

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 826**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/13** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06721715 .8**  
96 Fecha de presentación: **24.03.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1869182**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

54 Título: **MÉTODO PARA AISLAMIENTO DE POLIPÉPTIDOS SOLUBLES.**

30 Prioridad:  
**25.03.2005 US 664954 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.03.2012**

73 Titular/es:  
**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA  
1200 MONTREAL ROAD, M-58, EG-06B  
OTTAWA, ONTARIO K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:  
**TANHA, Jamshid**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 375 826 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para aislamiento de polipéptidos solubles

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere al aislamiento, identificación y manipulación de polipéptidos, especialmente fragmentos monómeros de anticuerpos humanos.

**Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos en los vertebrados se componen típicamente de cadenas pesada (H) y ligera (L) apareadas. El primer dominio de las cadenas H y L combinadas, el  $V_H$  y  $V_L$ , son de secuencia más variable, y esta es la porción del anticuerpo que reconoce el antígeno y se fija al mismo. Los dominios  $V_H$  y  $V_L$  reconocen el antígeno como un par.

10 El repertorio inmunológico de los Camélidos (camellos, dromedarios y llamas) es único en el sentido de que posee tipos raros de anticuerpos a los que se hace referencia como anticuerpos de cadena pesada (Hamers, Casterman C. et al., 1993). Estos anticuerpos carecen de cadenas ligeras y por tanto sus sitios de combinación están constituidos por un solo dominio, denominado  $V_{HH}$ .

15 Los anticuerpos  $V_{HH}$  recombinantes de un solo dominio (sdAbs) proporcionan varias ventajas sobre los fragmentos FV monocatenarios (scFv) derivados de anticuerpos convencionales de cuatro cadenas. Si bien los sdAbs son comparables a sus contrapartidas scFv en términos de afinidad, los mismos superan a los scFv en términos de solubilidad, estabilidad, resistencia a la agregación, susceptibilidad de replegado, rendimiento de expresión, y facilidad de manipulación del DNA, construcción de bibliotecas y determinaciones estructurales 3-D. muchas de las propiedades mencionadas de los scAbs  $V_{HH}$  son deseables en aplicaciones que implican anticuerpos.

20 Sin embargo, la naturaleza no humana de los  $V_{HH}$ s limita su uso en inmunoterapia humana debido a inmunogenicidad. A este respecto, los sdAbs  $V_H$  y  $V_L$  humanos son candidatos ideales para aplicaciones de inmunoterapia debido a que se espera que sean menos inmunógenos.

25 Los  $V_{HS}$  y  $V_{LS}$  humanos, sin embargo, son por lo general tendentes a agregación, una característica común a los  $V_{HS}$  y  $V_{LS}$  derivados de anticuerpos convencionales (Davies, J. et al., 1994; Tanha, J. et al., 2001; Ward E.S. et al., 1989). Por ello, se han realizado intentos para obtener  $V_{HS}$  y  $V_{LS}$  humanos adecuados para aplicaciones de anticuerpos. Tales  $V_{HS}$  y  $V_{LS}$  han exhibido también otras propiedades útiles típicas de los  $V_{HH}$ s tales como alto rendimiento de expresión, alta susceptibilidad de replegado y resistencia a la agregación. Bibliotecas sintéticas construidas a base de estos  $V_{HS}$  y  $V_{LS}$  como andamiajes de biblioteca podrían servir como una fuente prometedora de proteínas terapéuticas.

30 La camelización y la llamización, que implican incorporar residuos importantes de solubilidad de los  $V_{HH}$ s de camello y llama, respectivamente, en  $V_{HS}$  o  $V_{LS}$  humanos se han empleado para generar  $V_{HS}$  y  $V_{LS}$  humanos monómeros. Se ha demostrado que bibliotecas sintéticas de sdAb construidas sobre la base de estos  $V_{HS}$  y  $V_{LS}$  y generadas por aleatorización de la CDR son funcionales en términos de producción de ligantes para diversos antígenos (Davies, J. et al., 1995; Tanha J. et al., 2001).

35 En otro enfoque, se aislaron  $V_{HS}$  y  $V_{LS}$  monómeros totalmente humanos de bibliotecas sintéticas humanas de  $V_H$  y  $V_L$  sin recurrir a ingeniería de la clase arriba mencionada. En un experimento, se descubrió un  $V_H$  humano monómero cuando una biblioteca de  $V_H$  humano se lavó en batea contra lisozima de huevo de gallina (Jespers, L. et al., 2004b). Más recientemente, un método de selección basado en criterios de desplegado reversible y afinidad produjo un gran número de  $V_{HS}$  monómeros a partir de bibliotecas humanas sintéticas de  $V_H$  (Jespers, L. et al., 40 2004a). Este descubrimiento puso de manifiesto el hecho de que un método de selección apropiado es fundamental para la captura eficiente de  $V_{HS}$  humanos monómeros raros con propiedades biofísicas deseables.

**Objetos de la invención**

Un primer objeto de la invención es proporcionar un método de cribado de alta potencia para identificación de fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$  humanos estables diana.

**Sumario de la invención**

45 Se proporciona un método para identificación de fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y  $V_L$  humanos estables. El método incluye los pasos de obtención de una biblioteca de presentación de fago capaz de expresar una diversidad de fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y  $V_L$ , permisión de la infección de un césped bacteriano por el fago de la biblioteca, e identificación de fagos que forman calvas mayores que el tamaño medio en el césped bacteriano. Se aíslan luego los fagos de las calvas de mayor tamaño, pudiendo determinarse la secuencia u otras características de los 50 fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$  expresados por los fagos de las calvas mayores.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de identificación de fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$  humanos estables diana, que comprende a) obtener una biblioteca de presentación de fago capaz de expresar una diversidad de fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$ , b) permitir la infección de un césped bacteriano por el fago de la biblioteca y c) identificar fagos que forman calvas mayores que el tamaño medio en el césped bacteriano.

## Descripción Detallada de los Dibujos

### Leyendas de las figuras

**Figura 1.** Una representación gráfica de los resultados de ejemplos seleccionados: el contraste en el tamaño de calva entre fagos que presentan un  $V_H$  soluble (HVHP428) y aquéllos que presentan uno insoluble (BT32/A6). La fotografía muestra una parte de la placa de agar de césped bacteriano que se amplió para mejorar la visualización de la calva. Aunque la placa contenía un número igual de cada uno de los dos tipos de calva, la fotografía contiene esencialmente las calvas HVHP428, de tamaño grande. La mayoría de las calvas BT32/A6 eran demasiado pequeñas para producir imágenes claras bien definidas en la fotografía. Por tanto, las calvas marcadas por flechas representan una proporción menor de fagos BT32/A6 que eran lo suficientemente grandes para ser visibles en esta imagen. Los asteriscos marcan tamaños de calva representativos para los fagos HVHP428. Las identidades de las calvas se determinaron por secuenciación del DNA.

**Figura 2.** Secuencia de aminoácidos de los  $V_H$ s humanos seleccionados sobre la base de la afinidad para la proteína A y el tamaño de la calva. Los puntos en las entradas de la secuencia indican identidad de aminoácidos con HVHP2M10 o HVHP44. Se incluyen guiones para alineación de las secuencias. Los residuos en las posiciones de solubilidad principales y el residuo 57T que se asocia con  $V_H$ s/ $V_H$ s con la propiedad de fijación de proteína A se muestran en negrilla. Se utiliza el sistema de numeración Kabat. El valor de la "frecuencia" total es 114

CDR = región determinante de la complementariedad; FR = región de entramado; gln seq = secuencia de la línea germinal

**Figura 3.** Tendencias de agregación de los  $V_H$ s humanos. Cromatogramas de filtración en gel que comparan el estado de oligomerización de un  $V_H$  humano aislado en este estudio (HVHP428) con el de un  $V_H$  de llama (H11C7) y un  $V_H$  humano típico (BT32/A6). El pico que se eluye en último lugar en cada cromatograma corresponde al  $V_H$  monómero. El pico H11C7 dímero está marcado por una flecha. B, espectros  $^1H$  NMR unidimensionales de HVHP414 a 800 MHz (i), HVHP423 a 500 MHz (ii) y HVHP428 a 800 MHz (iii). Los espectros en el panel izquierdo están aumentados a escala con un factor de dos a fin de permitir una mejor observación de las señales de baja intensidad.

**Figura 4.** Estabilidad de los  $V_H$ s humanos en términos de su resistencia a tripsina a 37°C y su integridad después de incubación larga a 37°C. A, SDS-PAGE que compara las movilidades del  $V_H$  HVHP414 sin tratar y tratado con tripsina a los 15, 30 y 60 min con relación a un marcador de 21 kDa. HVHP414-cMyc denota  $V_H$  de HVHP414 que carece del c-Myc. B, perfiles de masa molecular obtenidos por espectrometría de masas de  $V_H$  de HVHP414 sin tratar y tratado con tripsina (60 min). El perfil de la espectrometría de masas del  $V_H$  tratado se ha superpuesto al correspondiente al del  $V_H$  sin tratar para proporcionar una mejor comparación visual. La masa molecular experimental del  $V_H$  sin tratar es 14.967,6 Da, que es esencialmente idéntica a la masa molecular esperada, 14.967,7 Da. La masa molecular observada del  $V_H$  tratado con tripsina (13.368,5 Da) indica la pérdida de 13 aminoácidos en el término C por escisión en K (Lys) en la etiqueta de c-Myc para dar una masa molecular esperada de 13368,0 Da. El sitio de escisión de tripsina se muestra por una flecha vertical encima de la secuencia de aminoácidos de HVHP414. C, cromatogramas de filtración en gel que comparan el estado de oligomerización del  $V_H$  HVHP420 tratado a 37°C (perfil superior) con el del  $V_H$  sin tratar (perfil inferior). Los cromatogramas se desplazaron verticalmente debido a que no podían distinguirse cuando estaban superpuestos. Los picos mayor y menor en cada cromatograma corresponden a  $V_H$ s monómeros y dímeros, respectivamente. El  $V_H$  dímero constituye 3% de la proteína total. El recuadro muestra las superposiciones de sensogramas para la fijación de HVHP420 tratado a 37°C a la proteína A a diversas concentraciones. Los  $V_H$ s utilizados para estudios de estabilidad térmica procedían de stocks que habían estado ya a 4°C durante varios meses.

**Figura 5.** Superposiciones de sensogramas que muestran la fijación de HVHP423 nativo (líneas gruesas) y replegado (líneas delgadas) a la proteína A inmovilizada a concentraciones de 75, 100, 150 y 200 nM.  $K_{Dn}$  y  $K_{Dref}$  se calcularon a partir de los sensogramas respectivos y se utilizaron para determinar RE como se describe más adelante.

**Figura 6.** Secuencias de aminoácidos de los  $V_L$ s humanos seleccionados basadas en afinidad para la proteína L y tamaño de calva. Los puntos en las entradas de la secuencia indican identidad de aminoácidos con HVLP333. Se incluyen guiones para alineación de la secuencia. Véase la BASE V ([http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?module=pagemaster&PAGE\\_user\\_op=view\\_page&PAGE\\_id=7&MMN\\_position=5:5](http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?module=pagemaster&PAGE_user_op=view_page&PAGE_id=7&MMN_position=5:5)) para numeración de las secuencias y designación de la CDR. L6, A27, L2, L16,

O2/O12, A30 y 1b son designaciones de la línea germinal V. Las designaciones de la línea germinal J aparecen entre paréntesis. NF, no encontrado.

**Figura 7.** Cromatogramas de exclusión por tamaños de dominios  $V_L$  humanos. En A, se aplicaron los  $V_L$ s a una concentración de 0,6 mg/ml. En B, se aplicaron los  $V_L$ s a su máxima concentración disponible: HVLP342, 1,0 mg/ml; HVLP3103, 5,9 mg/ml; HVLP335, 4,9 mg/ml, HVLP351, 0,89 mg/ml. "#" y "\*" representan picos agregados y monómeros, respectivamente. Los agregados se eluyen en el volumen de exclusión. El pico marcado por una flecha en el panel HVLP342 (B) es el arrastre de una operación previa.

