C de origen ratón, comprenden de preferencia los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 26 a 36, los aminoácidos 43 a 79, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 90 a 101, los aminoácidos 108 a 116 y los aminoácidos 122 a 125, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

Las regiones del bucle estructural del dominio variable de la inmunoglobulina de origen humano comprenden de preferencia los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76, y los aminoácidos 89 a 101, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención, las regiones bucle estructurales del dominio variable de la inmunoglobulina de origen ratón, comprenden los aminoácidos 6 a 20, los aminoácidos 44 a 52, los aminoácidos 67 a 76, y los aminoácidos 92 a 101, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

Las regiones de los aminoácidos anteriormente identificadas de las inmunoglobulinas respectivas comprenden las regiones del bucle que se tienen que modificar.

La inmunoglobulina de acuerdo con la invención, es de preferencia de origen camello.

Los anticuerpos del camello comprenden solamente una cadena pesada y tienen la misma afinidad al antígeno que los anticuerpos normales formados de cadenas ligeras y pesadas. En consecuencia los anticuerpos de camello son mucho más pequeños que por ejemplo los anticuerpos humanos, lo cual les permite penetrar tejidos densos para alcanzar el antígeno, en donde las proteínas más grandes no pueden. Sin embargo, la simplicidad comparativa, la alta afinidad y especificidad y el potencial para alcanzar e interactuar con sitios activos, los anticuerpos de cadena larga de camello presentan ventajas sobre los anticuerpos habituales, en el diseño, producción y aplicación de compuestos de valor clínico.

La inmunoglobulina de origen camello, comprende de preferencia por lo menos un dominio constante seleccionado del grupo formado por CH1, CH2 y CH3.

Las regiones bucle de CH1, CH2 y CH3 de la inmunoglobulina de camello, comprenden los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 24 a 39, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 82 a 85, los aminoácidos 91 a 103 y los aminoácidos 108 a 117, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención, la unión específica de la inmunoglobulina modificada a la molécula se determina mediante un ensayo de unión seleccionado del grupo formado por ensayos inmunológicos, de preferencia ensayos inmunosorbentes ligados a enzima (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón

superficial, espectroscopia de resonancia magnética nuclear con diferencia de transferencia de saturación, espectroscopia de resonancia magnética nuclear de transferencia NOE (trNOE), ensayos competitivos, ensayos de unión de tejidos, ensayos de unión de células vivas y ensayos de extracto celular.

5 Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo empleando una variedad de métodos ya conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitándose, a métodos basados en FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (“Transferencia de energía de resonancia-fluorescencia”) y BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) (“Transferencia de energía de resonancia-bioluminiscencia”), AlphaScreen (Amplified Luminiscent Proximity Homogeneous Assay (“Ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada”), Scintillation Proximity Assay (“Ensayo de centelleo de proximidad”), ELISA (Enzyme Linked immunosorbent Assay (“Ensayo inmunosorbente ligado a enzima”),
10 SPR (Surface Plasmon Resonance (“Resonancia de plasmón superficial”), también conocida como BIACORE), Isothermal Titration Calorimetry (“Calorimetría de titulación isotérmica”), Differential scanning calorimetry (“Calorimetría de cribado diferencial”), Gel electrophoresis (“Electroforesis sobre gel”), y Chromatography including gel filtration (“Cromatografía incluyendo la gel filtración”). Estos y otros métodos pueden aventajar a algún socio de fusión o
15 alguna marca de señalización.

La inmunoglobulina modificada se conjuga de preferencia con un marcador seleccionado del grupo formado por moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcas radiactivas, marcas de color, marcas fluorescentes, marcas cromogénicas, marcas luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y sus mezclas.
20

La inmunoglobulina modificada puede conjugarse con otras moléculas que permiten la detección simple de dicho conjugado, por ejemplo, en ensayos de unión (por ejemplo, análisis ELISA) y estudios de unión.

25 Una versión preferida de la presente invención se refiere a un método para la producción de una inmunoglobulina con una mayor semivida, el cual método comprende los pasos de:

- obtención por ingeniería de una inmunoglobulina modificada mediante un método de acuerdo con la presente invención, que comprende un dominio mutante seleccionado del grupo formado por CH1, CH2, CH3, CH4, C-kappa
30 y C-landa, y tiene una especificidad de unión para un autoantígeno mediante una modificación en la región del bucle estructural, y

- elaboración de una preparación que tiene una mayor vida media.

35 Una versión preferida de la presente invención, se refiere a un método, de acuerdo con la presente invención, en donde la inmunoglobulina modificada tiene una especificidad de unión al FcRn.

Una versión preferida de la presente invención se refiere a un método para producir una inmunoglobulina por
40 ingeniería, con función efectora, el cual método comprende los pasos de:

- obtención por ingeniería de una inmunoglobulina modificada mediante un método de acuerdo con la presente invención, que comprende un dominio mutante seleccionado del grupo formado por CH1, CH2, CH3, CH4, C-kappa
45 y C-landa, y tiene una especificidad de unión para una molécula efectora mediante una modificación en la región del bucle estructural, y

- elaboración de una preparación que tiene una función efectora, en donde dicho fragmento de anticuerpo obtenido por ingeniería es de preferencia un fragmento Fab ó Fc.

50 La inmunoglobulina de la presente invención puede consistir en un dominio constante seleccionado del grupo formado por CH1, CH2, CH3, CH4, Ig-kappa-C, Ig-landa-C, ó una parte de los mismos incluyendo minidominios, o combinaciones de los mismos, con por lo menos una región bucle, caracterizada porque por lo menos dicha región bucle comprende por lo menos una modificación de aminoácidos, formando por lo menos una región bucle modificada,
55 en donde por lo menos dicha región bucle modificada se une específicamente a por lo menos un epítipo de un antígeno.

Se prefiere combinar molecularmente por lo menos un dominio de anticuerpo modificado (= unión al socio específico por medio de secuencias no variables o bucle estructural), con por lo menos otra molécula de unión que puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un receptor soluble, un ligando, u otro dominio de anticuerpo modificado.
60

La molécula se selecciona del grupo formado por moléculas proteínicas, ácidos nucleicos, e hidratos de carbono.

Las regiones bucle de las inmunoglobulinas modificadas pueden unirse específicamente a cualquier tipo de moléculas de unión, en particular a moléculas proteínicas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glicanos,
65 hidratos de carbono, lípidos, pequeñas moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas. Por supuesto, las inmunoglobulinas modificadas pueden comprender por lo menos dos regiones bucle en donde cada una de las regiones bucle pueden unirse específicamente a otras moléculas o epítopos.

De acuerdo con una versión preferida de la presente invención, la molécula que se une a la región bucle estructural modificada, se selecciona del grupo formado por antígenos asociados a un tumor, en particular EpCAM, glicoproteína-72 asociada a un tumor (TAG-72), antígeno asociado a un tumor CA 125, Prostate specific membrane antigen (PSMA), ("Antígeno de membrana específico de la próstata"), High molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) ("Antígeno, asociado con melanoma, de alto peso molecular"), antígeno asociado con un tumor que expresa hidratos de carbono relacionado con Lewis Y, Carcinoembryonic antigen (CEA) ("antígeno carcinoembrionario"), CEACAM5, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18 y antígeno asociado con un tumor de citoqueratina, antígenos bacterianos, antígenos víricos, alérgenos, fluoresceína, lisozima, receptor 9 tipo toll, eritropoyetina CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma; TNF-alfa, TNFbeta2, TNF, alfa, TNF alfabeta, TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEGI, OX40L, receptor-1 de TRAIL, receptor de adenosina A1, receptor de linfotóxina beta, TACI, BAFF-R, EPO;LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta1, integrina beta2, integrina alfa4/beta7, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa5, integrina alfa6, integrina alfav, integrina alfaVbeta 3, factor de crecimiento de queratinocitos FGFR-3, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de células T, B7-1, B7-2, VNRintegrina, TGFbeta1, TGFbeta2, eotaxina 1, BlyS (estimulador de linfocitos-B), complemento C5, IgE, factor VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB4), factor tisular, VEGF, VEG-FR, receptor de endotelina, VLA-4, hidratos de carbono tales como antígenos de grupo sanguíneo e hidratos de carbono relacionados, glicosilación Galili, gastrina, receptores de gastrina, hidratos de carbono asociados a un tumor, hapteno NP-cap ó NIP-cap, receptor de células T alfa/beta, E-selectina, digoxina, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y fosfatasa alcalina testicular tipo PLAP, receptor de transferrina, heparanasa I, miosina cardíaca humana, glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glicoproteína de la cubierta gH del citomegalovirus humano (HCMV)gH, HIV gp120, HCMV, virus sincitial respiratorio RSV F, RSVF Fgp, VNRintegrina, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, bucle HIV IIIB gp120 V3, virus sincitial respiratorio (RSV) Fgp, glicoproteína gD del virus del Herpes simplex (HSV), glicoproteína HSV gB, glicoproteína de la cubierta HCMV gB, toxina Clostridium perfringens y sus fragmentos.

La inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención se puede unir de preferencia a una de las moléculas descritas anteriormente. Estas moléculas comprenden también alérgenos.

De acuerdo con otra versión preferida de la presente invención se modifican los residuos aminoácido de las posiciones 15 a 17, 29 a 34, 85,4 a 85,3, 92 a 94, 97 a 98 y/o 108 a 110 de CH3, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT:

La modificación de la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención es de preferencia una delección, una sustitución o una inserción.

De acuerdo con la presente invención se eliminan por lo menos 1, de preferencia por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 15 aminoácidos, substituyendo con otros aminoácidos (también con aminoácidos modificados) o se insertan en la región del bucle de la inmunoglobulina. Sin embargo, el número máximo de aminoácidos insertados en la región del bucle de una inmunoglobulina no puede exceder de 30, de preferencia 25, con mayor preferencia, 20 aminoácidos. La sustitución y la inserción de los aminoácidos se realiza de preferencia de forma aleatoria por métodos ya conocidos en la técnica, como se describe en la presente solicitud de patente.

La inmunoglobulina de acuerdo con la invención se corresponde con una versión específica caracterizada porque la región CH3 comprende SEQ ID n° 16 ó SEQ ID n° 18, cuando EpCam se une a dicha inmunoglobulina, SEQ ID n° 20, cuando la fluoresceína se une a la inmunoglobulina, SEQ ID n° 22, 24, 26, 28, 30 ó 32, cuando la lisozima se une a dicha inmunoglobulina, SEQ ID n° 34, 36, 38 ó 40, cuando TLR9 se une a la inmunoglobulina, y SEQ ID n° 42, cuando la lisozima y/o la eritropoyetina se unen a dicha inmunoglobulina.

De acuerdo con una versión específica de la invención, la inmunoglobulina se caracteriza porque comprende la SEQ ID n° 44 ó SEQ ID n° 46, cuando la lisozima y gp41 se unen a dicha inmunoglobulina.

La inmunoglobulina modificada se conjuga de preferencia con una molécula marcadora o reporter, seleccionada entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcas enzimáticas, marcas radiactivas, marcas coloreadas, marcas fluorescentes, marcas cromogénicas, marcas luminescentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y sus mezclas.

Las inmunoglobulinas modificadas conjugadas a los marcadores como se ha especificado más arriba, pueden emplearse, por ejemplo, en métodos de diagnóstico.

La inmunoglobulina obtenida por un método de acuerdo con la presente invención puede emplearse para la preparación de una vacuna para la inmunización activa. A este respecto, la inmunoglobulina se emplea, o bien como sustancia fármaco antigénica para formular una vacuna, o bien se emplea para captar o capturar estructuras antigénicas para emplear en una formulación de una vacuna.

La inmunoglobulina obtenida por un método de acuerdo con la presente invención, puede también emplearse para la preparación de una biblioteca de proteínas de inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas según la invención pueden emplearse para aislar específicamente moléculas a partir de una muestra. Si se emplean inmunoglobulinas multiespecíficas, puede aislarse más de una molécula de una muestra. Es especialmente ventajoso utilizar inmunoglobulinas modificadas en estos métodos, porque permite, por ejemplo, generar una matriz con una superficie homogénea con cantidades definidas de socios de unión (es decir, inmunoglobulinas modificadas) inmovilizadas allí, que son capaces de unirse a las moléculas que se tienen que aislar. En contraste a ello, si se emplean socios de enlace monoespecíficos no se puede generar una matriz homogénea debido a que los socios de enlace sencillos no se unen con la misma eficacia a la matriz.

Esto puede lograrse con un método para unir específicamente y/o detectar una molécula, el cual método comprende los pasos de:

(a) puesta en contacto de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, con una muestra de ensayo de la que se sospecha que contiene dicha molécula, y

(b) detección de la formación potencial de un complejo específico molécula/inmunoglobulina, o mediante un método para aislar específicamente una molécula, el cual método comprende los pasos de:

(a) puesta en contacto de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, con una muestra que contiene dicha molécula,

(b) separación del complejo específico inmunoglobulina/molécula, formado, y

Las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención pueden emplearse para suministrar por lo menos un compuesto ligado a las regiones CDRs y/o modificadas del bucle, a una diana. Estas inmunoglobulinas pueden emplearse para hacer diana en sustancias terapéuticas en un sitio de acción preferido en el curso del tratamiento de una enfermedad.

Esto puede lograrse mediante un método para dirigir un compuesto a una diana, el cual método comprende los pasos de:

(a) puesta en contacto de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, capaz de unirse específicamente a dicho compuesto;

(b) suministro del complejo inmunoglobulina/compuesto a la diana.

La inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención, o que puede obtenerse mediante el método de acuerdo con la presente invención, puede estar contenida en una biblioteca de proteínas.

Los métodos preferidos para la construcción de dicha biblioteca pueden encontrarse más arriba y en los ejemplos. La biblioteca de acuerdo con la presente invención, puede emplearse para identificar las inmunoglobulinas que se unen a una molécula distinta.