**Figura 8.** Superposiciones de sensogramas que muestran la fijación de  $V_L$ s a la proteína L inmovilizada a concentraciones de 0,2, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5 y 10  $\mu$ M (HVLP389, HVLP351 y HVLP364); 1, 2, 3, 5, 7,5 y 10 nM (HVLP342); 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5 y 10  $\mu$ M (HVLP335); 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2 y 5  $\mu$ M (HVLP325), 0,2, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 y 5  $\mu$ M (HVLP3103) y 1, 2, 3, 4, 5 y 6 nM (HVLP324). Los sensogramas para las fijaciones de HVLP324 y HVLP342 al sitio de baja afinidad de la proteína L no se incluyen, pero los KDs calculados se registran en la Tabla 3.

**Figura 9.** Fijaciones de HVHP328PTV2 a proteína A y HVLP335PTV2 a proteína L en experimentos de resonancia de plasmones de superficie. (A) Superposiciones de sensogramas que muestran la fijación de HVH28PTV2 a proteína A inmovilizada a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 nM. (B) Superposiciones de sensogramas que muestran la fijación de HVLP335PTV2 a proteína L inmovilizada a concentraciones de 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4 y 4,5 nM. Los datos de fijación se registran en la Tabla 4.

**Figura 10.** Figura que muestra los resultados de los experimentos de microaglutinación con células de *S. aureus*. La concentración de los pentámeros decrece dos veces desde el pocillo 1 al pocillo 11, teniendo el pocillo 12 los pentámeros reemplazados con tampón de PBS. Los pocillos de la fila superior contienen pentámero de HVHP328PTV2 y los del fondo pentámero HVLP335PTV2. Las concentraciones de los pentámeros en los pocillos 1 a 6 son 215, 108, 54, 27, 13 y 7  $\mu$ g/ml, respectivamente.

### Descripción Detallada de la Invención

Es deseable identificar fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y  $V_L$  monómeros humanos estables. Tales fragmentos de anticuerpo son útiles para una gran diversidad de aplicaciones inmunoterapéuticas, y como agentes de diagnóstico y detección.

Los fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$  humanos estables pueden identificarse por cribado de alta capacidad de bibliotecas capaces de expresar una diversidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, bibliotecas de presentación de fago (preferiblemente de fago filamentoso tal como M13 o fd) pueden cribarse por infección de un campo de bacterias sensibles al fago (un césped bacteriano) con el fago, seguido por determinación de qué fagos han lisado satisfactoriamente las bacterias buscando las áreas claras exentas de bacterias, conocidas como calvas. Los fagos que exhiben  $V_{HS}$  y  $V_L$ s monómeros llamizados forman calvas de mayor tamaño en los céspedes bacterianos que los fagos que exhiben  $V_{HS}$  totalmente humanos con tendencias a la agregación. Así, el tamaño de las calvas puede utilizarse como medio de identificación de  $V_{HS}$  y  $V_L$ s monómeros raros existentes naturalmente del repertorio de  $V_H$  humanos.

El método descrito en esta memoria es útil también en la identificación de fragmentos de anticuerpos  $V_H$  y/o  $V_L$  humanos solubles y estables (la estabilidad abarca varias características, que incluyen, pero sin carácter limitante, eficiencia de replegado térmico alta, temperatura de fusión alta, mantenimiento de la funcionalidad después de larga incubación (de varios días) a 37°C, resistencia a los desnaturalizantes químicos, resistencia a las proteasas, teniendo una vida útil larga a temperaturas inferiores a 0°C, y 4°C, y a la temperatura ambiente, mantenimiento de la funcionalidad en ambientes intracelulares, y mantenimiento de la funcionalidad en el interior del cuerpo humano, por ejemplo en el torrente sanguíneo) y expresión alta de fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$  humanos.

### $V_{HS}$ y $V_L$ s humanos monómeros

Se identificaron varios  $V_{HS}$  humanos monómeros con diferentes secuencias de la línea germinal y totales (véase Figura 2) de una biblioteca de presentación de fago  $V_H$  humano naif por este método de selección basado en el tamaño de las calvas de fago. Los  $V_{HS}$  se mantienen funcionales y en forma monómera después de tratamiento con tripsina a 37°C, semanas de incubaciones a 37°C o meses de almacenamiento a 4°C, tienen altas eficiencias de replegado térmico, se producen con buenos rendimientos en *E. coli* y poseen actividad de fijación de la proteína A.

Se identificaron además varios  $V_L$ s humanos monómeros (véase la Figura 6). Los  $V_L$ s se producen también con buenos rendimientos en *E. coli* y poseen actividad de fijación de proteína L.

Dichas propiedades serán manifestadas también por  $V_{HS}$  de bibliotecas sintéticas que utilicen los  $V_{HS}$  anteriores como andamiaje. Así, tales bibliotecas pueden producir  $V_{HS}$  terapéuticos o de diagnóstico que podrían tener eficacia satisfactoria a temperatura fisiológica, vida útil prolongada y una producción eficaz en costes. La característica de alta eficiencia de replegado térmico podría aumentar adicionalmente las aplicaciones biotecnológicas de estas bibliotecas a situaciones en las cuales se requieran fijadores de  $V_H$  para mantener su actividad después de

exposición a temperaturas altas transitorias. Los  $V_{HS}$  podrían ser también muy adecuados para aplicaciones intracorpóreas debido a sus propiedades biofísicas deseables. La propiedad de fijación de la proteína A simplificará la purificación y detección de  $V_H$  en tests de diagnóstico, inmunotransferencia e inmunocitoquímica y puede aprovecharse para mejorar la eficiencia de las bibliotecas por retirada de los  $V_{HS}$  no funcionales de las mismas.

5 Análogamente, las bibliotecas que utilizan  $V_{HS}$  como entramado producirán  $V_L$ s terapéuticos o de diagnóstico que tengan propiedades análogamente deseables. Dado que los  $V_L$ s se fijan con la proteína L, la purificación y detección de  $V_L$  se simplifica aprovechando la ventaja de esta propiedad de fijación de la proteína L.

Los  $V_{HS}$  totalmente humanos consignados anteriormente con propiedades biofísicas favorables estaban basados en una secuencia de la línea germinal V simple: DP-47 ((Jespers, L. et al., 2004b; Jespers, L. et al., 2004a). La observación de que los  $V_{HS}$  humanos monómeros de este estudio proceden de 6 secuencias de la línea germinal diferentes con inclusión de DP-47, demuestra que los  $V_{HS}$  estables no están restringidos en términos de uso de genes de la línea germinal. De hecho, es muy probable que los autores de la invención hubieran aislado  $V_{HS}$  monómeros de familia y orígenes de línea germinal diferentes de los que se describen en esta memoria si no hubieran restringido la selección a un subconjunto de  $V_{HS}$  de la familia  $V_{H3}$  con actividad de fijación de la proteína A.

10 No es posible concretar aquí las mutaciones de aminoácidos (Tabla 1) responsables del comportamiento biofísico observado de los presentes  $V_{HS}$  debido a la aparición de mutaciones múltiples en  $V_{HS}$  y al hecho de que se sabe también que CDR3 está implicado en la conformación de los perfiles biofísicos de sdAbs. Es posible, sin embargo, que mutaciones en las posiciones que se saben son importantes para la estabilidad y solubilidad de los sdAbs, v.g., V37F en HVHP423 y HVHP44B, o mutaciones que aparecen múltiples veces en la misma posición, v.g., L5V/Q y V5Q en nueve  $V_{HS}$ , tengan un papel en la determinación de las propiedades biofísicas de  $V_{HS}$ . En términos de construcción de bibliotecas, sería deseable que el carácter monómero de los presentes  $V_{HS}$  no sea dependiente de CDRs, en particular CDR3, a fin de que la aleatorización de CDR pueda realizarse sin la preocupación de comprometer la estabilidad de la biblioteca. A este respecto, los  $V_{HS}$  con CDR3 menor, v.g., HVHP82, pueden ser andamiajes preferidos, dado que ello implicaría menos dependencia de CDR3 para la estabilidad.

25 Se han descrito cierto número de enfoques evolutivos para la selección de proteínas con propiedades biofísicas mejoradas (Forrer, P. et al., 1999; Waldo, G.S., 2003); (Jespers, L. et al., 2004a; Jung, S. et al., 1999; Matsuura, T. et al., 2003). Típicamente, se requiere una presión de estabilidad para asegurar la selección preferencial de las variantes estables sobre las inestables o menos estables, de una población de biblioteca. Por ejemplo, en un trabajo afín, se requirió tratamiento térmico de bibliotecas de presentación del fago  $V_H$  para seleccionar  $V_{HS}$  resistentes a la agregación (Jespers, L. et al., 2004a). Ejemplos de enfoques de selección evolutivos que implican presentación de fago incluyen presentación de fago convencional, fagos selectivamente infectivos y los enfoques de proteólisis. En los dos primeros enfoques se utiliza selección por afinidad para seleccionar especies estables de una biblioteca, basadas en la hipótesis de que las proteínas estables poseen mejores propiedades de fijación a su ligando que las inestables. Sin embargo, aun con la inclusión adicional de un paso de selección por estabilidad, estos enfoques pueden enriquecer fundamentalmente por mayor afinidad más que por mayor estabilidad (Jung, S. et al., 1999). Un requerimiento de pasos de fijación limita también la aplicabilidad de estos enfoques a proteínas con ligandos conocidos. El tercero, enfoque de proteólisis, está basado en el hecho de que las proteínas estables son generalmente compactas y por consiguiente son resistentes a las proteasas, mientras que las inestables no lo son. El formato de presentación de fago se modifica por ingeniería genética de tal manera que la estabilidad a las proteasas de la proteína presentada se traduce en infectividad del fago. Así, cuando una biblioteca variante de presentación de fago se trata con una proteasa, únicamente los fagos que exhiben proteínas estables retienen su infectividad y pueden seleccionarse subsiguientemente por infección de un *E. coli* hospedador. Dado que este enfoque es independiente de la fijación de ligandos, el mismo es de utilidad general. Sin embargo, incluso las proteínas estables y bien plegadas tienen sitios sensibles a las proteasas, v.g. bucles y enlazadores, y esto podría impedir en algunos casos la selección de especies estables en un enfoque de proteólisis (Ban, Y. et al., 2004).

En contraste, en el presente enfoque evolutivo, los fragmentos de anticuerpo con propiedades biofísicas superiores (mayor estabilidad) se identifican directamente a simple vista. El enfoque no requiere pasos de fijación de ligando, proteólisis o desestabilización, y por consiguiente evita complicaciones que pueden encontrarse en los enfoques de selección indicados. La ausencia de requerimiento de un paso de fijación significa también que este enfoque tiene utilidad general. Como opción, puede incluirse un paso de fijación para asegurar que las proteínas seleccionadas sean funcionales. Sin embargo, la dependencia del presente enfoque respecto a la extensión en placas (para visualización de las calvas) introduce una posible limitación logística en términos de números de placas que pueden ser manipuladas y limita por tanto su aplicación a bibliotecas más pequeñas. No obstante, la utilidad del presente enfoque puede extenderse a grandes bibliotecas, si la biblioteca se reduce primero a un tamaño manejable. Esto puede hacerse, por ejemplo, por incorporación en el sistema de selección de un paso que pudiera eliminar grandes poblaciones de especies inestables, v.g., la adsorción de la biblioteca en una superficie de proteína A, o en una columna de interacción hidrófoba para eliminar proteínas deficientemente plegadas con superficies hidrófobas expuestas (Matsuura, T. et al., 2003). En este caso, el enfoque se utilizó para seleccionar fragmentos de anticuerpo  $V_{HS}$  y  $V_L$ s estables en un fondo de fragmentos  $V_{HS}$  y  $V_L$ s muy inestables. Sin embargo, puede ser más difícil seleccionar las especies "óptimas" de una biblioteca de mutantes que está poblada con proteínas que poseen estabildades razonablemente satisfactorias. En este caso, las variantes principales pueden identificarse basándose

en la tasa de formación de calvas utilizando tiempos de incubación más cortos, o basándose en criterios de tamaño de calva y frecuencia.