Una inmunoglobulina existente puede ser cambiada para introducir sitios de unión al antígeno en cualquier dominio o minidominio mediante el empleo de una biblioteca de proteínas del respectivo dominio de por lo menos 10, de preferencia 100, con mayor preferencia 1000, con mayor preferencia 10000, con mayor preferencia 100000, con mayor preferencia más de 1000000 dominios diferentes, con por lo menos un bucle modificado. La biblioteca se criba mediante la determinación de la unión al antígeno específico. Después de la caracterización molecular por las propiedades deseadas, el dominio o minidominio seleccionado se clona en la inmunoglobulina original mediante técnicas de ingeniería genética de forma que se reemplace la región tipo salvaje. Alternativamente, sólo el ADN que codifica los bucles o codifica los aminoácidos mutados, puede ser intercambiado para obtener una inmunoglobulina con el sitio de unión adicional para el antígeno específico.

La elección del sitio para el bucle estructural específico para el antígeno, mutado, depende de la estructura de la inmunoglobulina original y del propósito del sitio de unión adicional. Si, por ejemplo, la molécula original es una inmunoglobulina completa que necesita tener insertado un sitio de unión de antígeno adicional sin perturbación de la función efectora, los bucles a modificar se seleccionarán a partir de dominios distantes de CH2 y CH3, que son los socios de unión naturales para las moléculas efectoras Fc. Si la inmunoglobulina original es una Fab, es posible la modificación de bucles en dominios constantes de las cadenas ligeras o las cadenas pesadas o los dominios variables respectivos. Para generar una biblioteca se pueden preparar bibliotecas de moléculas originales mutantes que tienen mutaciones en uno o varios bucles estructurales de uno o varios dominios. La selección con moléculas originales mutadas completas puede tener ciertas ventajas, ya que la selección para la unión de antígeno con un bucle estructural modificado proporcionará las modificaciones estéricamente ventajosas si también se analizan para las otras propiedades que deberá mostrar la inmunoglobulina mutada.

El tamaño requerido (es decir, el número de variantes de proteínas) de una biblioteca de proteínas de un dominio o un minidominio mutado o una molécula de fusión, depende de la tarea a realizar. En general, una biblioteca para generar un sitio de unión al antígeno “de novo”, requiere ser mayor que una biblioteca empleada para modificar adicionalmente un sitio de unión al antígeno obtenido por ingeniería, ya existente, construido de un bucle estructural modificado (por ejemplo, para potenciar la afinidad o cambiar la especificidad fina al antígeno).

La inmunoglobulina de la invención puede estar comprendida en una biblioteca de inmunoglobulinas o una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende una pluralidad de inmunoglobulinas, por ejemplo un dominio constante o variable, un minidominio y/o por lo menos una región del bucle estructural contenida en un minidominio, o moléculas de ácido nucleico que los codifican. La biblioteca contiene miembros con diferentes modificaciones, en donde la pluralidad se define por las modificaciones en por lo menos una región del bucle estructural. La biblioteca de ácidos nucleicos incluye de preferencia por lo menos 10 miembros diferentes (que dan como resultado el intercambio de un aminoácido) y con mayor preferencia incluye por lo menos 100, con más preferencia 1000 ó 10000 miembros diferentes (por ejemplo, diseñados por estrategias de aleatorización o técnicas combinatorias). Incluso son también preferidos, números de miembros individuales más diversificados, tales como por lo menos 1000000 ó por lo menos 10000000.

Pueden combinarse dos diferentes dominios o minidominios seleccionados de por lo menos dos bibliotecas de acuerdo con la invención, con el fin de generar inmunoglobulinas multiespecíficas. Estas inmunoglobulinas específicas seleccionadas se pueden combinar entre sí y con otras moléculas, de forma similar a bloques de construcción, para diseñar la disposición óptima de los dominios o minidominios para obtener las propiedades deseadas.

Además, una o varias inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la invención pueden introducirse en varios o en todos los sitios diferentes de una proteína posible sin destruir la estructura de la proteína. Mediante esta técnica de “barajado de dominios” se crean nuevas bibliotecas que a su vez pueden seleccionarse para determinar las propiedades deseadas.

La biblioteca preferida contiene inmunoglobulinas de acuerdo con la invención, seleccionadas del grupo que consiste en dominios de una inmunoglobulina, mini dominios o sus derivados.

Una versión preferida de la presente invención es una molécula de unión para un antígeno (molécula de unión al antígeno) que comprende por lo menos un dominio de inmunoglobulina y una región del bucle estructural que se modifica de acuerdo con la presente invención para unir el antígeno, en que dicha molécula de unión no comprende dominios variables de un anticuerpo. Puede comprender otras partes utilizables para las actividades del anticuerpo (por ejemplo, como regiones efectoras naturales o modificadas (secuencias)); sin embargo, carece de la región de unión “natural” de anticuerpos, es decir, los dominios variables en su posición de origen natural. Estas moléculas de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención tienen las ventajas descritas anteriormente para las presentes moléculas, aunque sin la actividad de unión específica de los anticuerpos; sin embargo, con una actividad de unión específica recientemente introducida en la región del bucle estructural.

De preferencia, estas moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención comprenden CH1, CH2, CH3, CH4, Ig-kappa-C, Ig-lambda-C y sus combinaciones; dichas combinaciones comprenden por lo menos dos, de preferencia por lo menos cuatro, especialmente por lo menos seis dominios constantes y por lo menos una región del bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención. De preferencia estas regiones del bucle estructural o bien se conectan mediante la región del bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención o bien mediante los bucles estructurales que están naturalmente presentes entre estos dos dominios constantes. Una versión de estas moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención, consta de la región Fc de un anticuerpo con por lo menos una modificación en un bucle estructural de acuerdo con la presente invención. También para las moléculas de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención, se prefiere que los nuevos sitios de unión de antígeno en los bucles estructurales se introduzcan por tecnologías de aleatorización, es decir, intercambiando uno o varios radicales aminoácido del bucle por técnicas de aleatorización o introduciendo insertos generados aleatoriamente en dichos bucles estructurales. De forma alternativa se prefiere el uso de métodos combinatorios.

Una inmunoglobulina modificada puede tener un sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina no modificada e incorporado en uno o varios bucles estructurales. El término “ajeno” significa que el sitio de unión de antígeno no se forma naturalmente mediante la región específica de la inmunoglobulina, y un socio de unión ajeno, pero no el socio de unión natural de una inmunoglobulina, se une por el sitio de unión del antígeno. Esto significa que un socio de unión como un receptor Fc ó un efector del sistema inmune, no se considera ligado por el sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina no modificada.

De preferencia, el antígeno se selecciona del grupo formado por antígenos patógenos, antígenos asociados a un tumor, enzimas, substratos, autoantígenos, moléculas orgánicas o alérgenos. Los antígenos más preferidos se seleccionan del grupo formado por antígenos víricos, antígenos bacterianos o antígenos de patógenos de eucariotas o fagos. Los antígenos virales preferidos incluyen antígenos de los virus HAV, HBV, HCV, HIV I, HIV II, Parvovirus, virus de la gripe, HSV y Hepatitis, Flavivirus, virus del Nilo Occidental, virus Ebola, virus pox, virus de la viruela, virus del sarampión, virus del Herpes, Adenovirus, virus del Papiloma, virus del Polioma, Parvovirus, Rinovirus, virus Cocksackie, virus de la Polio, Ecovirus, virus de la Encefalitis Japonesa, virus del Dengue, virus de la Encefalitis transportado por garrapatas, virus de la fiebre amarilla, Coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza, virus de

La Crosse, virus de Lassa, virus de la Rabia, Rotavirus; los antígenos bacterianos preferidos incluyen antígenos de *Pseudomonas*, *Micobacterias*, *Estafilococos*, *Salmonella*, *Meningococos*, *Borelia*, *Listeria*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Legionella*, *Bacilos*, *Lactobacilos*, *Streptococos*, *Enterococos*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Moraxella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Cardiobacterium*, *Francisella*, *Helicobacter*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Chlamydia*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Micobacterias*, *Treponema*, *Bartonella*. Los antígenos eucarióticos preferidos de eucariotas patógenos incluyen antígenos de *Giardia*, *Toxoplasma*, *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Trichinella*, *Levaduras*, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*.

Las inmunoglobulinas preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden por lo menos dos sitios de unión de antígeno, el primer sitio enlaza a un primer epítipo, el segundo sitio enlaza a un segundo epítipo.

De acuerdo con una versión preferida, la presente inmunoglobulina comprende por lo menos dos regiones del bucle, la primera región del bucle une a un primer epítipo, y la segunda región del bucle liga a un segundo epítipo. Tanto por lo menos la primera como por lo menos la segunda región del bucle o ambas, pueden contener un bucle estructural. Las inmunoglobulinas de acuerdo con la presente invención incluyen fragmentos de las mismas, conocidos en la técnica por ser funcionales los cuales contienen los elementos esenciales de acuerdo con la presente invención: la región bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención.

De preferencia, la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención, está compuesta de por lo menos dos dominios de inmunoglobulina, o una parte de los mismos que incluye un minidominio y cada dominio contiene por lo menos un sitio de unión de antígeno.

Se prefiere también una inmunoglobulina de acuerdo con la invención, la cual comprende por lo menos un dominio de la región constante y/o por lo menos un dominio de la región variable de la inmunoglobulina, o una parte del mismo que incluye un minidominio. De esta manera, un dominio variable que, por ejemplo, se modifica en la región C-terminal o el dominio variable enlazado a una región CH1 modificada, por ejemplo un minidominio CH1 modificado, es una de las versiones preferidas.

La inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención, comprende un dominio que tiene por lo menos un 50% de homología con el dominio no modificado.

El término "homología" indica que los polipéptidos tienen los mismos radicales o radicales conservados en una posición correspondiente en su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término también se extiende a dos o más secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos homólogos. "Dominio de inmunoglobulina homólogo" significa un dominio de inmunoglobulina de acuerdo con la invención, que tiene por lo menos aproximadamente un 50% de identidad de la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia del dominio de inmunoglobulina de la secuencia nativa de longitud completa o cualquier otro fragmento de una secuencia de dominio de inmunoglobulina de longitud completa como se describe aquí. De preferencia, un dominio de inmunoglobulina homólogo tendrá por lo menos aproximadamente un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos, de preferencia por lo menos aproximadamente un 55% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con más preferencia por lo menos aproximadamente un 60% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con más preferencia por lo menos aproximadamente un 65% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con más preferencia por lo menos aproximadamente un 70% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con más preferencia por lo menos aproximadamente un 75% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con más preferencia por lo menos aproximadamente un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con más preferencia por lo menos aproximadamente un 85% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con más preferencia por lo menos aproximadamente un 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos, con más preferencia por lo menos aproximadamente un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una secuencia de dominio de inmunoglobulina nativa, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de dominio de inmunoglobulina de longitud completa como se describe aquí.

"Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de dominio de inmunoglobulina aquí identificadas, se define como el porcentaje de radicales aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los radicales aminoácido en la secuencia de dominio de inmunoglobulina específica, después de alinear la secuencia e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la destreza en la técnica, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles para el público, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Los valores del % de identidad de la secuencia de aminoácidos, se pueden obtener como se describe a continuación, utilizando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* ("Métodos de Enzimología") 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda del WU-BLAST-2 se ajustan a los valores predefinidos. Aquellos valores no ajustados a los valores predefinidos, es decir, los parámetros ajustables, se definen con los valores siguientes: overlap span=1, overlap fraction=0,125, word threshold (T)=11, y scoring matrix=BLOSUM62. Cuando se emplea el WU-BLAST-2, se determina un valor del % de identidad de la secuencia de aminoácidos al dividir (a) el número de radicales aminoácidos idénticos que se corresponden con la secuencia de

aminoácidos del dominio de inmunoglobulina de interés que tiene una secuencia derivada del dominio de inmunoglobulina nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la que se compara el dominio de inmunoglobulina de interés que puede ser el dominio de inmunoglobulina no modificado), como se determina por el WU-BLAST-2 por (b) el número total de radicales aminoácidos de las partes no aleatorizadas del dominio de la inmunoglobulina de interés. Por ejemplo, en la declaración “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene por lo menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos frente a la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del dominio de inmunoglobulina de interés.

En una versión preferida, la inmunoglobulina de acuerdo con la invención es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo de simple cadena biespecífico. Además, se prefiere que la inmunoglobulina comprenda un dominio biespecífico o una parte del mismo que incluya un minidominio.

La inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención, puede emplearse para cualquier propósito conocido en la técnica para inmunoglobulinas, pero también permite aplicaciones que dependen de la combinación de especificidades introducidas por la presente invención. De acuerdo con esto, las inmunoglobulinas según la presente invención se emplean de preferencia para uso terapéutico y preventivo (por ejemplo, como inmunoterapia activa o pasiva); para uso preparativo y analítico y para empleo diagnóstico.

La inmunoglobulina de la invención puede también estar contenida en un kit de socios de unión, el cual contiene

(a) una inmunoglobulina modificada que tiene un sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina incorporada en uno o varios bucles estructurales, y

(b) una molécula de unión que contiene un epítipo de dicho antígeno.

Dicha molécula de unión de este kit de acuerdo con la presente invención, se puede emplear para identificar la especificidad de la unión de la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención. Al utilizar la molécula de unión de este kit de acuerdo con la presente invención, se puede determinar la potencia de las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención.

La potencia como aquí se define, es la propiedad de enlace de la molécula modificada a su antígeno. El enlace puede determinarse cuantitativa y/o cualitativamente en términos de especificidad y/o afinidad y/o avidéz, como se emplea para fines de control de calidad.