## EJEMPLOS

### Identificación y análisis de secuencia de V<sub>H</sub>S humanos monómeros

5 Durante el curso de la construcción de bibliotecas de V<sub>H</sub> totalmente humanos y humanos llamizados, se descubrió que los fagos que exhibían V<sub>H</sub>S llamizados monómeros formaban calvas mayores en céspedes bacterianos que los fagos que exhibían V<sub>H</sub>S totalmente humanos con tendencias a agregación. Por ello, se utilizó el tamaño de las calvas como medio para la identificación de V<sub>H</sub>S monómeros raros, existentes naturalmente a partir del repertorio de V<sub>H</sub>S humanos (**Figura 1**). A este fin, se construyó una biblioteca de fagos que exhibía V<sub>H</sub>S humanos con un tamaño de 6  
10 x 108 y se propagó en forma de calvas en placas de agar. En las placas de titulación, la biblioteca estaba constituida esencialmente por pequeñas calvas intercaladas con algunas grandes. La PCR en 20 clones reveló que las calvas pequeñas correspondían a los fagos que presentaban V<sub>H</sub>, mientras que las grandes representaban los fagos de tipo salvaje, es decir, fagos que carecían de inserciones de la secuencia V<sub>H</sub>. No se encontró ninguno de los fagos que presentaban V<sub>H</sub> con morfología de calvas grandes. Esto no era inesperado, dada la escasez de los V<sub>H</sub>S monómeros en el repertorio humano y el gran tamaño de la biblioteca. Para facilitar la identificación de V<sub>H</sub>S monómeros, se decidió reducir la biblioteca a un tamaño manejable y eliminar los fagos de tipo salvaje causantes de interferencia con morfología de gran tamaño de calva por lavado en batea de la biblioteca contra proteína A que se fija a un subconjunto de V<sub>H</sub>S humanos de la familia V<sub>H</sub>3.

Después de unas cuantas tandas de lavado en batea, la biblioteca se enriqueció en fagos que producían calvas grandes, y la PCR y la secuenciación de más de 110 de dichas calvas demostraron que todas ellas tenían marcos de lectura abiertos V<sub>H</sub> completos. El tamaño de las calvas grandes que se seleccionaron para análisis se representa en la Figura 1. La secuenciación reveló 15 V<sub>H</sub>S diferentes que pertenecían a la familia V<sub>H</sub>3 y utilizaban segmentos V de línea germinal DP-38, DP-47, V3-49, V3-53, YAC-5 u 8-1B (**Tabla 1; Figura 2**). Las secuencias de línea germinal DP-38 y DP-47 se han visto implicadas con anterioridad en fijación de proteína A. Adicionalmente, todos los V<sub>H</sub>S tenían un residuo Thr en la posición 57 (**Figura 2**), consistente por su actividad de fijación de proteína A. El segmento V de la línea germinal utilizado más frecuentemente era DP-47, que existía en más del 50% de los V<sub>H</sub>S, pero el clon más frecuente (a saber, HVHP428; frecuencia relativa 46%) utilizaba el segmento V de la línea germinal V3-49. HVHP429, con una secuencia de línea germinal DP-47, era el segundo V<sub>H</sub> más abundante con una frecuencia relativa de 21% (**Figura 2**). Las longitudes de CDR3 V<sub>H</sub> abarcaban desde 4 aminoácidos para HV<sub>H</sub>B82 hasta 16 aminoácidos para los aminoácidos de HVHP430, teniendo HVHP430 un par de residuos Cys en CDR3. Se observaron mutaciones de aminoácidos con respecto a las secuencias del segmento V de la línea germinal parental (residuos 1-94) y FR4 (residuos 103-113), en todos los V<sub>H</sub>S y estaban comprendidas entre dos mutaciones para HVHP44 (L5V y Q105R) y HV<sub>H</sub>B82 (E1Q y N5Q) hasta 16 mutaciones para HVHP426 (Tabla 1). Las mutaciones se concentraban en los segmentos V; se detectaron sólo dos mutaciones en la totalidad de los 15 FR4s, en las posiciones 105 y 108. HVHP44 y HV<sub>H</sub>B82 diferían de otros V<sub>H</sub>S en que los mismos tenían un aminoácido cargado positivamente en la posición 105 en lugar de una Gln (**Tabla 1; Figura 2**). No obstante, si bien el aminoácido con carga positiva en HVHP44 se adquiría por mutación, el de HV<sub>H</sub>B82 estaba codificado en la línea germinal. Excepto en lo que respecta a HVHP423 y HVHP44B, los V<sub>H</sub>S restantes tenían los residuos de la línea germinal en las posiciones de solubilidad principales: 37V/44G/45L/47W o 37F/44G/45L/47W (HVHP428; HVHP423 y HVHP44B tenían una mutación V37F. Las mutaciones en otras posiciones que se demuestra o se supone son importantes en la solubilidad de V<sub>H</sub> incluían siete E6Q, tres S35T/H, una R83G y una K83R, una A84P y una T84A y una M108L. Se observaban también mutaciones frecuentes en las posiciones 1 y 5 que incluían once E1Q, ocho L5V/Q y una mutación V5Q.

### Caracterización biofísica de los V<sub>H</sub>S humanos

45 Todos los V<sub>H</sub>S excepto HVHP44B, que era esencialmente el mismo que HVHP423, se expresaban en volúmenes de cultivo de 1 litro en la cepa TG1 de E. coli en fusión con el marcador c-Myc-His5 y se purificaron hasta homogeneidad de extractos periplásmicos por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). Los rendimientos de expresión oscilaban desde 1,8 a 62,1 mg de proteína purificada por litro de cultivo bacteriano en matraces de sacudidas, teniendo la mayoría de los V<sub>H</sub>S rendimientos de varios miligramos (Tabla 2). En el caso de HVHP423 y HVHP430, otra prueba en condiciones de expresión "aparentemente" iguales dieron rendimientos de 2,4  
50 y 6,4 mg frente 62,1 y 23,7 mg, respectivamente. Esto implica que para muchos de los V<sub>H</sub>S descritos en esta memoria deberían alcanzarse condiciones de expresión óptimas, sin mucho esfuerzo, dando como resultado rendimientos de expresión significativamente mayores que los valores consignados en la Tabla 2. Como era de esperar, la totalidad de los V<sub>H</sub>S se fijaban a la proteína A en análisis de resonancia de plasmones de superficie (SPR), con KDs de 0,2-3 μM, un intervalo y magnitud comparables a los consignados previamente para variantes de V<sub>H</sub>H de llama con actividad de fijación de proteína A. Ninguno de los V<sub>H</sub>S se fijaba a la superficie de referencia de Fab.

La tendencia a la agregación de los V<sub>H</sub>S humanos se evaluó en términos de sus estados de oligomerización por cromatografía de filtración en gel y NMR (Tabla 2). Todos los V<sub>H</sub>S se sometieron a cromatografía de filtración en gel

Superdex 75. Análogamente a un  $V_{HS}$  de llama, es decir, H11C7, todos los  $V_{HS}$  daban un soplo pico simétrico para el volumen de elución esperado para un monómero, y estaban sustancialmente exentos de cualesquiera agregados (véase el ejemplo para HVHP428 en la Figura 3A). En contraste, un  $V_H$  humano típico (a saber, BT32/A6) formaba una cantidad considerable de agregados. Para tres de los  $V_{HS}$ , se observó también un pico menor con una movilidad esperada para un dímero de  $V_H$ . Los análisis SPR de los picos menores daban valores de tasa de disociación que eran significativamente más lentos que los correspondientes a los  $V_{HS}$  monómeros, consistentes con el hecho de que se trataba de dímeros. El pico del dímero se observó también en el caso del  $V_{H1}$  de llama, H11C7. Los estados de plegado y oligomerización de los  $V_{HS}$  a concentraciones altas se estudiaron ulteriormente por espectroscopia NMR. Como se muestra en la Tabla II, todas las proteínas  $V_H$  estudiadas parecían ser relativamente solubles y asumían una estructura tridimensional bien plegada. Los espectros NMR unidimensionales de los fragmentos  $V_H$  (Fig. 3B) exhibían pliegues estructurales característicos de dominios  $V_H$ . El estado de agregación de las proteínas se evaluó también por el uso de un experimento de difusión PFG-NMR para el fragmento HVHP414 y dos isoformas,  $V_{H14}$  y  $V_{H14}$ -cMyc- con y sin la secuencia c-Myc, del HVHP414.  $V_{H14}$  es una versión modificada de HVHP414 con una mutación c-Myc N132E y con un residuo metionina adicional en el término N. En resumen, los datos PFG-NMR (no presentados) indicaban que todas las muestras de proteína tenían los pesos moleculares monómeros esperados incluso a las concentraciones de proteína relativamente altas utilizadas para los experimentos NMR.

Se investigó ulteriormente la estabilidad de los  $V_{HS}$  en términos de su resistencia a tripsina respecto a la integridad a 37°C después de incubaciones largas a 37°C. La tripsina escinde las cadenas principales amídicas de los polipéptidos en el término C de un residuo Arg o Lys. Existen 9-13 residuos Arg y Lys en los  $V_{HS}$  humanos (**Figura 2**). Existe también un residuo Lys adicional en el marcador c-Myc del terminal C que es sensible a la digestión por tripsina. La **Figura 4a** es un análisis SDS-PAGE de HVHP414 durante la digestión con tripsina. En el transcurso de una hora, la banda original se convertía completamente en un producto simple que tenía una movilidad esperada para el  $V_H$  sin marcador c-Myc-His<sub>5</sub> alguno. Se obtuvo el mismo resultado para otros 12  $V_{HS}$  después de una incubación de una hora con tripsina. La espectrometría de masas en una muestra seleccionada al azar de los  $V_{HS}$  tratados con tripsina (a saber, HVHP414, HVHP419, HVHP420, HVHP423, HVHP429, HVHP430 y HVHM81) confirmó que en todos los casos la masa molecular del producto digerido correspondía a un  $V_H$  con el c-Myc Lys como el residuo C-terminal. HVHM41 daba un fragmento significativamente más corto que el resto después de digestión, y en este caso los experimentos de espectrometría de masas mapeaban el sitio de escisión al Arg 99 en CDR3 (datos no presentados).

Once  $V_{HS}$  comprendidos en concentración desde 0,32 mg/ml (HVHP428) hasta 3,2 mg/ml (HVHP420) se incubaron a 37°C durante 17 días. Su estabilidad se determinó subsiguientemente en términos de estado de oligomerización y fijación de proteína A. Como se demostró por cromatografía de permeación en gel, el tratamiento de  $V_{HS}$  a 37°C no producía formación alguna de agregados: todos los  $V_{HS}$  daban perfiles de cromatograma que eran virtualmente idénticos a los de  $V_{HS}$  sin tratar y se mantenían esencialmente como monómeros (véase el ejemplo para HVHP420; **Figura 4c**). Para asegurar que los  $V_{HS}$  mantenían su plegamiento nativo después del tratamiento a 37°C, se seleccionaron al azar dos  $V_{HS}$ , a saber, HVHP414 (1,2 mg/ml) y HVHP420 (3,2 mg/ml), y se determinaron sus  $K_{DS}$  de fijación a la proteína A por SPR (datos presentados para HVHP420; recuadro en la **Figura 4c**) y se compararon con los  $K_{DS}$  obtenidos para  $V_{HS}$  sin tratar (Tabla 2). Los  $K_{DS}$  calculados para los  $V_{HS}$  tratados térmicamente eran 1,4  $\mu$ M y 1,0  $\mu$ M para HVHP414 y HVHP420, respectivamente. Estos valores son esencialmente idénticos a los valores correspondientes para los  $V_{HS}$  sin tratar (Tabla 2), demostrando que el tratamiento de  $V_{HS}$  a 37°C no afectaba a su plegamiento nativo. La posibilidad de que los  $V_{HS}$  puedan haber estado en un plegamiento no nativo menos compacto durante los periodos de incubación a 37°C y hayan adquirido nuevamente su plegamiento nativo después de volver a la temperatura ambiente durante los experimentos de filtración en gel y SPR es poco probable en vista del hecho de que los  $V_{HS}$  eran resistentes a tripsina a 37°C (véase arriba), una propiedad asociada típicamente para proteínas nativas bien plegadas.