Además, la molécula de unión de un kit de acuerdo con la presente invención, puede emplearse para seleccionar la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención, a partir de una biblioteca que consiste en por lo menos 10, de preferencia por lo menos 100, con más preferencia por lo menos 1000, con más preferencia por lo menos 10000, en especial por lo menos 100000 inmunoglobulinas con diferentes modificaciones en los bucles estructurales.

De acuerdo con la presente invención, una de las características clave de la presente invención es que el diseño por ingeniería de los dominios de inmunoglobulina se lleva a cabo en regiones que normalmente no están involucradas en la unión del antígeno, en otras palabras, en regiones distintas de los CDRs de un anticuerpo. Se observó que el pliegue específico de dominios de inmunoglobulina permite la introducción de mutaciones aleatorias en regiones que estructuralmente son análogas a los CDRs pero diferentes en la posición en la secuencia. Las regiones identificadas por la presente invención son, como los CDRs, regiones del bucle que conectan las hebras beta del pliegue de la inmunoglobulina.

Más específicamente, se describe aquí que al introducir mutaciones aleatorias en los bucles que conectan las hebras beta A-B y E-F de un dominio IgG1 CH3 humano, se seleccionaron los dominios CH3 mutados que se unen específicamente a un péptido 9 receptor tipo Toll (TLR-9) ó a una lisozima de huevo de gallina, que son un péptido y una proteína respectivamente que normalmente no son reconocidos y unidos por dominios CH3 humanos de IgG1. Las mutaciones introducidas por nosotros incluyen mutaciones en las que los radicales aminoácidos seleccionados en la secuencia salvaje se reemplazaron por radicales seleccionados aleatoriamente, y también incluyen inserciones de radicales aminoácidos extra en los bucles anteriormente mencionados.

Por analogía, los dominios de inmunoglobulina de cualquier clase de inmunoglobulinas y de inmunoglobulinas de cualquier especie son susceptibles a este tipo de ingeniería. Además, no sólo se pueden manipular los bucles específicos objetivo de la presente invención, sino que cualquier bucle que conecta hebras beta en dominios de inmunoglobulina puede ser manipulado de la misma forma.

Los dominios de inmunoglobulina diseñados por ingeniería a partir de cualquier organismo y de cualquier tipo de inmunoglobulina, pueden emplearse de acuerdo con la presente invención ya sea como tales (como dominios simples), o como parte de una molécula más grande. Por ejemplo, pueden ser parte de una inmunoglobulina intacta, que de acuerdo con esto tendrá su región de unión de antígeno “normal” formada por los 6 CDRs y la nueva región de unión de antígeno diseñada. De la misma manera, se puede generar una inmunoglobulina multiespecífica, por ejemplo

ES 2 323 651 T3

biespecífica. Los dominios de inmunoglobulina diseñados por ingeniería también pueden formar parte de cualquier proteína de fusión. El empleo de estos dominios de inmunoglobulina diseñados por ingeniería forma parte del campo general de empleo de las inmunoglobulinas.

5 Los dominios de las siguientes inmunoglobulinas se entienden aquí como dominios de inmunoglobulina:

para IgG, IgD e IgA: VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3

10 para IgM e IgE: VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3, CH4

1. Dominios de inmunoglobulina sencillos aleatorizados en un lado, es decir, ya sea en bucles que conectan hebras beta B-C, D-E ó F-G (la “punta”, con la excepción de dominios variables que están cubiertos por muchas patentes) o
15 hebras beta A-B, C-D, (C-C’ y C’’-D en el caso de dominios variables) ó E-F (el “fondo”). Se pueden aleatorizar los bucles sencillos o cualquier combinación de bucles. Pueden cambiarse, eliminarse o insertarse radicales adicionales.

2. Dominios de inmunoglobulina sencillos aleatorizados en ambos lados, la punta y el fondo.

20 3. Cualquier proteína que contiene uno de los dominios sencillos aleatorizados, tales como:

a) dímeros de “CH3 de cadena sencilla” (scCH3), scCH2, scCH1/CL, aleatorizados en uno o ambos lados

25 b) Fv de cadena sencilla aleatorizado en el “fondo”, es decir, en el lado opuesto a los CDRs

c) fragmentos Fab aleatorizados en el “fondo”, es decir, en el extremo C-terminal del dominos CH1 y del CL

d) fragmentos Fc (es decir, proteínas que consisten en CH2-CH3) aleatorizadas en uno o ambos lados

30 e) inmunoglobulinas completas aleatorizadas en el fondo de Fc

f) otros dominios adecuados

35 Las ventajas primarias de los dominios sencillos: son muy similares a todos los argumentos que se utilizan para estimular las moléculas VH de camello (“nanocuerpos”, ver www.ablynx.com). Los dominios de inmunoglobulina aleatorizados son proteínas muy pequeñas (peso molecular aproximado 12-15 kDa, dependiendo del número de radicales aminoácidos insertados) y por tanto tendrán las siguientes ventajas en comparación con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos convencionales tales como scFv y Fabs: reconocer epítomos no comunes u ocultos, unirse
40 en cavidades o sitios activos de dianas de proteína, facilidad de fabricación, y muchos otros. En el caso de un dominio de inmunoglobulina que está aleatorizado en ambos lados, puede generarse una molécula bivalente o biespecífica. Las ventajas principales de los dominios sencillos como parte de proteínas de fusión son las propiedades de enlace adicionales que pueden diseñarse por ingeniería en cualquier otra proteína.

45 Se contempla que cualquier sistema de expresión pueda emplearse para obtener proteínas. Una analogía con los dominios sencillos como se describen aquí, se puede encontrar en los anticuerpos del camello, que sólo tienen un VH pero ningún VL. En estas proteínas, sólo 3 CDRs (en lugar de 6 como en los anticuerpos “normales” son responsables de la unión de antígeno).

50 Las siguientes referencias de patentes se incorporan a la presente como referencia, incluyéndolas en su totalidad:

Patente U.S. 6.294.654 Modified immunoglobulin molecule incorporating an antigen in a non-CDR loop region (“Molécula de inmunoglobulina que incorpora un antígeno en una región bucle no-CDR”)

55 Patente U.S. 5.844.094 Target binding polypeptide (“Unión de un polipéptido a una diana”)

Patente U.S. 5.395.750 Methods for producing proteins which bind to predetermined antigens (“Métodos para la producción de proteínas que se unen a antígenos predeterminados”)

60 Patente U.S. 2004/0071690 High avidity polyvalent and polyspecific reagents (“Reactivos polivalentes y poliespecíficos de alta avidez”)

Patente U.S. 2004/0018508 Surrogate antibodies and methods of preparation and use thereof (“Anticuerpos sustitutos y métodos de preparación y empleo de los mismos”)

65 Patente U.S. 2003/0157091 Multifunctional proteins (“Proteínas multifuncionales”)

Patente U.S. 2003/0148372 Method to screen phage display libraries with different ligands (“Método para cribar bibliotecas que muestran fagos, con diferentes ligandos”)

Patente U.S. 2002/0103345 Bispecific immunoglobulin-like antigen binding proteins and method of production (“Proteínas que se unen a antígenos tipo inmunoglobulinas biespecíficas, y método de producción”)

Patente U.S. 2004/0097711 Immunoglobulin superfamily proteins (“Proteínas de una superfamilia de inmunoglobulinas”)

Patente U.S. 2004/0082508 Secreted proteins (“Proteínas de secreción”)

Patente U.S. 2004/0063924 Secreted proteins (“Proteínas de secreción”)

Patente U.S. 2004/0043424 Immunoglobulin superfamily proteins (“Proteínas de una superfamilia de inmunoglobulinas”)

Patente U.S. 5.892.019 Production of a single-gene-encoded immunoglobulin (“Producción de una inmunoglobulina codificada por un gen único”)

Patente U.S. 5.844.094 Target binding polypeptide (“Polipéptido de unión a una diana”)

La presente invención se ilustra además con las siguientes figuras y ejemplos, sin estar limitada por los mismos.

La Figura 1a muestra la estructura de una IgG1 intacta. Los dominios se indican con flechas.

La Figura 1b ilustra la organización estructural de los monómeros principales del isotipo de la inmunoglobulina humana. Los enlaces disulfuro se muestran como líneas, los grupos hidratos de carbono N-enlazados se muestran como círculos.

La Figura 2 muestra el pliegue de la inmunoglobulina para un dominio constante (izquierdo) y uno variable (derecho) de una inmunoglobulina. Las hebras beta se indican mediante flechas.

La Figura 3 muestra un modelo molecular del dominio diseñado por ingeniería CH3, de acuerdo con la presente invención, con la parte aleatorizada indicada por una superficie accesible a solvente. La superficie está en un círculo.

La Figura 4 muestra una presentación esquemática de los PCRs utilizados para la producción de los fragmentos empleados para el ensamblaje del dominio CH3 mutado. Los cebadores PCR se indican mediante flechas con su orientación 5'-3' respectiva, y las líneas verticales indican las posiciones aproximadas de los sitios de restricción introducidos que se emplearon para el ensamblaje del gen mutado. Los siguientes sitios de restricción están contenidos en los cebadores para las ligaciones de los fragmentos PCR: CH3LNCO: NcoI; CH3LSAC y CH3CSAC: SacI; CH3CHIN y CH3RHIN: HindIII; CH3RNOT: NotI.

La Figura 5 muestra algunos ejemplos de cómo pueden utilizarse los dominios de la inmunoglobulina de la presente solicitud. Las regiones aleatorizadas se indican mediante un símbolo de estrella. Las especificidades de las regiones aleatorizadas en una molécula pueden ser idénticas o diferentes.

La Figura 6 muestra una presentación esquemática del diseño del dominio CH3 biespecífico de ingeniería. Los nombres de los cebadores se dan en casillas y las flechas indican la dirección en la que se alargan los cebadores. Las casillas con líneas inclinadas indican las posiciones relativas de las regiones que se aleatorizan en esta construcción, las casillas con líneas verticales indican las posiciones relativas de las regiones que se introdujeron para la generación del clon C24, y se indican los sitios de restricción empleados para el procedimiento de clonación.

La Figura 7 muestra una presentación esquemática del diseño del dominio CH3 biespecífico diseñado por ingeniería. La secuencia de nucleótidos y su traducción se muestra en el diseño básico del dominio CH3 biespecífico diseñado. Las secuencias rojas indican regiones aleatorizadas a fin de generar la construcción biespecífica, mientras que las casillas verdes indican regiones en las que la secuencia se aleatorizó a fin de generar el clon C24.

La Figura 8 muestra el listado de secuencias de las secuencias aquí descritas.

Descripción de ejemplos específicos

Ejemplo 1

Construcción de la biblioteca de CH3 y expresión en la superficie de fago

La estructura cristalina de un fragmento IgG1 Fc, que se publica en la Base de Datos Brookhaven como entrada 1OQO.pdb, se empleó para ayudar en el diseño del dominio CH3 mutado.

La secuencia que se utiliza como base para la construcción de la biblioteca CH3 se indica en la SEQ ID N° 1. En esta secuencia, el primer aminoácido corresponde a Prolina 343 de la cadena A de la entrada loqo.pdb de la base de datos Brookhaven. El último radical contenido en loqo.pdb es Serina 102 de la SEQ ID N° 1. Después del análisis detallado de la estructura de loqo.pdb y mediante la inspección visual de los radicales que forman los bucles que conectan las hebras beta, se decidió aleatorizar los radicales 17, 18 y 19, que son parte del bucle que conecta la hebra A-B así como 71, 72, 73, 76 y 77, que son parte del bucle que conecta a la hebra beta E-F de SEQ ID N° 1. Un modelo molecular del dominio CH3 diseñado, con la parte aleatorizada indicada por una superficie accesible a solvente se muestra en la Figura 3. El gen diseñado se produjo mediante una serie de reacciones PCR seguidas por ligación de los productos PCR resultantes. Para facilitar la ligación, algunos de los codones de la secuencia de nucleótidos que codifica para SEQ ID N° 1 se modificaron para producir sitios de restricción sin cambiar las secuencias de aminoácidos (mutaciones silenciosas). Para la inserción en el vector de clonación pHEN1 (Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19 (15):4133-7. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains ("Proteínas de multi-subunidades sobre la superficie del fago filamentoso: metodologías para mostrar las cadenas pesada y ligera del anticuerpo (Fab)"). Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G.) en cuadro con la señal de secreción peIB, los radicales nucleótidos extra que codifican Met-Ala se conectaron en el extremo 5' de la secuencia para crear un sitio de restricción NcoI. Para los radicales aleatorizados, se eligió el codon NNS (código IUPAC, donde S significa C ó G) que codifica todos los 20 aminoácidos de origen natural, pero se evitan 2 de 3 codones de parada. La secuencia diseñada por ingeniería se indica como una secuencia de nucleótidos en SEQ ID N° 2 y como una secuencia de aminoácidos en SEQ ID N° 3. La letra X en SEQ ID N° 3 representa radicales aminoácidos aleatorizados. Las secuencias de los cebadores PCR utilizados para el ensamblaje del dominio CH3 mutado se indican en SEQ ID N° 4 a 9. La Figura 4 muestra una presentación esquemática de los fragmentos PCR generados para el ensamblaje del gen mutado y los cebadores empleados para eso.

El ADNc de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3D6 (Felgenhauer M. Kohl J. Rüker F., Nucleotide sequences of the cD-NAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1-gp41 ("Secuencias de nucleótidos de los cD-Nas que codifican las regiones V de las cadenas H y L de un anticuerpo monoclonal humano específico para el HIV-1-gp41"). Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25; 18(16):4927), se usó como molde para las reacciones PCR. Los 3 productos PCR se digirieron con SacI y/o HindIII respectivamente y ligaron en conjunto. El producto de ligación se digirió adicionalmente con NcoI y NotI y se ligó en el vector fágico pHEN1 de expresión de superficie, que previamente se digirió con NcoI y NotI. Un número de clones seleccionados se controló por análisis de restricción y por secuenciado del ADN y se encontró que contienen el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas insertadas de forma correcta. Para las siguientes etapas de preparación del fago se siguieron protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transformó en células TGI de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, las partículas del fago se rescataron de células TG1 de *E. coli* con el fago M13-KO7 auxiliar. Después, las partículas del fago se precipitaron a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disolvieron en agua y se usaron para la selección por ciclos o, de forma alternativa, se almacenaron a menos 80°C.