La eficiencia de replegado ( $RE$ ) de los  $V_{HS}$  humanos se investigó por comparación de los valores  $K_{DS}$  de la fijación de los  $V_{HS}$  nativos ( $K_{DN}$ ) y los replegados y tratados térmicamente ( $K_{Dref}$ ) a la proteína A (**Tanha, J. et al., 2002**). Cuando se desactiva una fracción del  $V_H$  por tratamiento térmico, el valor  $K_D$  medido sería mayor, dado que este parámetro está basado en la concentración de fragmento de anticuerpo plegado, es decir, activo. Así, la ratio de  $K_{DN}$  a  $K_{Dref}$  da una medida de la  $RE$  de  $V_H$ . La **Figura 5** compara sensogramas para fijación de HVHP483 a proteína A inmovilizada en estados nativo (líneas gruesas) y replegado (líneas delgadas) para varias concentraciones de  $V_H$  seleccionadas. Como puede verse, la fijación del  $V_H$  replegado a la proteína A es menor en todos los casos, lo que indica que el desplegado no es totalmente reversible. Para cada uno de los 14  $V_{HS}$ , se midió la fijación a la proteína A en ambos estados nativo y replegado a varias concentraciones, y se determinaron los valores  $K_{DS}$  y subsiguientemente  $REs$  (**Tabla 2**, no se muestran los valores  $K_{Dref}$ ). Se determinaron también los valores  $K_{DS}$  y  $REs$  de dos  $V_{H1}$ s anti-idiotípicos de llama, H11F9 y H11B2, que se utilizaron como referencias. Cuatro  $V_{HS}$  tenían  $REs$  en el intervalo de 92%-95%, similares a las  $REs$  para H11F9 y H11B2, 95% y 100%, respectivamente. Otros cinco tenían  $REs$  en el intervalo de 84%-88% y tres superiores a 70%. Únicamente dos tenían  $RE$  significativamente menor: HVHP413 (52%) y HVHP421 (14%). Varios  $V_{H1}$ s publicados examinados con anterioridad tenían  $RE$  próxima a 50% (**van der Linden, R.H. et al., 1999**).

**Construcción y lavado en batea de bibliotecas de presentación de fago  $V_H$  humanas.** Se sintetizó cDNA a partir de mRNA de bazo humano (Ambion Inc., Austin, TX) utilizando iniciadores hexanucleotídicos aleatorios y el kit de

DNA de la Primera Cadena™ (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canadá). Utilizando los cDNAs como molde, genes de  $V_H$  con secuencias  $C_H$  flanqueantes se amplificaron por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en nueve reacciones separadas utilizando iniciadores específicos de la región de entramado 1 (FR1) de  $V_H$  y un iniciador específico de inmunoglobina M (de Haard, H.J. *et al.*, 1999). Los productos se purificaron en gel y se utilizaron como el molde en la segunda tanda de PCR para construir genes de  $V_H$  utilizando los iniciadores específicos de FR1 y FR4 (de Haard, H.J. *et al.*, 1999) que introdujeron también sitios de restricción flanqueantes *ApaI* y *NotI* para propósitos de clonación. Los DNAs resultantes del repertorio  $V_H$  se clonaron en el vector de fago fd-tetGIIID y se construyó una biblioteca de presentación de fago de  $V_H$  (Tanha, J. *et al.*, 2001). El lavado en batea contra proteína A (Amersham Biosciences Inc.) se realizó como ha sido descrito (Tanha, J. *et al.*, 2001). La asignación de secuencias de la línea germinal de los  $V_H$ s seleccionados se realizó utilizando el software DNAPLOT, Version 2.0.1 y V BASE Version 1.0. (<http://vbase.dnplot.de/cgi-bin/vbase/vsearch.pl>). Se aislaron los  $V_H$ s de llama H11C7, H11F9 y H11P2 de una biblioteca de presentación de fagos  $V_H$ H de llama por lavado en batea contra H11 scFv como se ha descrito (Tanha, J. *et al.*, 2002).

**Expresión y purificación de  $V_H$ .** Se clonaron  $V_H$ s en vectores de expresión pSJF2 por técnicas estándar de clonación (Sambrook, J. Fritsch E.F. y Maniatis P, 1989). La expresión periplásmica de sdAbs y la purificación subsiguiente por cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC) se realizaron como se ha descrito (Muruganandam, A. *et al.*, 2002). Las concentraciones de proteínas se determinaron por medidas de  $A_{280}$  utilizando los coeficientes de absorción molar calculados para cada proteína (Pace, C.N. *et al.*, 1995). La cromatografía de filtración en gel de los  $V_H$ s purificados se realizó en una columna Superdex 75 (GE Healthcare) como ha sido descrito (Deng, S.J. *et al.*, 1995).

**Experimentos de eficiencia de fijación y replegado.** Las constantes de disociación de equilibrio ( $K_{Ds}$ ) y las eficiencias de replegado ( $REs$ ) de  $V_{HS}/V_{HHs}$  se derivaron de datos de resonancia de plasmones de superficie (SPR) recogidos con el sistema biosensor BIACORE 3000 (Biacore Inc., Piscataway, NJ). Para medir la fijación de  $V_{HS}$  a la proteína A, se inmovilizaron 2000 unidades de resonancia (RUs) de proteína A o un fragmento de fijación de antígeno (Fab) de referencia sobre chips sensores CM5 de grado investigación (Biacore Inc.). Las inmovilizaciones se realizaron a concentraciones de 25  $\mu\text{g/ml}$  (proteína A) o 50  $\mu\text{g/ml}$  (Fab) en tampón de acetato de sodio 10 mM de pH 4,5, utilizando el kit de acoplamiento de aminas proporcionado por el fabricante. Para medir la fijación de los  $V_{HHs}$  anti-idiotípicos de llama a H11 scFv, se inmovilizaron 4100 RUs de H11 scFv de 50  $\mu\text{g/ml}$  o 3000 RUs de Se1554 IgG de referencia de 10  $\mu\text{g/ml}$ , como se ha descrito arriba. En todos los casos, los análisis se realizaron a 25°C en HEPES 10 mM, de pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005% de P20 a un régimen de flujo de 40  $\mu\text{l/min}$ , y las superficies se regeneraron por lavado con el tampón de desplazamiento. Para determinar las actividades de fijación de las proteínas replegadas, se desnaturalizaron  $V_{HS}$  o  $V_{HHs}$  por incubación a 85°C durante 20 min a concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Las muestras de proteína se enfriaron luego a la temperatura ambiente durante 30 min y se replegaron y centrifugaron subsiguientemente en una microcentrífuga a 14000 rpm durante 5 min a la temperatura ambiente para eliminar cualesquiera precipitados de proteína. Se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron respecto a actividad de fijación por SPR como se ha descrito arriba. Tanto para las proteínas plegadas como para las replegadas, se ajustaron los datos a un modelo de interacción 1:1 simultáneamente utilizando software BIAevaluation 4.1 (Biacore Inc.) y se determinaron subsiguientemente los valores  $K_{Ds}$ . Los valores  $REs$  se determinaron a partir de

$$RE = \frac{K_{Dn}}{K_{Dref}} \times 100$$

donde  $K_{Dn}$  es el valor  $K_D$  de la proteína nativa y  $K_{Dref}$  es el valor  $K_D$  de la proteína replegada.

**Experimentos de digestión con tripsina.** Se añadieron 3  $\mu\text{l}$  de una tripsina de grado secuenciación de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  recién preparada (Hoffmann-La Roche Ltd., Mississauga, ON, Canadá) en HCl 1 mM a 60  $\mu\text{g}$  de  $V_H$  en tampón Tris-HCl 100 mM de pH 7,8. Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen total de 60  $\mu\text{l}$  durante 1 hora a 37°C y se pararon por adición de 5  $\mu\text{l}$  de inhibidor de tripsina de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Sigma, Oakville, ON, Canadá). Una vez completada la digestión, se retiraron 5  $\mu\text{l}$  y se analizaron por SDS-PAGE; el resto se desaló utilizando ZipTip<sub>C4</sub> (Millipore, Nepean, ON, Canadá), se eluyó con ácido acético al 1% en metanol:agua 50:50 y se sometió a determinación de la masa de  $V_H$  por espectrometría de masas MALDI.

**Estudios de estabilidad de las proteínas a 37°C.** Anticuerpos mono-dominio (sdAbs) a concentraciones de 0,32-3,2 mg/ml se incubaron a 37°C en tampón PBS durante 17 días. Después de la incubación, las muestras de proteína se centrifugaron en una microcentrífuga a la velocidad máxima durante 5 min incluso en ausencia de cualquier formación visible de agregados. Las muestras se aplicaron luego a una columna de exclusión por tamaños Superdex 75 (GE Healthcare) y los picos de monómero se recogieron para análisis SPR contra proteína A. Los análisis SPR se efectuaron como se ha descrito arriba excepto que se inmovilizaron 500 RUs de proteína A o Fab de referencia y que las inmovilizaciones se realizaron a concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

**Experimentos NMR.** Muestras de  $V_H$  para análisis NMR se disolvieron en fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, y  $\text{NaN}_3$  al 0,02% a pH 7,0. Las concentraciones de proteína eran 40  $\mu\text{M}$ -1,0 mM. Todos los experimentos NMR se realizaron a 298 K en un espectrómetro Bruker Avance-800 o Bruker Avance-500 NMR. Los espectros  $^1\text{H}$  NMR unidimensionales (1D) se registraron con 16384 puntos de datos y las anchuras espectrales eran 8992,81 Hz a 500 MHz y 17605,63 Hz a 800 MHz, respectivamente. Se adquirieron espectros  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY bidimensionales de 2048 x 400 puntos de datos en un espectrómetro Bruker Avance-800 NMR con una anchura espectral de 11990,04 Hz y un tiempo de mezcla de 120 ms. En todos los experimentos NMR, la supresión del agua se consiguió utilizando el método WATERGATE implementado por el tren de impulsos 3-9-19 (Piotto, M. *et al.*, 1992; Sklenar, V. *et al.*, 1993). Los datos NMR se procesaron y analizaron utilizando el paquete de software Bruker XWINNMR. Todas las medidas de difusión PFG-NMR se realizaron con la secuencia LED previa supresión del agua (Altieri, A.S. *et al.*, 1995), en un espectrómetro Bruker Avance-500 NMR, equipado con una sonda de resonancia triple con gradientes triaxiales. Los espectros unidimensionales de protones se procesaron y analizaron utilizando el paquete de software Bruker XWINNMR. Las intensidades de las señales NMR se obtuvieron por integración de los espectros NMR en la región de los protones de metilo y metileno (2,3 ppm a -0,3 ppm), donde todas las señales NMR se atenúan uniformemente para todas las concentraciones de PFG dadas.

**Construcción y lavado en batea de bibliotecas de presentación de fago humanas  $V_L$ .** Se sintetizaron cDNAs a partir de mRNA de bazo humano como se ha descrito arriba para los  $V_{HS}$  humanos. Se utilizó el cDNA como molde en la PCR para amplificar los genes  $V_L$  en volúmenes de reacción de 50  $\mu\text{l}$  utilizando seis iniciadores  $V_K$  inversos, once iniciadores  $V_\lambda$  inversos (de Haard, H.J. *et al.*, 1999), cuatro iniciadores  $V_K$  directos y dos iniciadores  $V_\lambda$  directos (Sblattero, D. *et al.*, 1998). Los iniciadores inversos y directos se modificaron de modo que tuvieran sitios de restricción flanqueantes *Apa* I y *Not* I, respectivamente, para propósitos de clonación subsiguientes. Los iniciadores directos se agruparon en ratios que reflejaban su grado de degeneración. Los genes  $V_\lambda$  se sometieron a PCR en once reacciones separadas utilizando los iniciadores directos  $V_\lambda$  agrupados y once iniciadores inversos  $V_\lambda$  individuales. Análogamente, los genes  $V_\lambda$  se amplificaron en seis reacciones separadas utilizando los iniciadores directos  $V_K$  agrupados y seis iniciadores inversos  $V_\lambda$  individuales. Los productos PCR se agruparon, se purificaron en gel y se digirieron con las endonucleasas de restricción *Apa* I y *Not* I. La biblioteca se construyó como se describe para los  $V_{HS}$  humanos. La PCR de las calvas se realizó sobre colonias de bibliotecas individuales y los genes  $V_L$  amplificados se secuenciaron como se ha descrito (Tanha, J. *et al.*, 2003). El lavado en batea contra la proteína L (Biolynx Inc., Brockville, ON, Canadá) y la asignación de la secuencia de la línea germinal de los  $V_{HS}$  seleccionados se realizaron como se ha descrito arriba para la biblioteca  $V_H$  humana.

**Expresión y purificación de  $V_L$ .** La expresión, purificación, determinación de la concentración y cromatografía de filtración en gel de  $V_L$  se realizaron como se ha descrito para  $V_{HS}$  en "expresión y purificación de  $V_H$ ".

**Expresión y purificación de pentámeros de  $V_L$  y  $V_H$ .** Se utilizaron iniciadores específicos en una PCR para amplificar los genes HVHP328  $V_H$  y HVLP335  $V_L$ . Se utilizaron técnicas estándar de clonación para clonar los genes HVHP328 y HVLP335 en fusión con el gen del dominio de pentamerización VT1B en un vector de expresión para producir pentámeros HVHP328PVT2 y HVLP335PTV2, (Zhang, J. *et al.*, 2004). Los pentámeros se expresaron y purificaron como se ha descrito (Zhang, J. *et al.*, 2004). Las concentraciones de proteína se determinaron como anteriormente.

**Resonancia de plasmones de superficie de  $V_L$ s.** Las cinéticas de fijación para la interacción de los  $V_L$ s a la proteína L se determinaron por SPR utilizando el sistema biosensor BIACORE 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). 680 RUs de proteína L u 870 RUs de una referencia Fab se inmovilizaron sobre chips sensores CM5 de grado investigación (Biacore). Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a una concentración de proteína de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en tampón de acetato 10 mM de pH 4,5 utilizando el kit de acoplamiento de aminas suministrado por el fabricante. Todas las medidas se realizaron a 25°C en tampón HEPES 10 mM de pH 7,4, que contenía NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,005% de P20 a un régimen de flujo de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  o 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Las superficies se regeneraron por lavado con el tampón de desplazamiento. Los datos se evaluaron utilizando el software BIAevaluation 4.1 (Biacore, Inc.).

**Resonancia de plasmones de superficie de los pentámeros de  $V_L$  y  $V_H$ .** Se determinaron también por SPR las cinéticas de fijación para la interacción de HVHP328PVT2 con proteína A y HVLP335PTV2 con proteína L. Se inmovilizaron como anteriormente 520 RUs de proteína A o una Fab de referencia. Para el pentámero de  $V_L$ , se utilizaron las mismas superficies preparadas anteriormente. Las medidas se efectuaron como anteriormente pero a un régimen de flujo de 20  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Las superficies se regeneraron por lavado con HCl 50 mM durante 3 s. Los datos se evaluaron como se ha descrito para los monómeros.

#### Microaglutinación de células

Se utilizó una sola colonia de *S. aureus* de una placa BHI para inocular 15 ml de medio BHI. Las bacterias se dejaron crecer durante una noche a 37°C a 200 rpm. A la mañana siguiente, se centrifugó el cultivo en una centrífuga Sorvall RT6000B refrigerada de cubeta oscilante a 4000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en tampón PBS. Se centrifugaron de nuevo las células, se retiró el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió de nuevo en tampón PBS. Se diluyeron las células a un valor  $A_{600}$  de 1,0, y se extendieron diluciones en serie de las células en placas BHI a 37°C para crecimiento durante

la noche. A la mañana siguiente se determinó el título de células. Un valor  $A_{600}$  de 1,0 correspondía a  $1,5 \times 10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Se dieron pasos idénticos para preparar células de la cepa TG1 de *E. coli* para ensayos subsiguientes de microaglutinación, excepto que el medio de crecimiento era 2 x YT. Los recuentos viables fueron similares,  $A_{600}$  1,0 =  $2,1 \times 10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$ .

- 5 Para realizar los ensayos de microaglutinación, se realizaron diluciones al doble de HVHP328PVT2 en PBS de los pocillos 1 a 11 en una placa de microtitulación. El pocillo 12 (blanco) tenía únicamente PBS. El volumen total en cada pocillo era 50  $\mu\text{l}$ . Subsiguientemente, se añadieron  $1 \times 10^8$  células de *S. aureus* en 50  $\mu\text{l}$  de PBS a todos los pocillos, y la placa se incubó durante una noche a 4°C. Para lograr un registro permanente de los resultados, se tomó una fotografía de la placa durante la mañana. Para el experimento de control de pentámeros, se reemplazó HVHP328PVT2 con el pentámero de  $V_L$ , HVLP335PTV2. En los experimentos de control de células, se repitieron las dos mismas series de experimentos con células TG1 de *E. coli*.

#### Identificación y análisis de la secuencia de los $V_L$ s humanos monómeros

- 15 Se aplicó esencialmente el mismo método de selección empleado para aislar  $V_{HS}$  solubles a partir de una biblioteca de presentación de fago  $V_H$  humana a una biblioteca humana de  $V_L$  para aislar los  $V_L$ s solubles monómeros. Se construyó una biblioteca de  $V_L$  humana con un tamaño de  $3 \times 10^6$ . Se seleccionaron veinticuatro calvas de las placas de titulación de la biblioteca y sus genes  $V_L$  se sometieron a PCR y se secuenciaron. Las secuencias eran diversas en términos de origen de la línea germinal, aunque el 75% de los  $V_L$ s eran de origen  $V\lambda$  (datos no presentados). Tres tandas de lavado en batea contra la proteína L dieron como resultado el enriquecimiento ...

- 20 Para realizar los ensayos de microaglutinación, se realizaron diluciones al doble de HVHP328PVT2 en PBS de los pocillos 1 a 11 en una placa de microtitulación. El pocillo 12 (blanco) tenía únicamente PBS. El volumen total en cada pocillo era 50  $\mu\text{l}$ . Subsiguientemente, se añadieron  $1 \times 10^8$  células de *S. aureus* en 50  $\mu\text{l}$  de PBS a todos los pocillos, y la placa se incubó durante una noche a 4°C. Para lograr un registro permanente de los resultados, se tomó una fotografía de la placa durante la mañana. Para el experimento de control de pentámeros, se reemplazó HVHP328PVT2 con el pentámero de  $V_L$ , HVLP335PTV2. En los experimentos de control de células, se repitieron las dos mismas series de experimentos con células TG1 de *E. coli*.

#### Identificación y análisis de la secuencia de $V_L$ s humanos monómeros

- 30 Se aplicó esencialmente el mismo método de selección empleado para aislar  $V_{HS}$  solubles de una biblioteca de presentación de fago  $V_H$  humana a una biblioteca  $V_L$  humana para aislar los  $V_L$ s solubles monómeros. Se construyó una biblioteca  $V_L$  humana con un tamaño de  $3 \times 10^6$ . Se seleccionaron 24 calvas de las placas de titulación de la biblioteca y sus genes  $V_L$  se sometieron a PCR y se secuenciaron. Las secuencias eran diversas en términos de origen de la línea germinal, aunque el 75% de los  $V_L$ s eran de origen  $V\lambda$  (datos no presentados). Tres tandas de lavado en batea contra la proteína L dieron como resultado el enriquecimiento de calvas grandes. Treintinueve de las calvas grandes se secuenciaron y se identificaron treinta y dos secuencias singulares (**Figura 6**). HVLP325, HVLP335 y HVLP351 aparecían con frecuencia de 3, 4 y 2, respectivamente. Excepto HVLP389 que es de la clase lambda (subgrupo  $V\lambda 1$ , línea germinal 1b), los 31  $V_L$  restantes pertenecían a la clase  $V\kappa$ . De los 31  $V_L$ s Kappa, 24 caen dentro del subgrupo  $V\kappa III$  y 7 dentro del subgrupo  $V\kappa 1$ . Dieciséis de las 24 secuencias  $V\kappa III$  utilizan la secuencia de línea germinal L6, utilizando las restantes las secuencias de línea germinal A27, L2 y L6. Los  $V_L$ s del subgrupo  $V\kappa 1$  se originan a partir de la secuencia de línea germinal O2/O12 o A30. En la posición 96 se producían mutaciones notables. Los aminoácidos de la línea germinal en esta posición son aminoácidos aromáticos e hidrófobos Trp, Phe, Tyr, Leu o Ile para  $V_L$ s kappa y Tyr, Val o Ala para los  $V_L$ s lambda. Pero en la agrupación seleccionada de  $V_L$ s kappa únicamente 5 de 31 tienen sus aminoácidos de la línea germinal en la posición 96: HVLP325, HVLP349, HVLP388, HVLP3109 y HVLP393. Veintiún aminoácidos en la posición 96 están cargados, de los cuales 20 tienen carga positiva: Arg, Lys o His. Dos aminoácidos son Pro, uno Gln, uno Ser y uno Thr. De siete  $V_L$ s kappa analizados por cromatografía de filtración en gel respecto a carácter monómero, seis que tenían Arg o Lys en la posición 96 eran también monómeros, en tanto que HVLP325 con el aminoácido Leu de la línea germinal en la posición 96 formaba agregados (véase más adelante). Análogamente, HVLP389 que era de la clase lambda y tenía una mutación de la línea germinal a Ser era también monómero (véase más adelante). Estos datos correlacionan la desviación de los aminoácidos de la línea germinal en la posición 96 (27 de 32) con propiedades biofísicas mejoradas de  $V_L$ s tales como el carácter monómero.

- 50 Dieciocho  $V_L$ s de la clase kappa tenían sus tres últimos residuos (105-107) reemplazados con aminoácidos Thr, Val y Leu que se encuentran únicamente en los  $V_L$ s lambda. Estas sustituciones pueden haber tenido un papel en la mejora de las propiedades biofísicas de los  $V_L$ s kappa, dando como resultado la selección de los  $V_L$ s mencionados anteriormente sobre los clones parentales con los residuos kappa originales en la posición 105-107.

#### Caracterización de los $V_L$ s humanos

- 55 Ocho de los  $V_L$ s seleccionados con orígenes diferentes de la línea germinal V se expresaron en *E. coli* en cultivos de 1 litro y se purificaron: HVLP324, HVLP325, HVLP335, HVLP342, HVLP351, HVLP364, HVLP389 y HVLP3103

(Tabla 6). Todos ellos se expresaban con buenos rendimientos comprendidos entre 6,2 mg para HVLP324 y alrededor de 75 mg para HVLP335 y HVLP364.

La tendencia a la agregación de los  $V_L$ s humanos se evaluó en términos de su estado de oligomerización por cromatografía de filtración en gel. Los  $V_L$ s se sometieron a cromatografía de filtración en gel Superdex 75 a una concentración de 0,6 mg/ml. Todos excepto HVLP325 estaban esencialmente exentos de agregados y daban picos simples simétricos con el peso molecular medio aparente de 12,7 kDa (intervalo, 6,2-19,2 kDa) (**Figura 7a y Tabla 3**). Esto está de acuerdo con la masa molecular esperada para  $V_L$ s monómeros, 13,4-13,8 kDa. La variación de masa molecular aparente para anticuerpos mono-dominio ha sido consignada previamente (Jespers, L. *et al.*, 2004a; Stevens, F.J. *et al.*, 1980). Para HVLP325, los agregados formaban 11% de la proteína total (agregado más monómero). HVLP351, HVLP342, HVLP335 y HVLP3103 eran todavía monómeros cuando se testaron a su máxima concentración disponible, a saber, 0,89 mg/ml, 1,0 mg/ml, 4,9 mg/ml y 5,9 mg/ml, respectivamente (**Figura 7B**).