Ejemplo 2

Construcción de la biblioteca CH3+3

Esta biblioteca se construyó y clonó de la misma forma que la biblioteca CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción está indicada en SEQ ID N° 10, la secuencia de nucleótidos correspondiente en SEQ ID N° 11, y los cebadores empleados para la construcción fueron SEQ ID N° 4-7, SEQ ID N° 9 y SEQ ID N° 12.

Ejemplo 3

Construcción de la biblioteca CH3+5

Esta biblioteca se construyó y clonó de la misma forma que la biblioteca CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción se indica en SEQ ID N° 13, la secuencia de nucleótidos correspondiente en SEQ ID N° 14, y los cebadores empleados para la construcción fueron SEQ ID N° 4-7, SEQ ID N° 9 y SEQ ID N° 15.

Ejemplo 4

Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3 en el péptido TLR-9

Se realizaron 3 rondas de selección por ciclo de adsorción-desorción de acuerdo con protocolos estándar. Brevemente, se aplicó el siguiente método. Se recubrieron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) con un péptido sintético que representa parte de la secuencia del receptor 9 tipo Toll (TLR-9). Se agregaron 200 µl por pocillo de la siguiente solución: tampón de carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, con las siguientes concentraciones de péptido disuelto:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml de péptido TLR-9

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 500 µg/ml de péptido TLR-9

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 100 µg/ml de péptido TLR-9

ES 2 323 651 T3

Se realizó la incubación durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200 μ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, la biblioteca de fagos de expresión en superficie se dejó reaccionar con el péptido unido por adición de 100 μ l de suspensión del fago y 100 μ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue. Después de la primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300 μ l de T-PBS, 5 x 300 μ l de PBS; después de la segunda selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300 μ l de T-PBS, 10 x 300 μ l de PBS; después de la tercera selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 20 x 300 μ l de PBS.

La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200 μ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó la suspensión del fago mediante adición de 60 μ l de base Tris 2M, seguida de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se plaquearon en medio TYE con glucosa al 1% y 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron a 30°C durante la noche.

TABLA 1

Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3 en el péptido TLR-9 (títulos de fago)

Ronda de selección por adsorción-desorción	Concentración de TLR-9 por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fagos/ml)	Salida (fagos/ml)
1°	1 mg/ml	6×10^{18}	2×10^{10}
2°	0,5 mg/ml	4×10^{18}	2×10^{10}
3°	0,1 mg/ml	4×10^{22}	6×10^{10}

Ejemplo 5

Clonación de clones seleccionados de mutantes CH3 seleccionados contra TLR-9 para expresión soluble

El ADN fágmido del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica regiones CH3 mutadas se amplificó por lotes mediante PCR y se clonó NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células *E. coli* LMG194 (Invitrogen) con electroporación, y se crecieron a 30°C en medio TYE con 1% de glucosa y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200 μ l de medio 2xYT con ampicilina, se desarrollaron durante la noche a 30°C, y se indujeron por adición de L-arabinosa hasta una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células de recolectaron por centrifugación y se trataron con 100 μ l de tampón de borato de sodio, pH 8,0 a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. Se emplearon 50 μ l de extractos periplásmicos en el análisis ELISA (ver más adelante).

ES 2 323 651 T3

Ejemplo 6

Análisis ELISA de mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9. Los clones seleccionados se ensayaron para detectar la unión específica al péptido TLR-9 mediante el análisis ELISA

Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorp), 100 μ l por pocillo, 20 μ g de péptido TLR-9/ml de tampón de carbonato 0,1 M pH 9,6, 1 hora a 37°C

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 hora a temperatura ambiente

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Unión de extractos periplásmicos: 50 μ l de extracto periplásmico, 50 μ l de BSA-PBS al 2%, a temperatura ambiente durante la noche.

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Segundo anticuerpo: cabra antiratón*HRP (SIGMA), 1:1000 en BSA-PES al 1%, 90 min a TA, 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Detección: 3 mg/ml de OPD en tampón citrato/fosfato de Na, pH 4,5, 0,4 μ l H₂O₂ al 30%

Parada: 100 ml de H₂SO₄ 3M

Absorbancia lectura: 492/620 nm

Los clones que dieron señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones descritas anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 del volumen de cultivo como se ha descrito anteriormente y se ensayaron con ELISA (como se ha descrito más arriba), para confirmación.

TABLA 2

Resultados del ELISA de confirmación

	Con antígeno	Sin antígeno
Clon	A _{492/620} 4 lecturas	A _{492/620} 1 lectura
A67	0,0435	0,019
B54	0,0937	0,051
C67	0,0295	0,013
Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo): 0,0115		

ES 2 323 651 T3

Ejemplo 7

Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3 y CH3+5 en lisozima de huevo de gallina

Se realizaron 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción. Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxi-sorp (Nunc) con lisozima de huevo de gallina, por adición de 200 μ l de la siguiente solución por pocillo:

PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml HEL

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200 μ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, se dejó que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccionara con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100 μ l de suspensión de fago y 100 μ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 5 x 300 μ l de PBS.

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300 μ l de T-PBS, 10 x 300 μ l de PBS.

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 20 x 300 μ l de PBS.

La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200 μ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60 μ l de base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se plaquearon en medio TYE con glucosa al 1% y 100 μ g/ml de ampicilina, y se incubaron a 30°C durante la noche.

TABLA 3

Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3 en lisozima de huevo de gallina (títulos de fago)

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Concentración de HEL por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fago/ml)	Salida (fago/ml)
1°	2 mg/ml		$4,7 \times 10^{10}$
2°	1 mg/ml	$1,29 \times 10^{22}$	$8,0 \times 10^9$
3°	1 mg/ml	$5,71 \times 10^{20}$	$4,8 \times 10^{10}$

ES 2 323 651 T3

TABLA 4

Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3+5 en lisozima de huevo de gallina (HEL) (títulos de fago)

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Concentración de HEL por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fago/ml)	Salida (fago/ml)
1°	2 mg/ml	$8,3 \times 10^{16}$	$2,9 \times 10^9$
2°	1 mg/ml	$2,1 \times 10^{19}$	$2,6 \times 10^9$
3°	1 mg/ml	$5,4 \times 10^{19}$	$1,2 \times 10^{10}$

Ejemplo 8

Clonación de los clones seleccionados del ejemplo 7 para expresión soluble

La clonación de los clones seleccionados para la expresión soluble se realizó como se ha descrito anteriormente para los mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9.

Ejemplo 9

Expresión soluble de los clones seleccionados del ejemplo 7

La expresión soluble de los clones seleccionados se realizó como se ha descrito anteriormente para los mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9. Los extractos periplásmicos se ensayaron en un análisis ELISA preliminar (para el protocolo, ver ejemplo 10).

Los clones que dieron una señal alta en este primer análisis ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones descritas anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 de volumen de cultivo como se ha descrito anteriormente y se ensayaron con un análisis ELISA (como se describe en el ejemplo 10) para confirmación.

Ejemplo 10

Análisis ELISA de mutantes CH3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC. Maxisorp), 100 μ l por pocillo, 100 μ g de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS 1 hora a 37°C.

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 hora a TA

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Unión de extractos periplásmicos: 50 μ l de extracto periplásmico 50 μ l de BSA-PBS al 2% a temperatura ambiente durante la noche

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

ES 2 323 651 T3

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

5

Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón*HRP(SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

10

Detección: 3 mg/ml OPD en tampón citrato/fosfato Na. pH 4,5, 0,4 μ l de H₂O₂ al 30%

Parada: 100 ml de H₂SO₄ 3M

15

Absorbancia, lectura: 492/620 nm

TABLA 5

20

Resultados del análisis ELISA de confirmación de mutantes de C_H3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

25

	Con antígeno	Sin antígeno
Clon	A _{492/620} 4 lecturas	A _{492/620} 1 lectura
B12	0,396	0,012
D10	0,415	0,026
D46	0,398	0,011
Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo): 0,1763		

40

TABLA 6

45

Resultados de ELISA de confirmación con diluciones de antígeno de mutantes de C_H3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

50

C (μ g/ml)	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,55	0,78	0,39
clon										
B12	0,707	0,532	0,432	0,297	0,192	0,150	0,148	0,049	0,034	0,015
D46	0,713	0,561	0,342	0,220	0,133	0,088	0,047	0,032	0,021	0,010
D10	0,715	0,685	0,571	0,368	0,231	0,175	0,171	0,068	0,047	0,026
-(nc)	0,449	0,360	0,165	0,072	0,038	0,023	0,017	0,013	0,009	0,007
nc: sin extracto periplásmico añadido										

65

ES 2 323 651 T3

Se observa que la lisozima de huevo de gallina reacciona con el anticuerpo anti-his₄, por lo que se observa un fondo relativamente alto.

TABLA 7

Resultados del análisis ELISA de confirmación de mutantes of C_H3+5 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

	Con antígeno	Sin antígeno
Clon	A 492/620 4 lecturas	A 492/620 1 lectura
A13	0,197	0,016
A66	0,461	0,019
B18	0,533 (5 lecturas)	No realizado
B20	0,184	0,016
B68	0,535	0,019
B40	0,706	0,051
C24	0,352	0,072
D22	0,147	0,019
C22	0,439	0,017
D37	0,360	0,026
D40	0,559	0,034
D56	0,369	0,019
Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo): 0,1334		
Nota: La lisozima de huevo de gallina reacciona con el anticuerpo anti-his ₄ , por lo que se observa un fondo relativamente alto.		

Ejemplo 11

Biblioteca de CL

La inspección visual de la estructura cristalina de un fragmento de Fab (se emplea la estructura del Fab del anticuerpo monoclonal humano 3D6: RSCB Protein Data Bank ("Banco de Datos de Proteínas")(http://www.rcsb.org/pdb/), entrada 1DFB.PDB (He XM, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Aug 1;89(15):7154-8) y el análisis asistido por ordenador (por ejemplo, para este propósito se emplea el programa Protein Explorer(http://molvis.sdsc.edu/protexpl/frntdoor.htm)) de la estructura secundaria y terciaria de esta proteína) permite identificar residuos localizados en regio-

nes del bucle que conectan las hebras beta de la plantilla del dominio CL. Estos residuos comprenden los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117 y los aminoácidos 123 a 126 (numeración de acuerdo con el sistema de numeración IMGT (Lefranc MP, *et al.*, Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1;33 (Database issue):0593-7; Lefranc MP, *et al.*, Dev Comp Immunol. 2005; 29(3):185-203)).

Más específicamente, los residuos 11, 12, 14-18, y 92-95 se aleatorizan dentro del dominio CL humano (SEQ ID N° 48). La aleatorización se logra por amplificación PCR de las secuencias de codificación con cebadores PCR en que las posiciones de los codones relevantes se codifican por la secuencia de nucleótidos 5'-NNS-3', que potencialmente codifican todos los 20 aminoácidos, evitando 2 de los 3 codones de parada. El inserto de la biblioteca se amplifica mediante dos reacciones PCR separadas y los dos fragmentos PCR se ligan en conjunto mediante un sitio de restricción HpyCH4IV que se introduce como mutación silenciosa mediante los cebadores PCR. Además, los cebadores proporcionan los sitios de restricción de endonucleasa NcoI y NotI respectivamente para clonar en el vector de expresión de fago pHEN (Hoogenboom HR, *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19(15):4133-7). La cisteína C-terminal del dominio CL no se incluye para la expresión de fago, pero puede agregarse posteriormente cuando se utiliza un clon CL modificado, por ejemplo para la construcción de un fragmento Fab.

Como molde para la amplificación PCR, se usa un plásmido pRcCMV-3D6LC (Rüker F. *et al.*, Ann N Y Acad Sci. 1991 Dec 27; 646:212-9), que contiene como inserto la cadena ligera completa del anticuerpo monoclonal humano.

Para las bibliotecas CL+3 (SEQ ID N° 50, 51) y CL+5 (SEQ ID N° 52, 53), que contienen residuos adicionales insertados entre las posiciones 92 y 95 del dominio CL, se emplean los cebadores CLRHPY3 y CLRHPY5 respectivamente en lugar del cebador CLRHPY.

A continuación se muestra la secuencia (SEQ ID N° 48, 49), ó sea la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del producto final del PCR y las ligaciones, clonada en el sitio NcoI de pHEN1, que conduce a la unión de una secuencia líder pelB con el extremo N de la construcción:

30 **+3 M K Y L L P T' A A A G L L L L A A**
 1 ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC

35 **NcoI**
 +3 Q P A M A V A A P S V F I F P P
 40 **51 CCAGCCGGCC ATGGCCGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT**

45 **+3 S Q A S V V C L L N**
 101 CTNNSNNSCA GNNSNNSNNS NNSNNSGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT

50 **+3 N F Y P R E A K V Q W K V D N A L**
 151 AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT

55 **+3 Q S G N S Q E S V T E Q D S K D**
 201 CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTCAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA

60 **HpyCH4IV**
 +3 S T Y S L S S T L T L Y E
 65 **251 GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGT TGNNSNNSNN SNNSTACGAG**

ES 2 323 651 T3

+3 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
301 AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC

NotI

+3 V T K S F N R G E A A A
351 CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGGC GGCCGCA

Lista de cebadores para la biblioteca CL

cllnco: 5'-cttaccatgg ccgtggctgc accatctgtc ttcattctcc
cgccatctnn snnscagnns nnsnnsnnsn nsgcctctgt tgtgtgc-3' (SEQ
ID N° 56)

cllhpy: 5'-tgacaacgtc aggggtgctgc tgaggc-3' (SEQ ID N° 57)

clrhpy: 5'-tcagaacggt gnnnsnnsns nstacgaga aacacaaagt c-3' (SEQ ID N° 58)

clrhpy3: 5'-tcagaacggt gnnnsnnsns nnsnnsnnsn
nstacgagaa acacaaagtc-3' (SEQ ID N° 59)

clrhpy5: 5'-tcagaacggt gnnnsnnsns nnsnnsnnsn nsnnnsnnsta
cgagaaacac aaagtc-3' (SEQ ID N° 60)

clrnot: 5'-catcgcggcc gcctctcccc tgttgaagct c-3' (SEQ ID N° 61)

Mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN se controla que un número de clones seleccionados de la biblioteca (dominios CL mutados clonados en el vector fágido pHEN1) contengan el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas correctamente insertadas. Para los siguientes pasos de preparación del fago, se siguen protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transforma en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, se rescatan partículas fago de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. A continuación, las partículas de fago se precipitan a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disuelven en agua y se utilizan para la selección por ciclos de adsorción-desorción o, de forma alternativa, se pueden almacenar a menos 80°C.

Ejemplo 12

Biblioteca de CH1

La inspección visual de la estructura cristalina de un fragmento Fab (se usa la estructura del Fab del anticuerpo monoclonal humano 3D6: RSCB Protein Data Bank Entry 1DFB.PDB) y el análisis asistido por ordenador (se utiliza Protein Explorer para este propósito) de la estructura secundaria y terciaria de esta proteína permite identificar radicales ubicados en regiones del bucle que conectan las hebras beta de la estructura del dominio CH1. Estos radicales comprenden los aminoácidos 7 al 21, los aminoácidos 25 al 39, los aminoácidos 41 al 81, los aminoácidos 83 al 85, los aminoácidos 89 al 103 y los aminoácidos 106 al 117 (numeración de acuerdo con el sistema de numeración IMGT).

ES 2 323 651 T3

Más específicamente, los radicales 12-19 y 93-100 se aleatorizan dentro del dominio CH1 humano (SEQ ID N° 54, 55). La aleatorización se logra mediante amplificación PCR de las secuencias de codificación con cebadores PCR en los cuales las posiciones de los codones relevantes se codifican por la secuencia de nucleótidos 5'-NNS-3', que codifica potencialmente todos los 20 aminoácidos, evitando 2 de los 3 codones de interrupción. El inserto de la biblioteca se amplifica mediante dos reacciones PCR separadas y los dos fragmentos PCR se ligan juntamente mediante un sitio de restricción BstEII que aparece de forma natural en el dominio CH1. Los cebadores proporcionan además los sitios de restricción de endonucleasa NcoI y NotI respectivamente para la clonación en el vector de expresión del fago pHEN. La cisteína C-terminal del dominio CH1 no se incluye para la expresión del fago pero puede agregarse posteriormente cuando se utiliza un clon CH1 modificado, por ejemplo, para la construcción de un fragmento Fab.

Como molde para la amplificación PCR, se emplea un plásmido como por ejemplo, el pRcCMV-3D6HC, el cual contiene como inserto la cadena pesada completa del anticuerpo monoclonal humano.

A continuación se muestra (SEQ. ID N° 54, 55) la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del producto final de los PCRs y ligaciones, clonada en el sitio NcoI de pHEN1, que lleva a la unión de una secuencia líder pelB con el extremo N de la construcción:

+3 M K Y L L P T A A A G L L L L A A

1 ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC

NcoI

+3 Q P A M A A S T K G P S V F P L

51 CCAGCCGGCC ATGGCCGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG

+3 A P S S A L G C L

101 CACCCTCCTC CNNSNNSNNS NNSNNSNNSN NSNNSGCCCT GGGCTGCCTG

+3 V K D Y F P E P V T V S W N S G A

151 GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC

+3 L T S G V H T F P A V L Q S S G

201 CCTGACCAGC GGC GTGCACA CCTTCCCGGC TGTCCTACAG TCCTCAGGAC

BstEII

+3 L Y S L S S V V T V P

251 TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCNNSNNSNN SNNSNNSNNS

+3 T Y I C N V N H K P S N T K V D

301 NNSACCTACA TCTGCAACGT GAATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA

NotI

+3 K K V E P K S A A A

351 CAAGAAAGTT GAGCCCAAAT CTGCGGCCGC A

ES 2 323 651 T3

Lista de cebadores para la biblioteca CH1

CH1LNCO: 5'-acgtccatgg cgcctccac caagggccca

tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn
sgccctgggc tgcctggtc-3' (SEQ ID N° 62)

CH1LBST: 5'-ggcacggtca ccacgtgct gag-3' (SEQ ID N° 63)

CHIRBST: 5'-agcgtggtga cgtgcccnn snnsnnsnns nnsnnsnnsa

cctacatctg caacgtgaat c-3' (SEQ ID N° 64)

CHIRNOT: 5'-catagcggcc gcagatttgg gctcaacttt cttgtc-3' (SEQ ID N° 65)

Mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN se controla que un número de clones seleccionados de la biblioteca (dominios CH1 mutados clonados en el vector fágmido pHEN1) contengan el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas correctamente insertadas. Para los siguientes pasos de preparación del fago, se siguen protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transforma en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, se rescatan partículas fago de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. A continuación, las partículas de fago se precipitan a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 pasos, se disuelven en agua y se utilizan para la selección por ciclos de adsorción-desorción o, de forma alternativa, se pueden almacenar a menos 80°C.

Ejemplo 13

Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca del fago-CH1 en lisozima de huevo de gallina (HEL)

Se realizan 3 rondas de selección de ciclos de adsorción-desorción con la biblioteca del fago-CH1 (ver ejemplo 12). Placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) se recubren con lisozima de huevo de gallina, añadiendo 200 μ l de la siguiente solución por pocillo: PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml de HEL

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml de HEL

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml de HEL

La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C. seguida por un bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200 μ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, se deja que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccione con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100 μ l de suspensión de fago y 100 μ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300 μ l de T-PBS, 5 x 300 μ l de PBS.

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300 μ l de T-PBS, 10 x 300 μ l de PBS.

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 20 x 300 μ l de PBS.

ES 2 323 651 T3

La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200 μ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60 μ l de Base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se plaquearon en medio TYE con glucosa al 1% y 100 μ g/ml de ampicilina, y se incubaron a 30°C durante la noche.

Clonación de clones seleccionados de los mutantes CH1 seleccionados frente a lisozima para expresión soluble

El ADN fágmido del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica los dominios CH1 mutados, se amplifica por lotes por PCR y se clona NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación y se desarrollaron a 30°C en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200 μ l de medio 2xYT con ampicilina, se desarrollaron durante la noche a 30°C y se indujeron por adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células se recolectaron por centrifugación y se trataron con 100 μ l de tampón de borato Na, pH 8,0, a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. 50 μ l de los extractos periplásmicos se emplearon en el análisis ELISA.

Los clones que dan una señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivan en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describen anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aíslan en 1/20 del volumen de cultivo como se describió anteriormente y se ensayan con un análisis ELISA (como se describe a continuación) para confirmación.

Análisis ELISA de mutantes de CH1 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

Recubrimiento a 37°C: placa de microtitulación (NUNC, Maxisorp), 100 μ l por pocillo, 100 μ g de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS, 1 hora a 37°C

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a TA

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Unión del extracto periplásmico: 50 μ l de extracto periplásmico 50 μ l de BSA-PBS al 2%, a temperatura ambiente durante la noche

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Primer anticuerpo: anti-His₄ (Qiagen). 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA. 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón*HRP(SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Detección del pH: 3 mg/ml de OPD en tampón citrato/fosfato de Na, pH 4,5, 0,4 μ l de H₂O₂ al 30%

Parada: 100 ml de H₂SO₄ 3M

Lectura de la absorbancia: 492/620 nm

Los clones se interpretan como positivos cuando su señal ELISA es por lo menos tres veces la de la señal de fondo.

ES 2 323 651 T3

Ejemplo 14

Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fago-CL en lisozima de huevo de gallina (HEL)

- 5 Se realizan 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción con la biblioteca de fago-CL (ver ejemplo 11). Se recubren placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) con lisozima de huevo de gallina, añadiendo 200 μ l de la solución siguiente por pocillo: PBS, con las concentraciones siguientes de lisozima de huevo de gallina:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml de HEL

10

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml de HEL

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml de HEL

15

La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200 μ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

- 20 A continuación, se deja que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccione con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100 μ l de suspensión de fago y 100 μ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

25

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300 μ l de T-PBS, 5 x 300 μ l de PBS

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300 μ l de T-PBS, 10 x 300 μ l de PBS

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 20 x 300 μ l de PBS

30

- 35 La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200 μ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60 μ l de Base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* mediante la mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron a 30°C durante la noche.

- 40 *Clonación de clones seleccionados de mutantes CL seleccionados frente a lisozima para expresión soluble*

- El ADN fágico del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción, se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica los dominios CL mutados se amplifica por lotes por PCR y se clona NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación y se desarrollaron a 30°C en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200 μ l de medio 2xYT con ampicilina, se desarrollaron durante la noche a 30°C y se indujeron por adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células se recolectaron por centrifugación y se trataron con 100 μ l de tampón borato Na, pH 8,0, a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. 50 μ l de los extractos periplásmicos se emplearon en el análisis ELISA.

- 55 Los clones que dan una señal alta en este primer análisis ELISA preliminar se cultivan en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aíslan en 1/20 del volumen de cultivo como se describió anteriormente y se ensayan con un análisis ELISA (como se describe a continuación) para confirmación.

Análisis ELISA de mutantes CL seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

60

Recubrimiento: placa de micro titulación (NUNC, Maxisorp). 100 μ l por pocillo, 100 μ g de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS, 1 hora a 37°C

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

65

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 hora a TA

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

ES 2 323 651 T3

Unión del extracto periplásmico: 50 μ l de extracto periplásmico 50 μ l de BSA-PBS al 2%, a temperatura ambiente durante la noche

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Primer anticuerpo: anti-His₄ (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón*HRP(SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Detección: 3 mg/ml OPD en tampón citrato/fosfato Na, pH 4,5, 0,4 μ l de H₂O₂ al 30%

Parada: 100 ml de H₂SO₄ 3M

Lectura de la absorbancia: 492/620 nm

Los clones se interpretan como positivos cuando su señal ELISA es por lo menos tres veces la de la señal de fondo.

Ejemplo 15

La construcción de un dominio inmunoglobulina que se aleatoriza en ambos lados (dominio C_H3 biespecífico de diseño)

Este ejemplo describe un dominio de inmunoglobulina de diseño con dos especificidades de enlace.

El diseño de este dominio de inmunoglobulina de diseño comprende la siguiente estrategia:

* se emplea como punto de partida, un dominio C_H3 de diseño, por ingeniería, el clon C24 (ver ejemplo 10), derivado de la biblioteca C_H3+5 que se une específicamente a la lisozima como punto de partida

* los residuos que se tienen que aleatorizar se identificaron en este dominio CH3 modificado, conectando hebras β del pliegue de la inmunoglobulina y disponiéndose en el lado opuesto del dominio comparado con los radicales que se mutaron al generar el clon C24.

* se diseñaron los cebadores PCR que permiten la aleatorización de estos radicales y la síntesis de este dominio de inmunoglobulina de diseño en un procedimiento similar al descrito anteriormente para las bibliotecas de C_H3, C_H3+3 y la C_H3+5.

Se ligaron 4 productos PCR que contienen posiciones aleatorizadas y se amplificaron insertos de longitud completa por PCR. Posteriormente, se clonaron en pHEN-1 mediante sitios NcoI-NotI y transformaron en células TG-1 de *E. coli* para construir una biblioteca de aproximadamente 10⁸ colonias. Se secuenciaron 20 colonias seleccionadas aleatoriamente y se encontró que las posiciones aleatorizadas mutaron independientemente. Tampoco se observó la secuencia "salvaje" (C24). La biblioteca del fago se generó siguiendo protocolos estándar, y se logró un título de fago de 6,32 x 10¹⁰ TU/ml.

Con el fin de probar la biespecificidad, se eligió eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) como segundo antígeno, mientras que se espera que la construcción retenga su especificidad diseñada originalmente para la lisozima de huevo de gallina. El fago reactivo a rhEPO se seleccionó en 4 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción. A fin de conservar la población de clones C24 que después de la mutagénesis todavía se unen a lisozima de huevo de gallina, la primera ronda de selección en rhEPO fue seguida de una ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción de la población fago en lisozima de huevo de gallina (1 mg/ml en PBS). 200 μ l de rhEPO se recubrieron en los 5 pocillos de la placa de microtitulación (Maxisorp, Nunc) en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, en concentraciones decrecientes en rondas sucesivas de selección por ciclos de adsorción-desorción (ver tabla siguiente). Después de bloquear con M-PBS al 2%, se permitió la unión del fago en el agente de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 h. Después de 20 lavados con T-PBS y 20 con PBS, se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,2, y se neutralizó con Tris 2M. El fago eluido se utilizó inmediatamente para infectar TG-1 de crecimiento exponencial. Las células infectadas se seleccionaron en medio que contiene ampicilina. Las partículas de fago se rescataron de sobrenadantes de cultivo hasta superinfección con fago auxiliar M13-KO7, se concentraron con PEG y se utilizaron en otra ronda de selección

ES 2 323 651 T3

por ciclos de adsorción-desorción. Los números de entrada y salida de fago se determinaron como comunidades de transformación de *E. coli* después de cada ronda de selección por ciclos adsorción-desorción (Tabla 8).