Se sometieron los  $V_L$ s a cromatografía con Superdex-75 antes del análisis BIACORE y los picos de monómero purificados se recogieron incluso en ausencia de cualquier evidencia de material agregado. En el análisis SPR, todos los  $V_L$ s seleccionados se fijaban a proteína L (**Figura 8**). Esto no era inesperado, dado que los  $V_L$ s se aislaron por lavado en batea contra proteína L. Para todos ellos, los valores  $K_{DS}$  de fijación a proteína L estaban comprendidos entre 0,6 y 3  $\mu$ M (Tabla 3). HVLP324 y HVLP342 tenían valores  $K_{DS}$  adicionales más pequeños, 10 nM y 10 nM, respectivamente. Las fijaciones de afinidad baja y de afinidad alta de los  $V_L$ s del subgrupo Vkl a la proteína L han sido consignadas previamente (referencia). Ambos, HVLP324 y HVLP342, pertenecen al subgrupo Vkl (**Tabla 3**). Como era de esperar, los datos cinéticos y de equilibrio eran consistentes con el hecho de que pico monómero fuera realmente monómero.

#### Análisis de fijación de pentámeros

Las fijaciones del pentámero HVLP328PVT2 a proteína A y del pentámero HVLP335PTV2 a proteína L se determinaron por resonancia de plasmones de superficie (**Figura 9**). Las tasas de asociación se calcularon independientemente a partir de gráficas de  $K_{obs}$  frente a la concentración. Pudo calcularse más de una tasa de disociación ( $k_d$ ) debido a la heterogeneidad en fijación multivalente entre la población de pentámeros. Por esta razón, pudo obtenerse más de una constante de disociación de equilibrio,  $K_D$ . HVLP328PTV2 y HVLP335PTV2 tenían valores  $K_{DS}$  mínimos de 2 mM y 200 pM, respectivamente (**Tabla 4**). Con  $K_{DS}$  más lentas, HVLP328PTV2 y HVLP335PTV2 tenían valores  $K_{DS}$  tan bajos como 900 y 90 pM, respectivamente.

#### Detección de patógenos por $V_L$ s y $V_H$ s

La actividad de fijación a proteína A y L de los  $V_H$ s y  $V_L$ s puede utilizarse para detectar bacterias que tienen proteína A y/o L en sus superficies. Esto es posible si los  $V_H$ s y  $V_L$ s son solubles y monómeros (falta de tendencia a agregarse) tales como los  $V_H$ s y  $V_L$ s de esta invención. Los dominios variables derivados de anticuerpos que carecen de cadenas ligeras tales como los anticuerpos de cadena pesada de Camélidos o los IgNARs de tiburón nodriza o tiburón alfombra son naturalmente solubles y monómeros. De éstos, los que poseen actividad de fijación a proteína A y L pueden utilizarse también para detectar bacterias que tienen proteína A y/o L en sus superficies. La proteína A está presente en la superficie de las bacterias patógenas, *Staphylococcus aureus*. Así, los  $V_H$ s con actividad de fijación a proteína A tales como los descritos en esta memoria pueden utilizarse para detectar *S. aureus*. Los inventores realizaron un ensayo de microaglutinación para detectar la capacidad del pentámero de  $V_H$  HVLP328PVT2 para fijarse a *S. aureus*. Se incubaron un número constante de células bacterianas con diluciones al doble de HVLP328PVT2 en pocillos de microtitulación (pocillos 1-11) (**Figura 10**). El pocillo 12 contenía tampón en lugar del pentámero. Si los  $V_H$ s se fijan a las células bacterianas, entonces el pentámero, debido a su naturaleza multímera, debería ser capaz de reticular las células y dar como resultado aglutinación celular. Las células aglutinadas aparecerán como células difusas en un pocillo de microtitulación (**Figura 10**). En ausencia de cualquier fijación, no ocurriría aglutinación alguna, es decir ausencia de aglutinación, y las células aparecerán como una mancha en el fondo del pocillo. Como se muestra en la Figura 10, el pentámero se fija al *S. aureus*, dado que existe aglutinación de células. La aglutinación se observa hasta el pocillo 7. Más allá del pocillo 7, la concentración del pentámero es demasiado baja para la fijación, por lo que no se produce ya aglutinación alguna. El pentámero de control  $V_L$  no exhibe aglutinación alguna, demostrando la especificidad del pentámero  $V_H$  para *S. aureus* (**Figura 10**). La fijación es también específica en cuanto a las células, dado que el pentámero  $V_H$ , como era de esperar, no aglutina células de *E. coli* (cepa TG1) o de *Salmonella* (datos no presentados). Análogamente, los monómeros de  $V_L$  y pentámeros de  $V_L$  con actividad de fijación a proteína L pueden utilizarse para la detección de bacterias, en particular bacterias patógenas tales como *Peptostreptococcus magnus*, que tienen proteína L en la superficie de sus células.

Debe entenderse que los ejemplos arriba descritos no tienen por objeto en modo alguno limitar el alcance verdadero de esta invención, sino que en lugar de ello se presentan para propósitos ilustrativos.

#### Tabla 1. Desviaciones de secuencia de $V_H$ respecto a las secuencias de la línea germinal parental

V <sub>H</sub>	Líneas germinales V/J	Desviación de aminoácidos de las secuencias de línea germinal V y FR4
HVHP44	DP47/JH4b	L5V, Q105R
HVHB82	DP47/JH6c	E1Q, L5Q
HVHP421	DP47/JH4b	E1Q, V2L, L5Q, L11V, G16R
HVHP419	DP47/JH4b	E1Q, V2L, L5Q, T77S, R83G, K94R
HVHP430	DP47/JH3b	E1Q, L5V, V12I, Q13K, S31N, G52AS, L78V, A93V, K94R
HVHP429	DP47/JH4	L5V, G10T, S30I, S31N, G42D, E46D, A50T, G52aN, S53N, S56A K75N, A84P, E85D
HVHM41	DP47/JH3a	E1Q, L5V, E6Q, G16R, T28A, S53G, G55D, S56H, M108L
HVHM81	DP47/JH3a	L5V, E6Q, G16R, S30D, S31D, S35H, A50G, G55A, E85G, V89L, K94R
HVHP428	V3-49/JH4b	E1Q, V2L, V5Q, R16G, T23A, G30S, D31S, T60A, G73D, K83R, T84A, V89M, T93A
HVHP420	DP-38/JH4b	E1Q, S35T, S52aT
HVHP414	DP-38/JH3b	E1D, E6Q, A23T, T28P, K52T, A60V
HVHP423	V3-53/JH1	E1Q, V2M, E6Q, L11V, I12V, N32S, Y33R, V37F, K43M, K64R, T68S, V89L
HVHP44B	V3-53/JH1	E1Q, E6Q, N32S, Y33R, V37F, K43M, Y58S, K64R, T68S, V89L
HVHP413	YAC-5/JH3b	E1Q, E6Q, Q13K, V29F, S31D, N32Y, V50F
HVHP426	8-1B/JH3b	E1Q, E6Q, L11V, G16R, T28I, S30D, S31G, N32Y, Y33A, S35H, K43Q, I51T, Y52N, S53N, Y58S, L78V

Tabla 2. Características biofísicas de los V<sub>H</sub>s humanos

V <sub>H</sub> /V <sub>H</sub> H	Exp.# (mg)	K <sub>D</sub> (μM)	Resistencia a tripsina	RE (%)
HVHP44	8.2	1.3	√	93
HVHB82	5.9	0.2	√	71
HVHP421	5.5	1.0	√	14
HVHP419	3.4	1.6	√	84
HVHP430	6.4, 23.7	2.3	√	88
HVHP429	3.4	1.3	√	86
HVHM41	1.8	0.5	X	92
HVHM81	4.3	1.3	√	87
HVHP428	3.1	1.8	√	95
HVHP420	59.0	1.2	√	92
HVHP414	11.8	1.6	√	73
HVHP423	2.4, 62.1	3.0	√	86
HVHP413	5.8	0.3	√	52
HVHP426	6.3	0.8	√	70
H11F9*	ND	3.5	ND	95
H11B2*	ND	2.0	ND	100

5

# Rendimiento de expresión por litro de cultivo bacteriano

\* K<sub>D</sub>s y REs se determinaron contra H11 scFv.

Tabla 3. Características de los V<sub>L</sub>s humanos

VL	Subgrupo	Expresión <sup>a</sup>	KD	Estado de oligomerización <sup>b</sup>
		<i>mg</i>	<i>μM</i>	
HVLP324	Vkl	6,9	0,2, 0,01 <sup>c</sup>	Monómero
HVLP325	VkIII	6,2	1	Monómero/Agregado
HVLP335	VkIII	73,5	2	Monómero
HVLP342	Vkl	7,7	0,6, 0,04 <sup>c</sup>	Monómero
HVLP351	VkIII	8,9	2	Monómero
HVLP364	VkIII	77,1	3	Monómero
HVLP389	VλI	16,7	1	Monómero
HVLP3103	VkIII	19,0	1	Monómero

<sup>a</sup> Rendimiento de expresión por litro de cultivo bacteriano.

<sup>b</sup> El estado de oligomerización se determinó por cromatografía de filtración en gel.

<sup>c</sup> Los valores  $K_D$  más pequeños corresponden a la fijación de HVLP324 y HVLP342 a los sitios de afinidad alta en la proteína L.

5

**Tabla 4. Constantes cinéticas y de equilibrio para las fijaciones de HVHLP328PTV2 y HVLP335PTV2 a proteína A y L, respectivamente**

Pentacuerpo	HVHP328PTV2	HVLP335PTV2
$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$4,3 \times 10^9$	$1,7 \times 10^6$
$k_d$ (s)	$<1 \times 10^{-3}$	$<4 \times 10^{-4}$
$K_D$ (M)	$<2 \times 10^{-9}$	$<2 \times 10^{-10}$

10

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método de identificación de fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$  humanos estables diana, que comprende:
- a. obtener una biblioteca de presentación de fago capaz de expresar una diversidad de fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$ ;
  - 5 b. permitir la infección de un césped bacteriano por el fago de la biblioteca; y
  - c. identificar fagos que forman calvas mayores en el césped bacteriano;
  - d. aislar el fago de la calva mayor en el paso (c) de la reivindicación 1; y
  - e. determinar la secuencia de otras características de los fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$  expresados por el fago de la calva mayor.
- 10 2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los fragmentos de anticuerpo  $V_H$  y/o  $V_L$  diana son solubles.
- 3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual los fragmentos de anticuerpo diana  $V_H$  y/o  $V_L$  son monómeros.
- 15 4.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los fragmentos de anticuerpo diana  $V_H$  y/o  $V_L$  son no agregantes.
- 5.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los fragmentos de anticuerpo diana  $V_H$  y/o  $V_L$  se expresan fuertemente.
- 6.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el fago es un fago filamentoso.
- 20 7.- Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual el fago es M13 o fd.
- 8.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los fragmentos de anticuerpo estables  $V_H$  y/o  $V_L$  tienen alta eficiencia de replegado térmico.
- 9.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los fragmentos de anticuerpo estables  $V_H$  y/o  $V_L$  mantienen su funcionalidad después de incubación larga a 37°C.
- 25 10.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los fragmentos de anticuerpo estables  $V_H$  y/o  $V_L$  son resistentes a las proteasas.
- 11.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los fragmentos de anticuerpo estables  $V_H$  y/o  $V_L$  tienen una vida útil larga a 4°C y/o a la temperatura ambiente y/o a 37°C.
- 30 12.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los fragmentos de anticuerpo estables  $V_H$  y/o  $V_L$  son funcionales en ambientes intracelulares.
- 13.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los fragmentos de anticuerpo estables  $V_H$  y/o  $V_L$  son capaces de ser funcionales cuando se administran internamente a humanos.