TABLA 8

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Antígeno	Entrada de fago (TU/ml)	Salida de fago (TU/ml)
1	rhEPO, 500 µg/ml	$6,32 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^5$
2	Lisozima, 1 mg/ml	$6,16 \times 10^{15}$	$4,35 \times 10^{10}$
3	rhEPO, 100 µg/ml	$6,07 \times 10^{15}$	$6,78 \times 10^{10}$
4	rhEPO, 50 µg/ml	$8,42 \times 10^{15}$	$3,0 \times 10^{11}$
5	rhEPO, 50 µg/ml	$5,12 \times 10^{15}$	$4,28 \times 10^{10}$

Las colonias resultantes se desprendieron de las placas, se cultivaron en 2xYT con ampicilina y su ADN plasmídico se aisló con un midi-prep. Los insertos se amplificaron con una PCR y después se subclonaron en el vector pNOTBAD y se transformaron en una cepa E104 de *E. coli*. Se cultivaron 4x72 colonias en 200 µl de 2xYT con ampicilina y se indujeron con L-arabinosa al 0,1% al día siguiente. Tras 24 horas de expresión a 16°C, se lisaron con 200 µl de tampón borato Na, pH 8,0 durante 6 h a 4°C y se usó extracto periplásmico en el análisis ELISA.

Para el análisis ELISA, se revistieron placas Maxisorp con lisozima de huevo de gallina en PBS (20 µg/ml) ó rhEPO en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, respectivamente, durante 1 hora a 37°C. Después del bloqueo con BSA-PBS al 1%, se dejó que el extracto periplásmico se uniera en el mismo agente de bloqueo durante la noche. El enlace se reveló con un anticuerpo anti-His-(4) y un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón, conjugado con HRP (para la detección de lisozima de huevo de gallina) ó AP (para la detección de rhEPO). La reacción coloreada de la conversión de OPD (HRP) se leyó a 492/620 nm después de interrumpir con H₂SO₄ 1,25 M y la conversión pNPP (AP) se leyó a 405/620 nm. 14 clones con valores prometedores de absorbancia se seleccionaron para la expresión a escala de 20 ml. Después de 24 h de inducción de arabinosa a 16°C, las células se recolectaron y se lisaron durante la noche en 1 ml de tampón de borato Na a 4°C, y el lisado se empleó para el análisis ELISA. El análisis ELISA se realizó como antes en 4 ensayos paralelos y se emplearon pocillos sin extracto periplásmico y sin antígenos como controles negativos. Los resultados (Tabla 9) se obtuvieron con clones de acuerdo con SEQ ID N° 42, 43.

TABLA 9

Antígeno		Absorbancia de enlace	Sin extracto periplásmico	Sin antígeno
Lisozima	A _{492/620nm}	0,299	0,110	0,018
rhEPO	A _{405/620nm}	0,258	0,095	0,090

Ejemplo 16

Los dominios C_H3 de diseño proporcionan biespecificidad en un formato tipo Fab

En la construcción empleada en este ejemplo, tanto la cadena VL como la cadena VH de un anticuerpo se fusionan en un dominio C_H3 de diseño.

Las regiones VL y VH del anticuerpo monoclonal humano 3D6 (He XM, *et al.*, Pro Natl Acad Sci USA. 1992 89:7154-8.; Kohl J. *et al.*, Ann N Y Acad Sci. 1991 646:106-14.; Felgenlauer M. *et al.*, Nucleic Acids Res. 1990 18:4927), que reconocen un epítipo en gp41 de HIV-1, se utilizaron como socio de fusión para el clon C24 del dominio C_H3 diseñado que se une específicamente a la lisozima de huevo de gallina.

Con el fin de promover la formación del dímero VL-CH3/VH-CH3 mediante un enlace disulfuro, se añadieron los radicales Ser-Cys al extremo C de las secuencia C24.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivamente de las dos cadenas 3D6VL-C24 y 3D6VH-C24 están indicadas en SEQ ID N° 47, 46 y SEQ ID N° 45, 44, respectivamente.

Se diseñaron cebadores que permiten la amplificación de las regiones de codificación, introduciendo al mismo tiempo sitios de restricción (mutaciones silenciosas) que se emplearon para ligar juntamente las regiones de codificación. Para la expresión de los genes, se escogió el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Se clonaron las construcciones en vectores de expresión apropiados de *Pichia pastoris*: 3D6VL-C24 se clonó en pPIC9K (nombre final: pPIC9K3LC) y 3D6VH-C24 (nombre final: pPICZ3HC) se clonó en pPICZalphaA. La construcción pPICZ3HC se linealizó con *Bgl* II, se transformó en *Pichia pastoris* GS115 y los transformantes se seleccionaron en medio sólido que contiene zeocina. Uno de los transformantes se usó posteriormente como célula anfitriona para la construcción pPIC9K3LC linealizada *Sal* I-. A continuación, se seleccionaron dobles transformantes en medio RDB.

Los clones se inocularon en 30 ml de medio YPG y se desarrollaron hasta OD₆₀₀=10, y después se indujeron por adición de metanol al 1% en medio BMMY. La inducción se continuó durante 36 horas a 16°C. Se retiraron los sobrenadantes por centrifugación y después se concentraron aproximadamente 10 veces. La presencia de la proteína recombinante se confirmó por transferencia Western con un anticuerpo anti-His (4) y se estimó una concentración de aproximadamente 50-100 µg/l de cultivo inicial.

Las primeras pruebas funcionales se realizaron con sobrenadante concentrado 10x. En primer lugar, los pocillos de las placas Maxisorp se revistieron con 20 µg/ml de lisozima de huevo de gallina en PBS ó 20 µg/ml de epítipo del anticuerpo 3D6 en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, respectivamente, durante 1 hora a 37°C. El epítipo 3D6 se utilizó en forma de una proteína de fusión GST producida recombinantemente. Después de bloquear con BSA-PBS al 1%, se dejó que los sobrenadantes concentrados se unieran durante la noche en el mismo agente bloqueante. El enlace se reveló con un anticuerpo anti-His(4) y anticuerpo cabra anti-ratón, conjugado con HRP, y se visualizó como reacción de color resultante de la conversión OPD a 492/620 nm (Tabla 10).

TABLA 10

Antígeno	Señal ELISA (A _{492/620})	Fondo (sin antígeno)	Fondo (sin sobrenadante)
Lisozima	0,198	0,003	0,043
Epítipo 3D6	0,061	0,001	0,007

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación por ingeniería de una inmunoglobulina que comprende una región bucle estructural modificada, para proporcionar un sitio de unión no-CDR, y determinar la unión de dicha inmunoglobulina a un epítipo de un antígeno, en donde la región bucle estructural sin modificar no se une significativamente a dicho epítipo, el cual método comprende los pasos de:
 - provisión de un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende por lo menos una región bucle estructural,
 - modificación de por lo menos un radical nucleótido de dicha región bucle estructural mediante mutagénesis, en donde dicha modificación, o bien
 - a) se selecciona por un método de mutagénesis, del grupo formado al azar, semi-azar, aleatorización dirigida al sitio, mutagénesis por scanning y métodos combinatorios, o
 - b) hay más de un bucle estructural para proporcionar una unión de sitio a dicho epítipo, o
 - c) excluye la incorporación de un péptido biológicamente activo de 2 a 40 aminoácidos en un dominio Fc.
 - transferencia de dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
 - expresión de dicha inmunoglobulina modificada,
 - puesta en contacto de la inmunoglobulina modificada expresada, con unos epítopos, y
 - determinación de si dicha inmunoglobulina modificada se ha unido a dicho epítipo.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque, dicha inmunoglobulina se une específicamente por lo menos a dos diferentes epítopos.
3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, el cual método comprende por lo menos una modificación en por lo menos una región bucle estructural de dicha inmunoglobulina y determinación de la unión específica de por lo menos una región bucle estructural a por lo menos una molécula seleccionada del grupo formado por alérgenos, antígenos asociados a un tumor, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios, en donde dicha región bucle estructural sin modificar no se une específicamente a dicha por lo menos una molécula.
4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque, por lo menos se selecciona una molécula del grupo formado por, antígenos asociados a un tumor, en particular EpCAM, glicoproteína-72 (TAG-72) asociado a un tumor, antígeno CA 125 asociado a un tumor, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), antígeno de alto peso molecular asociado a un melanoma (HMW-MAA), antígeno asociado a un tumor que expresa hidratos de carbono relacionados con Lewis Y, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAMS, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18 y antígeno asociado a un tumor de citoqueratina, antígenos bacterianos, antígenos víricos, alérgenos, fluo-resceína, lisozima, receptor 9 tipo toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma; TNF-alfa, TNFbeta2, TNF-alfa, TNF alfabeta, TNF-R1, TNF-RII, FasL., CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, TRAIL Receptor-1, A1 Adenosina Receptor, Linfotóxina beta receptor, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta1, integrina beta2, integrina alfa4/beta7, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa 4, integrina alfa 5, integrina alfa6, integrina alfaV, alfaVbeta3 integrina, FGFR-3, factor de crecimiento de los queratinocitos, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de células T, B7-1, B7-2, VNRintegrina, TGFbeta1, TGFbeta2, eotaxina 1, BlyS (estimulador de los linfocitos B), complemento C5, IgE, factor VII, CD64, CBL, NCA, 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-84), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptores de endotelina, VLA-4, hidratos de carbono como por ejemplo antígenos del grupo sanguíneo e hidratos de carbono relacionados, glicosilación Galili, gastrina, receptores de gastrina, hidratos de carbono asociados a un tumor, hapteno NP-cap ó NIP-cap, receptor de células T alfa/beta, selectina E, dioxina, fosfatasa alcalina de placenta (FLAP) y fosfatasa alcalina tipo PLAP testicular, receptor de transferrina, heparanasa I, miosina cardíaca humana, glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glicoproteína de la cubierta gH del citomegalovirus humano (HCMV), HIV gp 120, HCMV, virus sincicial respiratorio RSV F, RSVF Fgp, VNRintegrina, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, bucle HIV IIIB gp 120 V3, virus sincicial respiratorio (RSV)Fgp, glicoproteína gD del virus del Herpes simplex (HSV), glicoproteína gB del HSV, glicoproteínas de la cubierta del HCMV gB, toxina del Clostridium perfringens, y fragmentos de los mismos.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha inmunoglobulina modificada tiene especificidad de unión al FeRn.

ES 2 323 651 T3

6. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha inmunoglobulina modificada tiene especificidad de unión a una molécula efectora.

7. Método para la producción de una inmunoglobulina o una preparación farmacéutica de la misma mediante ingeniería de una inmunoglobulina modificada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque

- la inmunoglobulina modificada se acaba en una preparación farmacéutica.

8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque, dicha inmunoglobulina es una unión multiespecífica, específicamente a por lo menos una primera molécula y por lo menos una segunda molécula a través de por lo menos una modificación en por lo menos una región de bucle estructural de dicha inmunoglobulina la cual segunda molécula se selecciona del grupo formado por, alérgenos, antígenos asociados a un tumor, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios.

9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque, las inmunoglobulinas comprenden una cadena pesada y/o una cadena ligera de la inmunoglobulina o una parte de la misma.

10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina comprende por lo menos uno de un dominio constante y/o por lo menos un dominio variable de la inmunoglobulina.

11. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina comprende por lo menos uno de un dominio simple o parte del mismo, incluyendo un minidominio que consiste en dos hebras beta de un dominio de inmunoglobulina conectado por un bucle estructural, un dominio simple de inmunoglobulina variable, o una cadena simple Fv.

12. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina contiene un dominio constante seleccionado del grupo formado por CH1, CH2, CH3, CH4, CL, y combinaciones de los mismos, incluyendo un fragmento Fab, un fragmento Fc, o la inmunoglobulina en toda su longitud.

13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina contiene cualquiera de la Ig-kappa ó Ig-landa.

14. Métodos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina comprende cualquiera de las regiones bucle de CH1, CH2, CH3 ó CH4, que comprende una modificación en una de las posiciones no ácida dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo formado por los aminoácidos 7 a 21, aminoácidos 25 a 39, aminoácidos 41 a 81, aminoácidos 83 a 85, aminoácidos 89 a 103 y aminoácidos 106 a 117, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

15. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana, humanizada o quimérica.

16. Métodos de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizados** porque, la inmunoglobulina comprende una cualquiera de las regiones bucle de Ig-kappa ó Ig-landa, que comprende unas modificaciones en una de las posiciones de aminoácidos, dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo formado por los aminoácidos 8 a 18, aminoácidos 27 a 35, aminoácidos 42 a 70, aminoácidos 83 a 85, aminoácidos 92 a 100, aminoácidos 108 a 117, y aminoácidos 123 a 126, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

17. Método de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16 **caracterizado** porque, la inmunoglobulina contiene cualquiera de las regiones bucle estructurales de un dominio variable que comprende una modificación fuera de las posiciones de los aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por, los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76, y los aminoácidos 89 a 101, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

18. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina se ha seleccionado del grupo formado por, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y IgM.

19. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina es de origen ratón.

20. Método de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de ratón seleccionada del grupo formado por IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, e IgM.

21. Método de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina comprende una cualquiera de las regiones bucle de Ig-kappa ó Ig-landa, que comprende una modificación en una de las posiciones de aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por los aminoácidos 8 a 20, aminoácidos 26 a 36, aminoácidos 43 a 79, aminoácidos 83 a 85, aminoácidos 90 a 101, aminoácidos 108 a 116 y aminoácidos 122 a 125, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

22. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina comprende una cualquiera de las regiones bucle estructurales de un dominio variable, que comprende unas modificaciones en una de las posiciones de los aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por los aminoácidos 6 a 20, aminoácidos 44 a 52, aminoácidos 67 a 76 y aminoácidos 92 a 101, en donde la numeración está de acuerdo con la IMGT.

23. Método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 22, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina se selecciona del grupo formado por un fragmento de Fab, un fragmento Fc, un dominio simple de inmunoglobulina, un dímero CH3 de cadena sencilla (scCH3), scCH2, scCH1/CL y una inmunoglobulina completa.

24. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizado** porque, dicha modificación da por resultado la sustitución de un nucleótido y/o una delección y/o una inserción.

25. Método de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 24, **caracterizado** porque, la secuencia de nucleótidos de por lo menos una región bucle, está modificada por una mutación dirigida al sitio y una mutación al azar y una mutación semi al azar.

26. Método de acuerdo con la reivindicación 25, **caracterizado** porque, dicha secuencia de nucleótidos modificada comprende por lo menos una unidad de repetición de nucleótidos, que tiene la secuencia 5'-NNS-3', 5'-MNN-3' ó 5'-NNK-3'.

27. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, **caracterizado** porque, el sistema de expresión comprende un vector.

28. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina modificada se expresa en un anfitrión, de preferencia en un anfitrión bacteriano, una levadura, una célula vegetal, en una célula animal, o en un vegetal o animal.

29. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, **caracterizado** porque, la unión específica de la inmunoglobulina modificada a la molécula, se determina mediante un ensayo de unión seleccionado del grupo formado por los ensayos inmunológicos, de preferencia el ensayo inmunosorbente ligado a una enzima (ELISA), ensayos de resonancia del plasmón de superficie, espectroscopia de resonancia magnética nuclear por diferencia de transferencia de saturación, espectroscopia de resonancia magnética nuclear por transferencia NOE (trNOE), ensayos competitivos, ensayos de unión a tejidos, ensayos de unión a células vivas, y ensayos de extractos celulares.

30. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, **caracterizado** porque, la inmunoglobulina modificada está conjugada a un marcador seleccionado del grupo formado por moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos.

31. Método para prolongar la semi-vida *in vivo* de una molécula mediante la incorporación de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la reivindicación 5.

32. Método para la producción de una molécula con funciones efectoras mediante la incorporación de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la reivindicación 6.

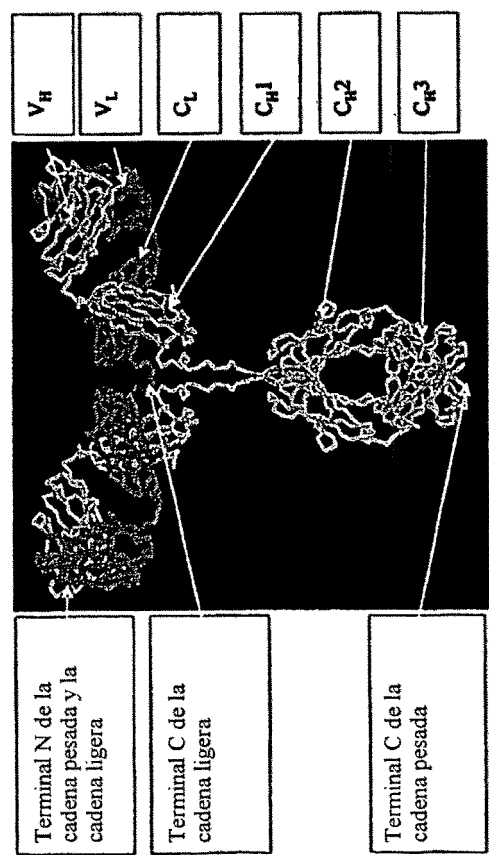


Fig. 1a

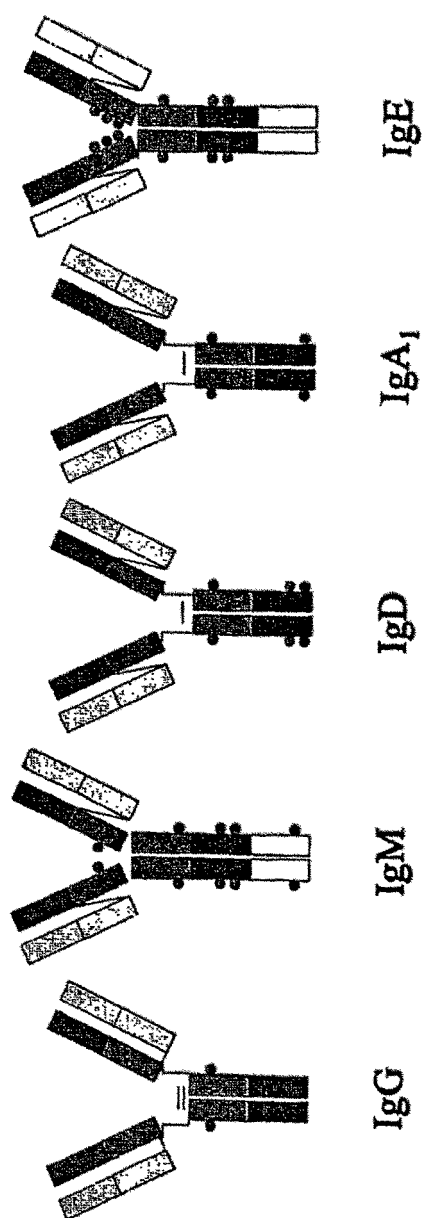


Fig. 1b

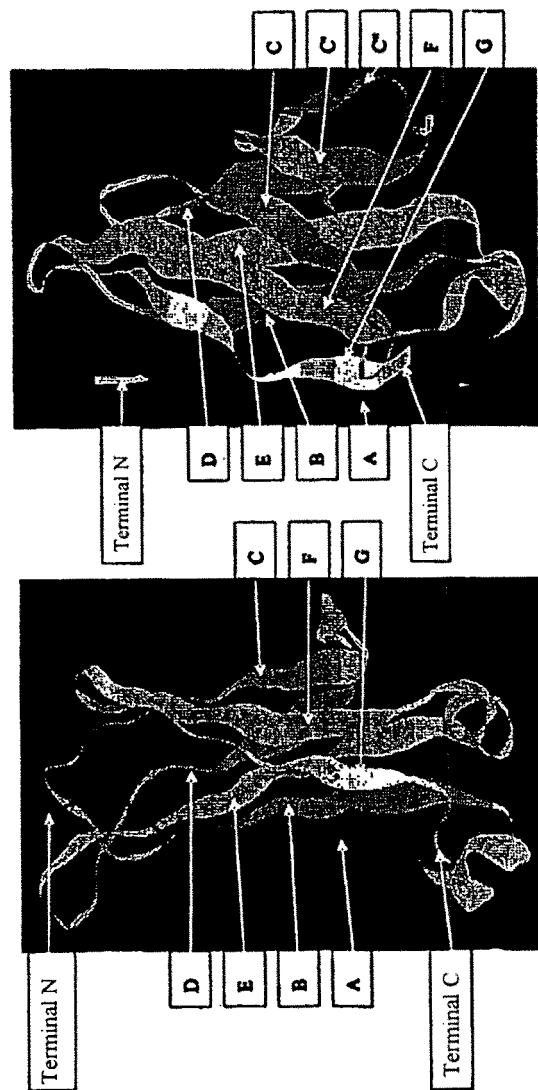


Fig. 2

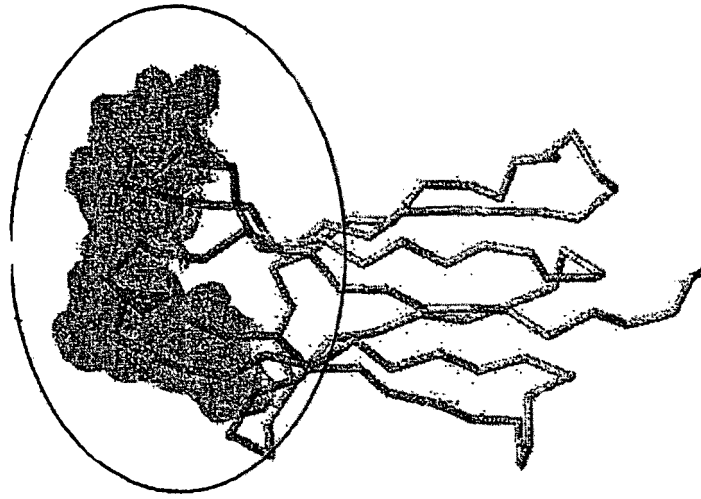


Fig. 3

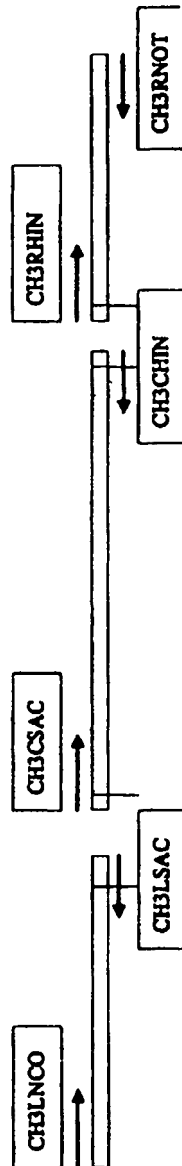


Fig. 4

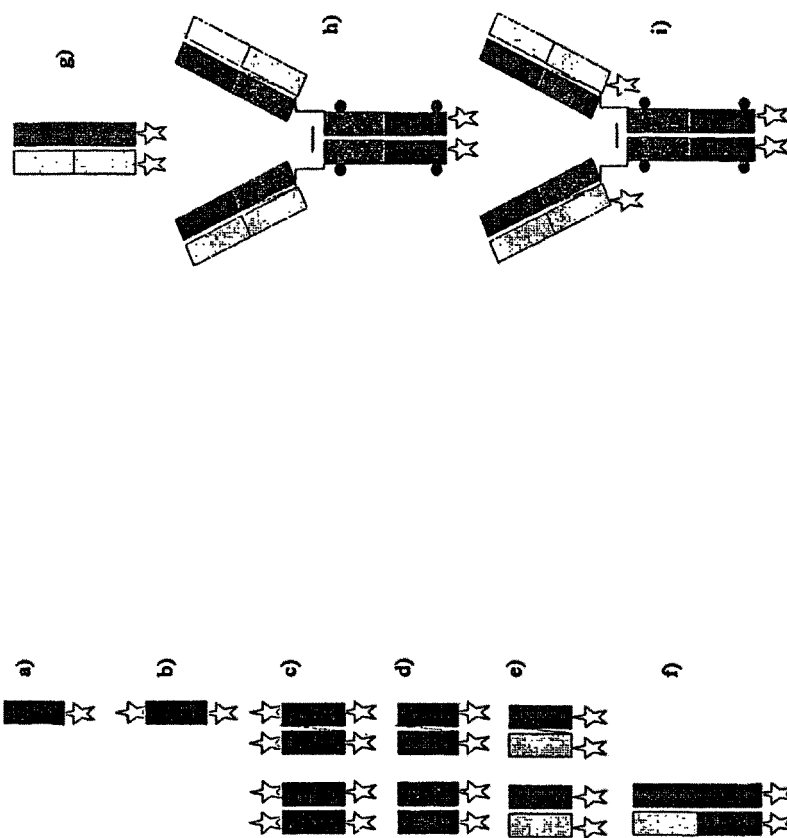


Fig. 5

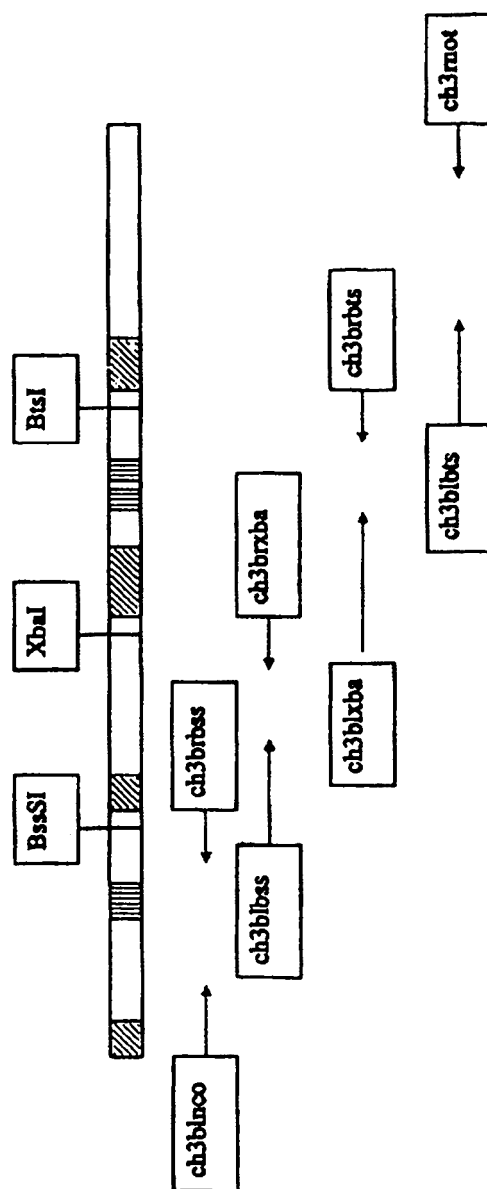


Fig. 6

+3 R E P Q V Y T L P P S R D E L Q V S L T C L V K C F
 1 NNSCGAGAC CACAGGTGA CACCTGCCC CCATCCGTG ACAGCTCWN SNNSNNSCAA GTCCGCTGT GAAGGCTTC NNNNNNNN
 NNSGCTCTG GTGCCACAT GTGGGACGGG GGTAGGGAC TGTCCAGNN SNNSNNSGT CAGTCGACT GGACGAGCA CTTTCGGAAG NNSNNSNNSN

 +3 I A V E W E S N G Q P E N M Y K T T P F V L D S D G
 101 NNATCCCGT GGATGGGAG AGCATGGGC AGCCGAGAA CAACTACAAAG ACCACGCTC CCCTCTAGA CTCCGACGC NNNNNNNN NNNSTCCTT S F
 NSTAGCGCA CCTACCCCTC TGTACCCG TCGTACCCG TCGGCTCTT GTTGATGTC TGTGCGGAG GGCAGATCT GAGCTGCCG NNNNNNNN NNSNAGCAA