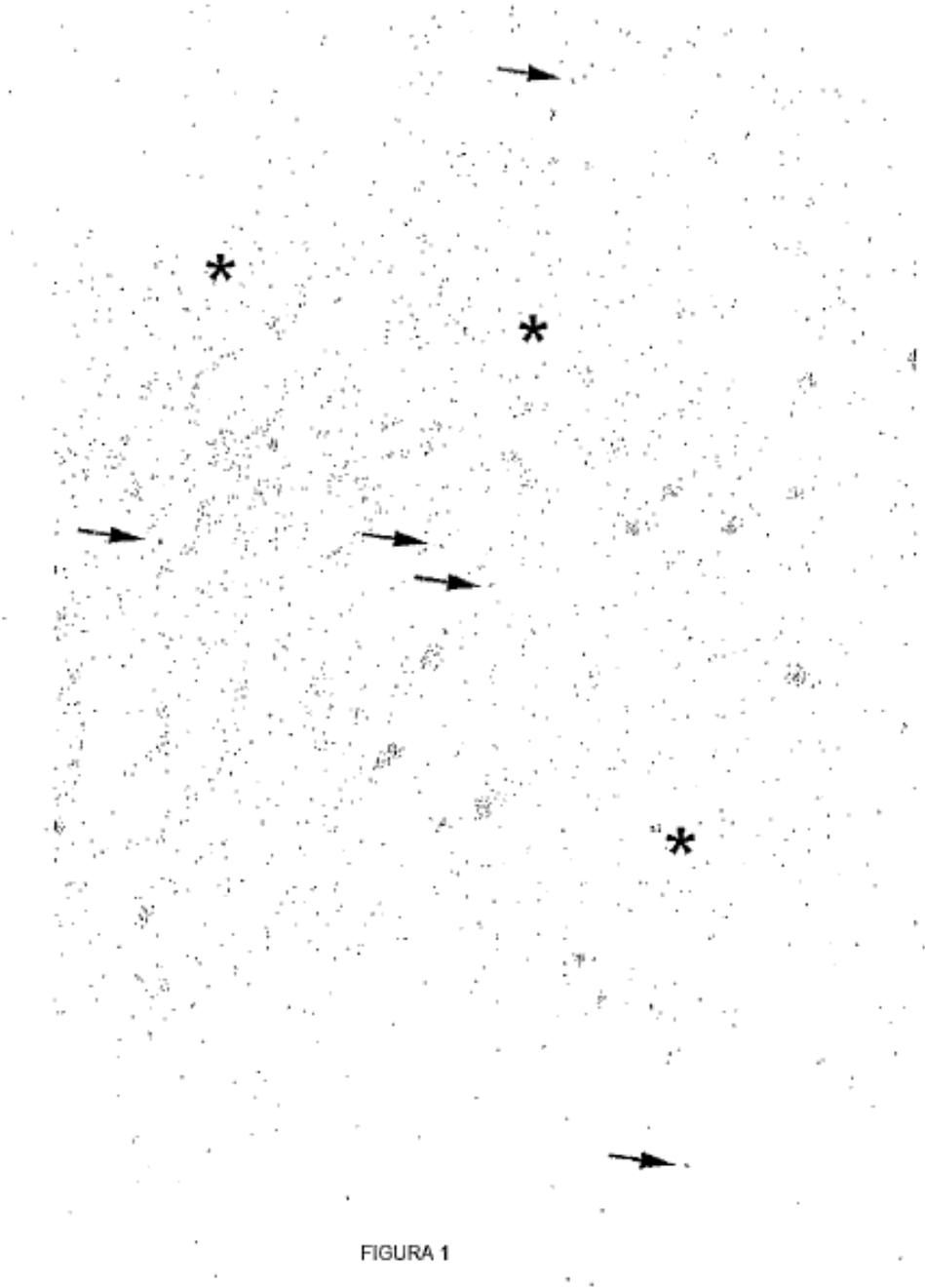


FIGURA 1



Figura 3A

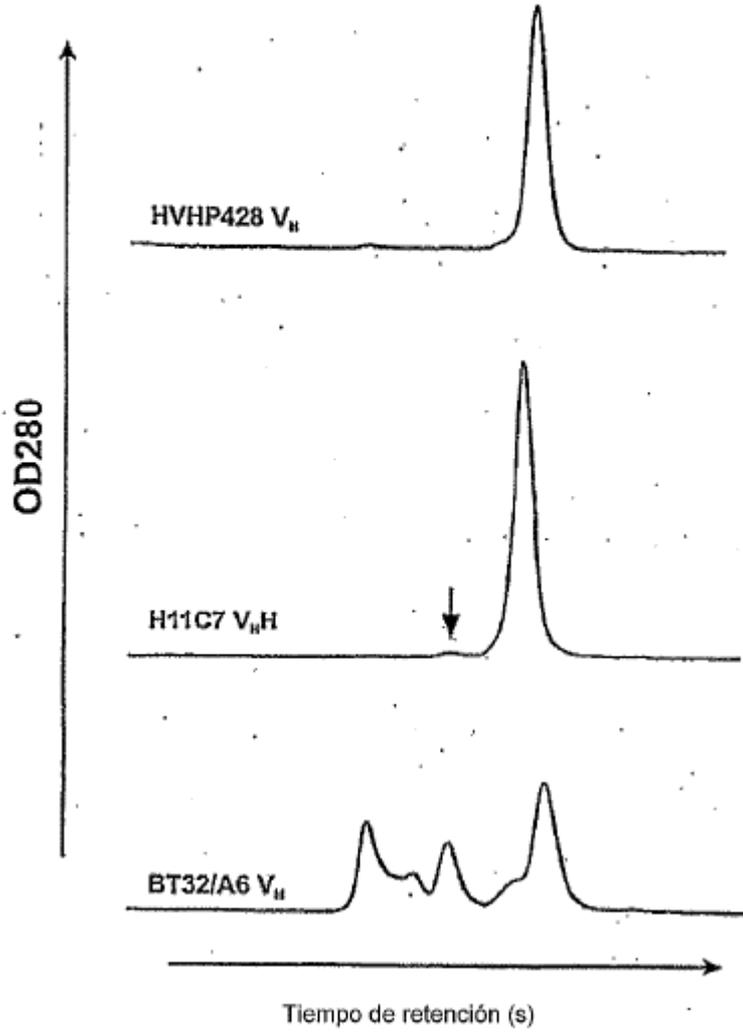
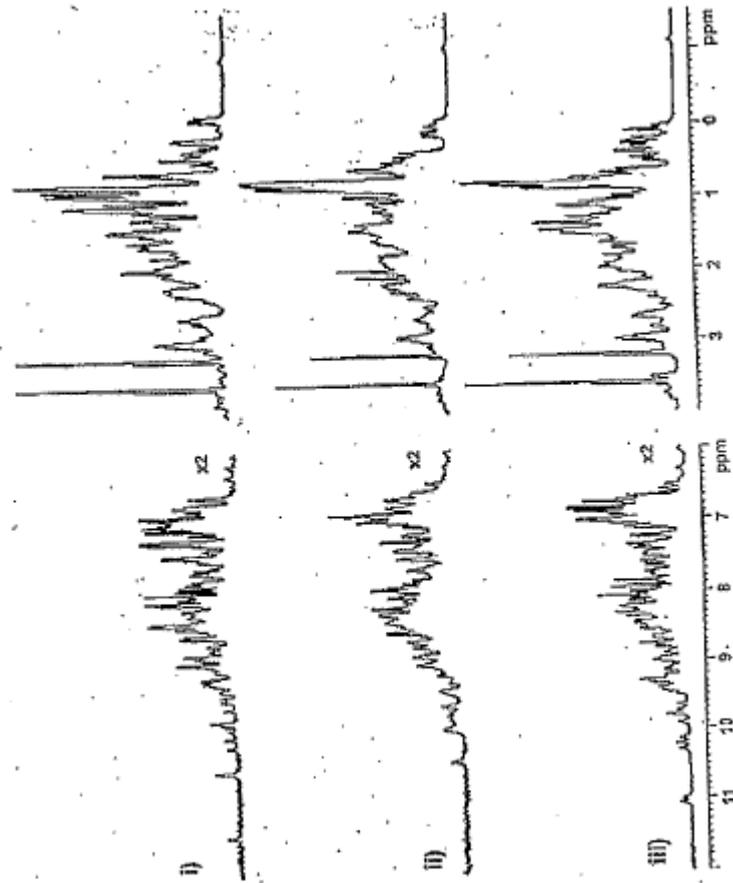


Figura 3B



**Figura 4A**

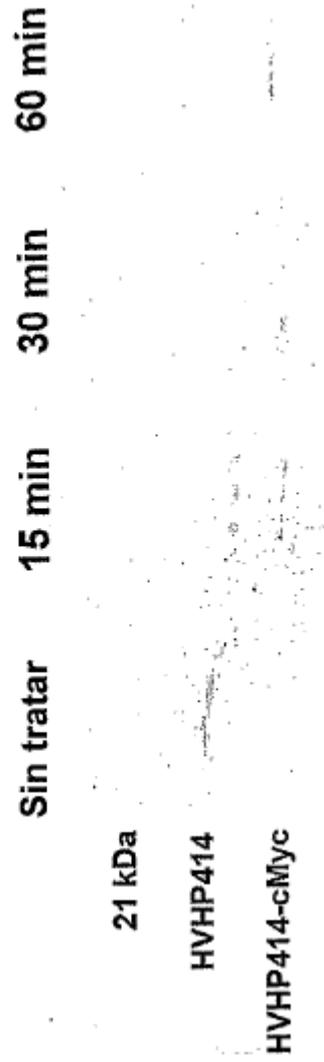


Figura 4B

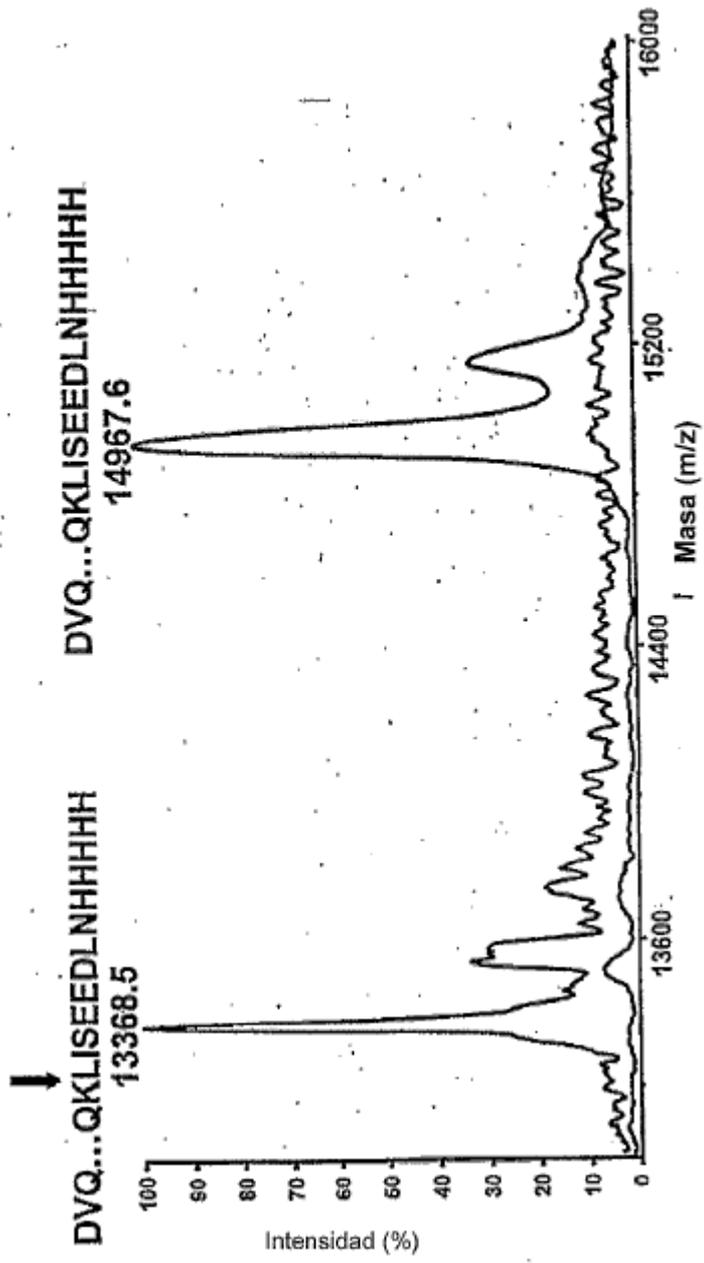


Figura 4C

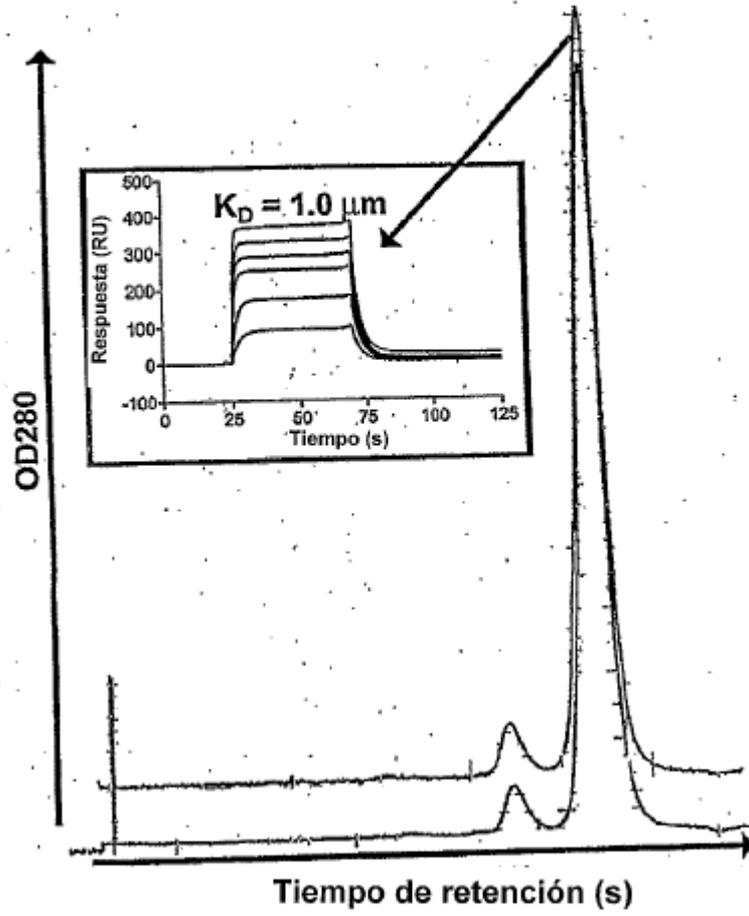
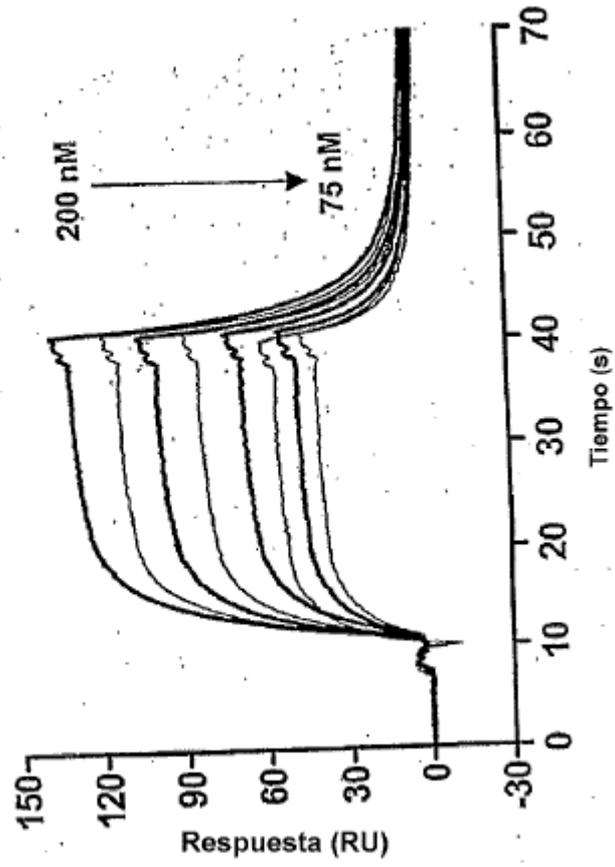


Figura 5





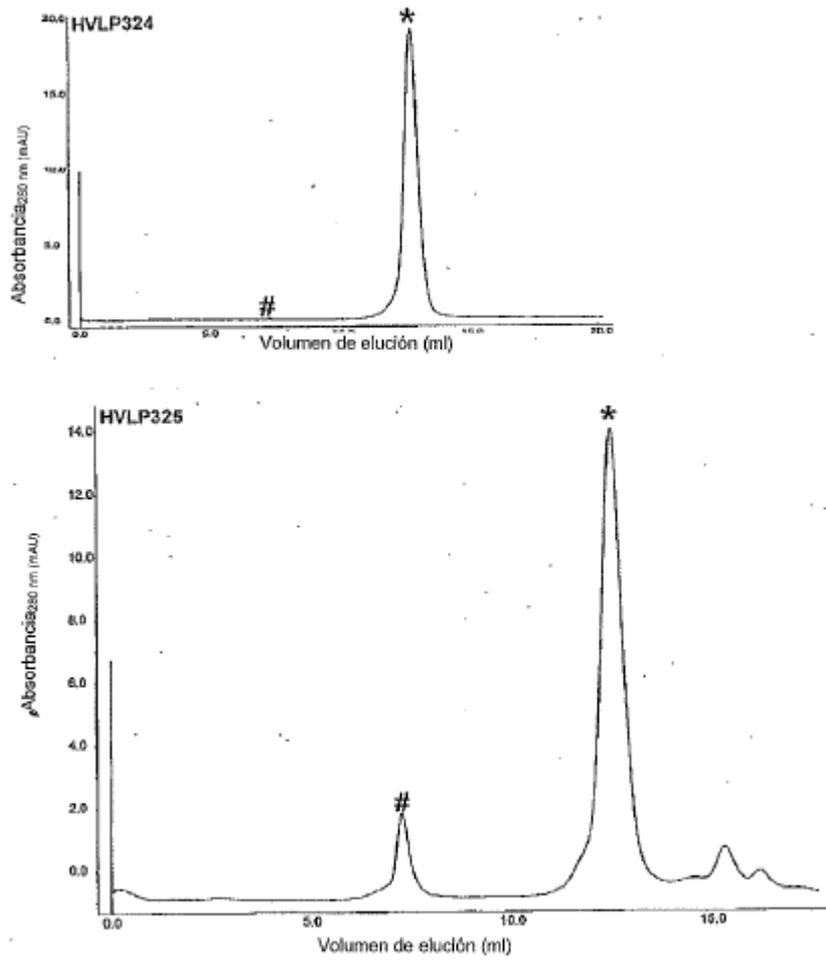


Figura 7A

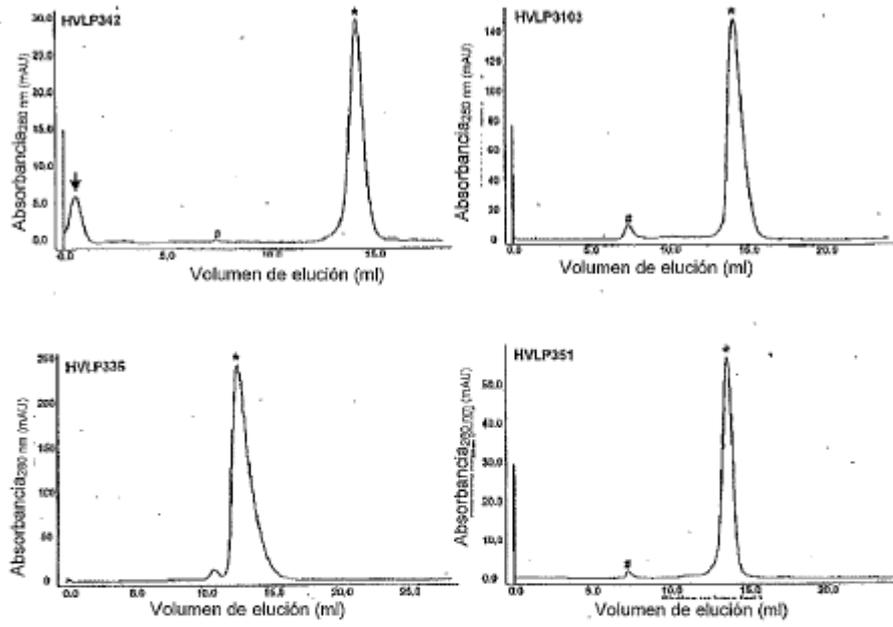


Figura 7B

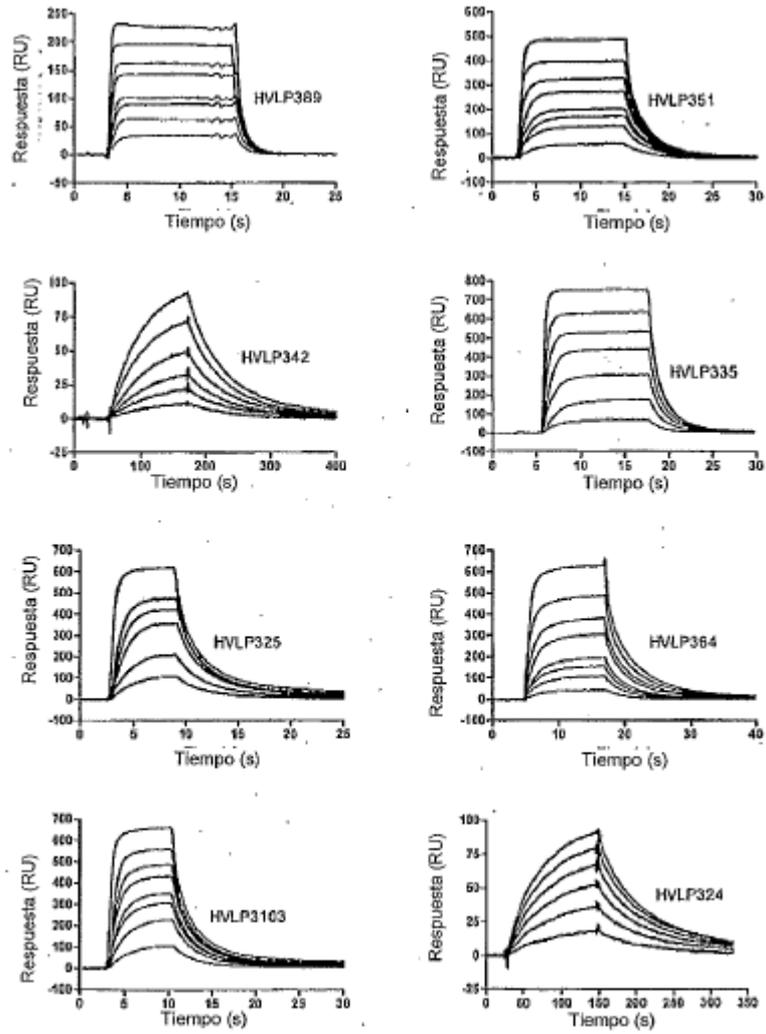
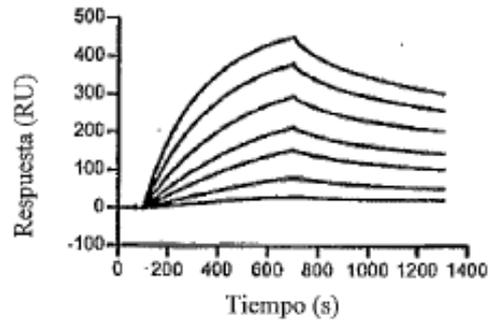


FIGURA 8

(A)



(B)

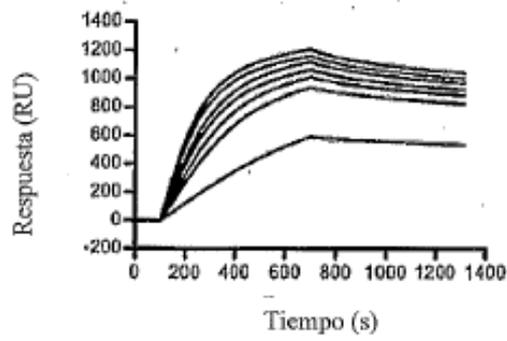
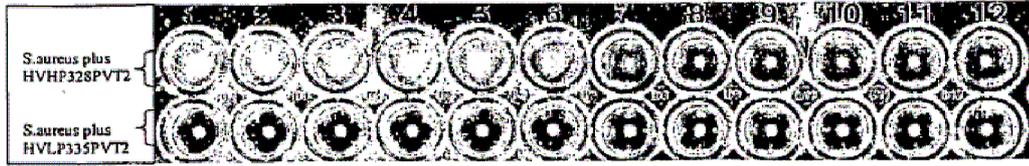


FIGURA 9



**FIGURA 10**