 +3 F L Y S K L T V R W G N V P S C S V M L H N H Y T
 201 CTTCTCTAC AGCAAGCTTA CCGTGNNSN SNNSAGGTGG NNSNNSGGA AGCTCTCTC ATCCAGTGG ATCENNNNN NECTGCACAA CCCTACACA
 GAGGAGATG TGTTCGAAT GGCACNNSN SNNSTCCACC NNSNNSCCT TGCAGAGAG TACCTCAC TACNNSNN NAGCAGTGT GTGATGTGT

 +3 Q K S L S L S P G K A A A
 301 CAGAGAGCC TCTCCCTGTC TCGGGTAAA GGGGGGGA
 GTCTCTCG AGAGGACAG AGGCCCATTT CCGCGCGT

Fig. 7

Fig. 8

SEQ ID No. 1: Secuencia de aminoácidos del dominio C_H3 del anticuerpo 1oqo.pdb

1 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
31 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
61 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
91 HNHYTQKSLSLSPGKAAA

SEQ ID No. 2: Secuencia de nucleótidos del dominio C_H3, obtenido por ingeniería, del
Ejemplo 1

1 CCATGGCCCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
GAGCTCNNSN NSNNSCAGGT
71 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
141 CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
211 TTACCGTGNN SNNSNNSAGG TGGNNSNNSG GGAACGTCTT
CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA
281 CAACCACTAC ACACAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
AAAGCGGCCG CA

SEQ ID No. 3: Secuencia de aminoácidos del dominio C_H3, obtenido por ingeniería, del
Ejemplo 1

1MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS

61 DGSFFLYSKLTVXXXRWXXGNVFSCSVMHE
91ALHNHYTQKSLSLSPGKAAA

SEQ ID No. 4: PCR cebador C_H3LNCO

cttgccatgg ccccccgaga accacaggtg tac

SEQ ID No. 5: PCR cebador C_H3LSAC

agtcgagctc gtcacgggat gggggcaggg

SEQ ID No. 6: PCR cebador C_H3CSAC

gtacgagctc nnsnnsnsc aagtcagcct gacctgcctg g

SEQ ID No. 7: PCR cebador C_H3CHIN

tgccaagctt gctgtagagg aagaaggagc cg

SEQ ID No. 8: PCR cebador C_H3RHIN

tgccaagctt accgtgnnsn nsnsaggtg gnnsnsggg aacgtcttct catgctccg

SEQ ID No. 9: PCR cebador C_H3RNOT

agttgcggcc.gctttccg gagacagggga gag

SEQ ID No. 10: Secuencia de aminoácidos del dominio C_H3+3 obtenido por ingeniería

1MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS
61 DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXRWXXGNVFSCSV
91MHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA

ES 2 323 651 T3

SEQ ID No. 11: Secuencia de nucleótidos del dominio C_H3+3 obtenido por ingeniería

1 ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcxgtgac gagctcnnsn
61 nsnnscaagt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac atgcgcgtgg
121 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact
181 ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc ttaccgtgnn snnsnnsnns nnsnnsaggt
241 ggnnsnsgg gaacgtcttc tcatgctcgg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca
301 cacagaagag cctctccctg tctcgggta aagcggccgc a

SEQ ID No. 12: PCR cebador C_H3RHIN3

1 tgccaagctt accgtgnnsn nsnnsnnsnn snnsaggtgg nnsnsggga acgtcttctc
61 atgctcgg

SEQ ID No. 13: Secuencia de aminoácidos del dominio C_H3+5 obtenido por ingeniería

1MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
31GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
61DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXXRWXXGNVFSC
91 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA

SEQ ID No. 14: Secuencia de nucleótidos del dominio C_H3+5 obtenido por ingeniería

1 ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgtgac gagctcnnsn
61 nsnnscaagt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac atgcgcgtgg
121 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact
181 ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc ttaccgtgnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn
241 nsaggtggnn snnsgggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc
301 actacacaca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaagc ggccgca

SEQ ID No. 15:. PCR cebador C_H3RHIN5

1 tgccaagctt accgtgnnsn nsnnnsnnnn snnsnnnsns aggtgnnsn nsgggaacgt
61 cttctcatgc tccg

SEQ ID No. 16: Secuencia de aminoácidos del clon D07 del anti-EpCAM

PREPQVYTLPPSRDELGWPQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVPKRWCVSVRWPPGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

SEQ1 ID No. 17: Secuencia de nucleótidos del clon D07 de anti-EpCAM

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGGC
TGGCCGCAAGTCAGCCTAACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTTA
CCGTGCCCAAGCGGTGGTGCGTGAGCGTCAGGTGGCCCCCGGGGAACGTC
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA .

SEQ1 ID No. 18: Secuencia de aminoácidos del clon C67 de anti-EpCAM

PREPQVYTLPPSRDELSVSQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVIPFCRMSPRWWIGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 19: Secuencia de nucleótidos del clon C67 de anti-EpCAM

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTCGGTGTGCGCAAGT
CAGCCCGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCAGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTTACCGTGATCCCCTTCTGCAGGATGAGCCCCAGGTGGTGGAT

T CTTCTCT ACAGCAAGCTTACCGTGATCCCCTTCTGCAGGATGAGCCCCAGGTGGTGGAT
CGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID No. 20: Secuencia de aminoácidos del clon D64C3 de anti-fluoresceína

PREPQVYTLPPSRDELEALQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVRRNRWSWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 21: Secuencia de nucleótidos del clon D64C3 de anti-fluoresceína

CCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGAGGCGCTGCAAGT
CA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCT ACAGCAAGCTTACCGTGCGGCGCAACAGGTGGTCCTGGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCGGGTAAA

SEQ ID No. 22: Secuencia de aminoácidos del clon A68 de anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELQGSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL
YSKLTVKSRATRRWVGNVFSCSVMHEALHNHYTQKNLSLSPGK

SEQ ID No. 23: Secuencia de nucleótidos del clon A68 de anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCCAGGGGAGCCA
AGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTTACCGTGAAGTCGCGCGCCACCCGGAGGTGGGTGG
TGGGGAACGTCTTTTCTTGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAG
AACCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

PREPQVYTLPPSRDELAIGQVSLTCLVKGFYPSOIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLY
SKLTVRSTRDNRWLYGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID No. 25: Secuencia de nucleótidos del clon B23 de anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGCGATCGGCCAAGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCT ACAGCAAGCTTACCGTGCGCTCGACGAGGGACAACAGGTGGCTGGTGGGGAA
CGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID No. 26: Secuencia de aminoácidos del clon B40 de anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELSGAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFL
YSKLTWFRQEGGMRWFAGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 27: Secuencia de nucleótidos del clon B40 de anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCAGCGGGGCGCAAG
TCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCT ACAGCAAGCTTACCGTGTGGTTCAGGCAGGAGGGCGGCATGAGGTGGTTCG
CGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAA
GAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA

SEQ ID No. 28: Secuencia de aminoácidos del clon C24 de anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYGKLTVPRLKGWPRWGWNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 29: Secuencia de nucleótidos del clon C24 de anti-lisozima

ES 2 323 651 T3

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGG
GCAAGTCA GCCCGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACGGCAAGCTTACCGTGCCCCCGCGGTTG
AAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA

SEQ ID No. 30: Secuencia de aminoácidos del clon D46 de anti-lisozima
PREPQVYTLPPSRDELLAYQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVVAGRWT~~C~~GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 31: Secuencia de nucleótidos del clon D46 de anti-lisozima
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCCTGGCGTA
CCAAGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTTACCGTGGTGGCCGGCAGGT
GGACGTGCGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCA
CTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID No. 32: Secuencia de aminoácidos del clon D56 de anti-lisozima.
PREPQVYTLPPSRDEL~~C~~V~~P~~QVSLTCLVKGFYPSOIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVVLKVVQARRWE~~V~~GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 33: Secuencia de nucleótidos del clon D56 de anti-lisozima
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTGCGTCCC
GCAAGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTTACCGTGGTGCTCAAGGTCGT

GCAGGCGCGCAGGTGGGAGGTGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCT
CTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA

SEQ ID No. 34: Secuencia de aminoácidos del clon A23 de anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELGIAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF
LYSKLTVLGRRWTLGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 35: Secuencia de nucleótidos del clon A23 de anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGACGAGCTCGGCATCGCGCAA
GTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAACGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCTTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTTACCGTGTTGGGCCGCAGGTGGACCCTGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID No. 36: Secuencia de aminoácidos del clon A33 de anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELGIAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF
LYSKLTVLGRRWTLGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 37: Secuencia de nucleótidos del clon A33 de anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGGCATCGCGCAA
GTCA GCTTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAACGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTTACCGTGTTGGGCCGCAGGTGGACCCTGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID No. 38: Secuencia de aminoácidos del clon D2 de anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELLPCQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVFCPRWLGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 39: Secuencia de nucleótidos del clon D2 de anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTTGCCCTGCCAAGT
CAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGG CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC4CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCT
TTCTTCCTCTA CAGCAAGCTTACCGTGTTCTGCCCCAGGTGGCTGGGGGGGAACGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCGGGTAAA

SEQ ID No. 40: Secuencia de aminoácidos del clon D68 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVPCMRWWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 41: Secuencia de nucleótidos del clon D68 de anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTGTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCCTCTACAGCAAGCTTACCGTGCCCTGCATGAGGTGGTGGGGCGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

SEQ ID No. 42: Secuencia de aminoácidos del dominio biespecífico CH3, mutado
en ambos lados, unión a la lisozima y a la eritropoyetina, clon D72

RREPQVYLPPSRDELVLGQVSLACLVKGFVRLIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
RGQLADSFF LYSKLTVPRLKGWPRWGWGNVFSCSVMFLALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 43: Secuencia de nucleótidos del dominio beispécifico CH3,
 mutado en ambos lados, unión a la lisozima y a la eritropoyetina, clon D72
 CGGCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGG
 GCAAGTCA GCCTGGCCTGCCTCGTGAAAGGCTTCGTGGTCCGGTTGATCGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTT
 CTAGACTCCGACGGCCGGCAGTTGGCG GACTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTTA
 CCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGG GCTGGGGGAACGTCTTCT
 CATGCAGTGTGATGTTCTGCGCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCC
 CTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID No. 44: Secuencia de aminoácidos de una construcción bivalente del
 tipo Fab, que consta de VH y VL del anticuerpo 3D6 anti HIV1-gp41 y del
 clon anti-lisozima C24 (3D6-VH - C24)
 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSG,ISWDSS
 SIGYADSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDMALYYCVKGRDYYDSGGYFTVAF
 DIWGGGTMTVSSASTKGPQVYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQ PENNYKTTTPVLDSGSGFFLYGKLTVPRLKGWPRWGWGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 45: Secuencia de nucleótidos de la construcción bivalente tipo
 Fab, que consta de VH y VL, del anticuerpo 3DS anti-HIV1gp41 y el clon C24
 anti-lisozima (3D6-VH- C24)
 AAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAG
 ACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAATGATTATGCCATGCACTGGGTC
 CGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATAAGTTGGGATAGTA

ES 2 323 651 T3

GTAGTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAA GGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTCTGA GAGCTGAGGACATGGCCT
TATATTACTGTGTAAAAGGCAGAGATTACTATGATAGTGGTGGTTATT TCACGGTT
GCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAA
G GGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAA
GTCAGCCCGA CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACGGCAAGCTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGG
GCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID No. 46: Secuencia de aminoácidos de la construcción bivalente tipo Fab, que consta de VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y del clon C24 anti-lisozima (3D6-VL - C24)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI~~SR~~WLAWYQQKPGKVPKLLIYKASSLESGV
PSRFSGSGSGTEFTLTIS~~SL~~LPDDFATWCQQYNSYSFGPGTKVDIKRTVAEPQVYTL
PSRDELVLGQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS~~GS~~FFLYGKL
TVPPRLKGWPRWGWWFSCSV~~M~~HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 47: Secuencia de nucleótidos de la construcción bivalente tipo Fab, que consta de VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y del clon C24 anti-lisozima (3D6-VL - C24)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGGTGGTTGGCCTGGTATCAGC
AGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCATCTAGTTTAGAAAGT
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTC~~ACT~~CTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTA
TTCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGA~~ACT~~GTGGCTGAACCACAGG

ES 2 323 651 T3

TGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCAGCCCGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACGGCAAG CTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGT
GGGGCTGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID No. 48: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca CL

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVVCLLN
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLLXXXXYE
101 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEAAA

SEQ ID No. 49: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CL

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT
201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSTACGAG
301AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC
351 CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGCGGCCGCA

SEQ ID No. 50: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca CL+3

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVVCLLN
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLLXXXXXX
101 XYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEAAA

SEQ ID No. 51: Secuencia de nucleótidos de la librería CL+3

ES 2 323 651 T3

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNS000TCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT
201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSNNSNNS
301 NNSTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT
351 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGCGGCCGCA

SEQ ID No. 52: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca CL+5

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVVCLLN
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSXXXXX
101 XXXYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEAA

SEQ ID No. 53: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CL+5

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSNNS000TCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT
201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
251 GCACCTACA000TCAGCAGCACCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSNNSNNS
301 NNSNNSNNSTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA
351 GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGCGGCCG
401 CA

SEQ ID No. 54: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca CH

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAASTKGPSVFPLAPSSXXXXXXXXXALGCL
51 VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPXXXXXX

101 XTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSAAA

SEQ ID No. 55: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CH

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
101 CACCCTCCTCCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSGCCCTGGGCTGCCTG
151 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGC
201 CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC
251 TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCNNSNNSNNSNNSNNSNNS
301 NNSACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
351 CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGCGGCCGCA
