

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 177**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06726642 .9**
96 Fecha de presentación: **04.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1866337**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Método para obtención de anticuerpos**

30 Prioridad:
05.04.2005 GB 0506912

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2012

73 Titular/es:
**UCB PHARMA, S.A.
60, ALLÉE DE LA RECHERCHE
1070 BRUSSELS, BE**

72 Inventor/es:
LAWSON, Alastair David Griffiths

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 388 177 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 obtención de anticuerpos

La presente invención se refiere a anticuerpos de afinidad alta y métodos de producción de los mismos. En particular, la presente invención proporciona un nuevo método de mejora de la afinidad de los anticuerpos.

5 Las altas especificidad y afinidad de los anticuerpos hacen de los mismos agentes ideales de diagnóstico y terapéuticos, particularmente para modulación de las interacciones proteína: proteína. Los anticuerpos enteros y fragmentos de anticuerpos están demostrando ser agentes terapéuticos versátiles, como se ve por el reciente éxito de productos tales como ReoPro®, Remicade™ y Humira®.

10 Las inmunoglobulinas son moléculas en forma de Y que comprenden dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Enlaces disulfuro unen los pares de cadenas pesadas y ligeras así como las dos cadenas pesadas. Cada cadena está constituida por un dominio variable que varía en secuencia y es responsable de la unión de antígeno, conociéndose los mismos como los dominios V_H y V_L para las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Cada cadena está constituida también por al menos un dominio constante que se une moléculas efectoras. En la cadena ligera existe un solo dominio constante (C_L) y en la cadena pesada existen tres (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}).

15 Existen tres regiones dentro de los dominios variables que son hipervariables en secuencia dispuestos en cuatro regiones marco más altamente conservadas. Estas regiones hipervariables son fundamentalmente responsables del reconocimiento de antígeno y se hace referencia a las mismas como 'regiones determinantes de la complementariedad' (CDRs).

20 Existen muchos tipos diferentes de anticuerpos y fragmentos de los mismos que pueden utilizarse en terapia, con inclusión de anticuerpos enteros y fragmentos tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y scFv. Todos estos comprenden un par de dominios V_H y V_L que son responsables de la unión del antígeno.

25 Los anticuerpos para uso en terapia se derivan de cierto número de fuentes que incluyen por ejemplo animales inmunizados y bibliotecas de presentación de fago. A menudo, la afinidad de estos anticuerpos cuando se aíslan por primera vez no es suficientemente alta para uso directo en terapia, habiéndose desarrollado cierto número de métodos para aumentar la afinidad de los anticuerpos (maduración de la afinidad) que incluyen la mutación de las CDRs (Yang *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **254**, 392-403, 1995), uso de tensiones de mutación de *E. coli* (Low *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **250**, 359-368, 1996), desordenamiento de DNA (Patten *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 724-733, 1997) y PCR sexual (Cramer *et al.*, *Nature*, **391**, 288-291, 1998). Un método particular de maduración de afinidad se conoce como 'desordenamiento de cadenas', en el cual una cadena del anticuerpo se mantiene se une mientras que la otra se modifica, v.g. el dominio V_H de un anticuerpo de partida se desordena con una gama de otros dominios V_L y las nuevas combinaciones V_H y V_L se someten a cribado para identificar aquéllas que poseen afinidad mejorada con respecto al anticuerpo de partida.

35 Los dominios V_H o V_L 'de reemplazamiento' utilizados en el desordenamiento de cadenas se obtienen típicamente a partir de bibliotecas de genes de región V_H o V_L de anticuerpos construidas a partir de, por ejemplo, el mRNA de linfocitos de sangre periférica de donantes inmunizados o no inmunizados (Clackson *et al.*, 1991, *Nature*, **352**, 624-628; Vaughan *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology*, **14**, 309-314). La presentación de fago ha sido utilizada típicamente para desordenar secuencias de anticuerpos dado que es posible que un fago acomode los grandes tamaños de biblioteca necesarios para representar todos los genes V_H o V_L posibles. Típicamente, las bibliotecas de genes V_H o V_L se clonan en un vector que codifica el gen V_H o V_L complementario del anticuerpo de partida, véase, por ejemplo, Marks *et al.*, 1992, *Bio/Technology*, **10**, 779-783; Marks JD, 2004, *Methods in Molecular Biology*, **248**, 327-343. Las diversas nuevas combinaciones V_H o V_L se expresan luego como scFvs en la superficie del fago y se someten a cribado respecto a afinidad mejorada. En caso requerido, el proceso puede repetirse reemplazando esta vez la cadena opuesta.

45 Schier *et al.*, (1996, *Journal of Molecular Biology*, Londres, **255**, 28-43) describe el aislamiento de Fv monocatenario anti-c-erbB-2 humano monómero de afinidad alta, utilizando selección dirigida por afinidad.

En algunos casos es todavía necesario combinar el desordenamiento con otros métodos de maduración, tales como mutagénesis CDR a fin de producir un anticuerpo de afinidad alta (Thompson *et al.*, *J. Mol. Biol.* **256**, 77-78, 1996).

50 El desordenamiento ha sido utilizado también para investigar la promiscuidad de los apareamientos de cadenas pesada y ligera de anticuerpos (Kang *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 11120-11123). Se obtuvieron anticuerpos que se unían al hapteno, NPN, a partir de bibliotecas de presentación de fago derivadas de un ratón inmunizado y se identificaron familias clonales de secuencias de anticuerpos basadas en semejanzas de secuencia y en la longitud de las regiones CDR3 de ambas cadenas pesada y ligera, que se suponía se derivaban del mismo clon inicial de células B. En cada familia, la CDR3 tenía la misma longitud. Las cadenas pesada y ligera de todas las familias de anticuerpos se desordenaron y las secuencias de los anticuerpos que se unían todavía el hapteno se determinaron y se compararon con las secuencias del anticuerpo de partida para determinar de qué familias se derivaban. Se observó promiscuidad tanto incestuosa como extracelular de las cadenas V_H o V_L, de tal modo que se observó que

regiones variables de cadena pesada se apareaban con cadenas ligeras procedentes de la familia de cadena ligera complementaria tanto de fuera como de dentro. No se determinó afinidad alguna para estos clones desordenados.

Suzuki *et al.*, (2000, Biochemical and Biophysical Research Communications, 271, 1, 240-243) describe cadenas ligeras que determinan la propiedad de unión de autoanticuerpos IgG humanos anti-dsDNA.

5 Burton *et al* (US 2003/187247) describe anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes para el virus de la inmunodeficiencia humana.

Suzuki *et al.*, (1999, International Journal of Molecular Medicine, vol. 3, 4, 385-390) describe la clonación y el análisis funcional de autoanticuerpos IgG anti-DNA bicatenario utilizando el método de presentación de fago.

10 Aburatani *et al.*, (2002, Journal of Biochemistry, Japanese Biochemical Society, 132, 5, 775-782) describe la importancia de un residuo basal CDR H3 en la interacción VH/VL de anticuerpos humanos.

Ihle *et al.*, (2003, Scandinavian Journal of Immunology, 57, 5, 453-462) describe la clonación, secuenciación y expresión de regiones variables de inmunoglobulina de anticuerpos monoclonales murinos específicos para los bucles de proteínas P1.7 y P1.16 PorA de *Neisseria meningitidis*.

15 Sorprendentemente, los autores de la presente invención han conseguido demostrar ahora que es posible producir anticuerpos de afinidad alta por re-apareamiento de las regiones variables de anticuerpos dentro de una familia de anticuerpos que se unen al mismo antígeno. Sorprendentemente, la afinidad de anticuerpos de afinidad ya alta puede aumentarse aún por re-apareamiento de las regiones variables entre miembros de familias de anticuerpos afines, evitando la necesidad de grandes bibliotecas de secuencias VH y VL diversas. A pesar de diferencias sólo pequeñas en las secuencias de los anticuerpos, pueden obtenerse grandes aumentos en la afinidad de estos anticuerpos. La frecuencia del aumento de afinidad observada es sorprendente para un número tan pequeño de combinaciones de secuencia posibles.

Por tanto, la presente invención proporciona un método de obtención de al menos un anticuerpo recombinante con afinidad mejorada para un antígeno seleccionado de una familia de anticuerpos generados *in vivo* que se unen al anticuerpo seleccionado, que comprende:

25 a) obtener a partir de células B una familia de dos o más anticuerpos generados *in vivo* que se unen al mismo antígeno y conservan los apareamientos VH y VL generados *in vivo* en los cuales la secuencia de aminoácidos VH CDR3 de cada anticuerpo en la familia tiene una identidad de 100%;

b) re-aparear la región VH de un anticuerpo obtenido en el paso (a) con la región VL de un anticuerpo diferente obtenido en el paso (a) para producir un nuevo anticuerpo recombinante; y

30 c) someter a cribado el anticuerpo recombinante producido en el paso (b) y seleccionar dicho anticuerpo si tiene afinidad mejorada con respecto a la población de anticuerpos de partida obtenida en el paso (a)

en donde en el paso (a) los anticuerpos se obtienen por aislamiento de células B individuales que producen anticuerpos específicos de antígeno y se obtienen las secuencias que codifican las regiones variables de dichos anticuerpos.

35 El término 'afinidad', como se utiliza en esta memoria, se refiere a la fuerza con la cual el anticuerpo se une al antígeno seleccionado. Los anticuerpos de afinidad alta tienen una constante de disociación baja. La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y el grado de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno pueden determinarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica tales como el análisis BIAcore™ o ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de

40 antígeno radio-marcado (v.g. ³H o ¹²⁵I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno sin marcar, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés para un antígeno particular y los grados de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos por análisis gráfico de Scatchard. BIAcore™ se utiliza preferiblemente para determinar la afinidad de los anticuerpos de la presente invención. BIAcore™ es un sistema biosensor automático que puede utilizarse para medir interacciones moleculares (Karlsson, et al., 1991, J. Immunol. Methods, 145, 229-240). En este método, la concentración de antígeno

45 no necesita en muchos casos ser determinada exactamente, y es posible obtener medidas del grado de disociación para anticuerpos que son ya de afinidad alta.

Preferiblemente, los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método tienen una afinidad alta para el antígeno seleccionado. Por afinidad alta se entiende preferiblemente en el intervalo nanomolar, más preferiblemente en el intervalo picomolar. Preferiblemente, los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método tienen una afinidad para el antígeno seleccionado comprendida en el intervalo de 1 pM a 10 nM, más preferiblemente en el intervalo de 5 pM a 500 pM, y aún más preferiblemente 10 pM a 200 pM. En una realización, los anticuerpos obtenidos en el paso (a) tienen una afinidad para el antígeno seleccionado de 10 a 100 pM.

55 El término 'anticuerpo', como se utiliza en esta memoria, incluye anticuerpos enteros y fragmentos funcionalmente activos o derivados de los mismos y pueden ser, pero sin carácter limitante, anticuerpos monoclonales, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')₂, así como fragmentos de unión de epítope de cualquiera de los anteriores.

Los anticuerpos incluyen por tanto moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión de antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (v.g. IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

- 5 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la especie no humana y una región de marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, US 5.585.089).

10 Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que han sido modificados por ingeniería genética de tal modo que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Estos anticuerpos quiméricos son probablemente menos antigénicos que el anticuerpo original de partida.

15 Los residuos en dominios variables de anticuerpos se numeran convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU. Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva excepto donde se indique otra cosa.

20 Las designaciones de los residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia lineal real de aminoácidos puede contener un número menor o mayor de aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, sea de marco o CDR, de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

25 El término 'antígeno', como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier sustancia conocida o desconocida que puede ser reconocida por un anticuerpo, con inclusión de proteínas, glicoproteínas y carbohidratos. Preferiblemente, estos antígenos incluyen proteínas biológicamente activas, tales como hormonas, citoquinas y sus receptores de la superficie celular, membranas celulares bacterianas o parásitas o componentes purificados de los mismos, y antígenos virales. El antígeno puede ser cualquier antígeno asociado a células, por ejemplo un antígeno de la superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser un antígeno soluble. Los antígenos pueden ser también cualquier antígeno médicamente relevante tal como aquéllos antígenos que están regulados al alza durante enfermedades o infecciones, por ejemplo los receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos particulares de antígenos de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como integrinas $\beta 1$, v.g. VLA-4, E-selectina, P-selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD70 y CD134, el antígeno carcinoembrionario (CEA), los antígenos MUC-1, MHC Clase I y MHC Clase II y VEGF, y en caso apropiado, receptores de los mismos. Los antígenos solubles incluyen interleuquinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos virales, por ejemplo el virus respiratorio sincitial o antígenos de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , factores estimulantes de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α , y PDGF- β , y en caso apropiado receptores de los mismos.

40 En un ejemplo, el antígeno para uso en la presente invención está disponible en una forma pura obtenida sea por purificación directa a partir de la fuente natural o por expresión recombinante y purificación de dicho antígeno.

45 En otro ejemplo, el antígeno puede expresarse en la superficie de una célula, sea por medios naturales o recombinantemente. Tales células pueden incluir pero sin carácter limitante células de mamífero, células inmunomoduladoras, linfocitos, monocitos, polimorfos, células T, células tumorales, células de levadura, células bacterianas, agentes infecciosos, parásitos, células vegetales, y células transfectadas tales como NSO, CHO, COS y células 293.

50 En otro ejemplo, el antígeno se desconoce y el antígeno es cualquier material que pueda proporcionar una fuente de posibles antígenos. Ejemplos de materiales adecuados incluyen los de origen animal, de mamífero, vegetal, de levadura, bacteriano o viral. El material puede ser una célula o una población de células para las cuales sería deseable aislar anticuerpos, tales como células de mamífero, células inmunomoduladoras, linfocitos, monocitos, polimorfos, células T, células tumorales, células de levadura, células bacterianas, agentes infecciosos, parásitos y células vegetales. En una realización, la célula es una célula tumoral.

55 En el paso (a) del método de la presente invención, se obtiene una familia de dos o más anticuerpos que se unen al mismo antígeno. Los anticuerpos pueden obtenerse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, con inclusión, por ejemplo, de presentación de fago y respuestas inmunes *in vivo*. Los anticuerpos obtenidos en el paso (a) que se unen al mismo antígeno pueden tener también una o más características funcionales en común, v.g. neutralización de una actividad biológica o unión a un epítope particular. Estos pueden identificarse utilizando uno o más ensayos funcionales como se describe más adelante en esta memoria. En un ejemplo, los anticuerpos obtenidos en el paso (a) se obtienen por presentación de fago. Se conocen en la técnica diversos métodos de presenta-

ción de fago, véase por ejemplo Brinkman *et al.* (en J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames *et al.* (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough *et al.* (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic *et al.* (Gene, 1997 187 9-18), Burton *et al.* (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) y WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Preferiblemente, los anticuerpos obtenidos en el paso (a) se derivan de una respuesta inmune generada *in vivo*. De acuerdo con ello, en una realización, en el paso (a) del método de la presente invención se obtiene una familia de dos o más anticuerpos generados *in vivo* a partir de al menos un animal que ha generado una respuesta inmune *in vivo* en un antígeno seleccionado. Preferiblemente, los anticuerpos obtenidos se unen todos ellos al mismo antígeno seleccionado y conservan los apareamientos VH y VL generados *in vivo*.

Típicamente, los anticuerpos para uso en el paso (a) se obtienen utilizando cualquier método adecuado bien conocido en la técnica para obtención de anticuerpos a partir de respuestas inmunes generadas *in vivo*.

En un ejemplo, los anticuerpos obtenidos en el paso (a) son anticuerpos monoclonales. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por cualquier método conocido en la técnica tal como el método del hibridoma (Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), el método del trioma, el método del hibridoma de las células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y el método del hibridoma EBV (Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

En otro ejemplo, los anticuerpos se obtienen en el paso (a) utilizando métodos tales como los descritos en Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (15), 7843-7848, WO 92/02551, WO 2004/051268 y WO 2004/106377.

Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de uno o más animales de la misma especie.

El animal puede ser uno que haya sido inmunizado con un antígeno y no haya sido expuesto preferiblemente con anterioridad al antígeno de interés (o un animal que no se sabe que haya estado expuesto al antígeno de interés o que no se cree que haya estado expuesto al antígeno de interés). Alternativa o adicionalmente, el animal o humano puede ser uno que ha desarrollado una respuesta inmune a un antígeno como resultado de enfermedad.

En caso apropiado, los animales pueden inmunizarse con un antígeno seleccionado utilizando cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica que son adecuados para generación de una respuesta inmune (véase Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, pollos o cerdos pueden inmunizarse a fin de obtener anticuerpos. Sin embargo, generalmente se prefieren ratones, conejos, cerdos y ratas. Pueden encontrarse números elevados de células productoras de anticuerpos en el bazo periférico y en los ganglios linfáticos del animal inmunizado y, una vez que se ha generado una respuesta inmune y se ha sacrificado el animal, se retiran el bazo y los ganglios linfáticos.

Alternativamente, pueden obtenerse también anticuerpos a partir de un animal que ha generado los anticuerpos durante el curso de una enfermedad, en particular un humano. Por ejemplo, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos, v.g. células B, de un humano con una enfermedad de causa desconocida, tal como cáncer, y utilizarse para ayudar a la identificación de los anticuerpos que tengan efecto sobre el proceso de la enfermedad o que puedan conducir a la identificación de un agente o componente corporal que esté implicado en la causa de la enfermedad. Análogamente, pueden obtenerse anticuerpos a partir de individuos con una enfermedad de causa conocida, tal como la malaria. Estas células productoras de anticuerpos pueden derivarse de la sangre o de los ganglios linfáticos, así como de otros tejidos enfermos o normales.

Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de las células productoras de anticuerpos generadas por la respuesta inmune por cualquier método conocido en la técnica con inclusión de los métodos descritos anteriormente en esta memoria para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. Preferiblemente, sin embargo, los anticuerpos para uso como la población de partida en el paso (a) del método de la presente invención se obtienen por aislamiento de células B del individuo que producen anticuerpos específicos del antígeno. El término "célula B" como se utiliza en esta memoria incluye cualquier célula B o derivado de la misma que produce un anticuerpo, tal como un linfocito B, una célula plasmática, un plasmablasto, una célula B activada o una célula B de memoria. Estas células pueden secretar anticuerpos y/o mantener los anticuerpos en la superficie de la célula.

Una población de células productoras de anticuerpos puede enriquecerse por métodos basados en el tamaño o la densidad de las células productoras de anticuerpos con relación a otras células. Un ejemplo del uso de Percoll para separar células de acuerdo con la densidad ha sido descrito por van Mourik y W.P. Zeizlmaier en *Methods in Enzymology* 121:174-182 (J. J. Langone, H. H. van Vunakis (eds.), Academic Press Inc., N.Y.). Pueden utilizarse también gradientes de densidad variable de soluciones de seroalbúmina bovina para separar células de acuerdo con su densidad. (Véase N. Moav y T. N. Harris, *J. Immunol.* 105, 1512, 1970; véase también Raid, D. J. en *Selected Methods in Cellular Immunology*, B. Misheli y S. Shiigi (eds.), W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1987). Preferiblemente la operación se realiza por centrifugación con Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia).

En una realización particular, las células productoras de anticuerpos, una vez obtenidas v.g. por separación con Ficoll se cultivan en placas de microtitulación de 96 pocillos en medios acondicionados de células T (3%) y células EL-4 (5×10^4 /pocillo) durante entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días, opcionalmente a una densidad de células que permite estadísticamente que cualesquiera anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado estén presentes como clones individuales. Después del cultivo, los sobrenadantes que contienen anticuerpo secretado se someten a cribado respecto a unión al antígeno mediante, por ejemplo, FMAT, FACS, ELISA o BIAcore™, y se someten opcionalmente a cribado ulterior por afinidad y/o una característica funcional en ensayos funcionales, tal como detección de la señalización de receptores por unión al anticuerpo (agonismo) o bloqueo de la señalización de receptores por unión del anticuerpo al receptor o el ligando (neutralización/antagonismo) o apoptosis.

5 Otros ensayos adecuados para uso en la selección de anticuerpos para utilización en el paso (a) del método incluyen ensayos para identificar anticuerpos que se unen a una región o epítipo particular de un antígeno, por ejemplo para identificar anticuerpos de bloqueo cruzado. Estos pueden identificarse utilizando cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo por utilización de ELISA o BIAcore™ de competición donde la unión del anticuerpo de bloqueo cruzado a un antígeno seleccionado impide la unión de un anticuerpo que ya se sabe se une a dicho antígeno, o viceversa. Preferiblemente, se utilizan dos o más ensayos para someter a cribado los anticuerpos; en particular un ensayo para unión al antígeno va seguido por uno o más ensayos funcionales, o viceversa. De ahí que, en un ejemplo, los anticuerpos obtenidos en el paso (a) se unen al mismo antígeno y tienen una o más características funcionales en común.

10 Métodos para identificación de células B productoras de anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado a partir de una población en células B, sea directamente procedentes del animal o después de cultivo y preselección utilizando los métodos arriba descritos se describen en Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (15), 7843-7848, WO 92/02551, WO 2004/051268, WO 2004/106377, WO 2005/019823 y WO 2005/019824. Por tanto, en una realización preferida los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método se obtienen a partir de células B aisladas del individuo, que se aíslan preferiblemente utilizando los ensayos homogéneos de fluorescencia descritos en
25 WO 2004/051268.

Una vez que se han obtenido los anticuerpos, por ejemplo una vez que se han identificado células B del individuo y/o se han producido anticuerpos monoclonales, pueden obtenerse las secuencias que codifican las regiones variables de estos anticuerpos. Las secuencias de la región variable pueden obtenerse por ejemplo secuenciando en primer lugar la proteína del anticuerpo producida por el hibridoma, células B o fago y determinando la secuencia de ácido nucleico codificante. Más preferiblemente, puede secuenciarse en su lugar el DNA o cDNA de la región variable de inmunoglobulina (VH y VL). En el caso en que el anticuerpo se deriva de una línea de células de hibridoma o célula B del individuo, los cDNAs codificantes de las regiones variables pueden amplificarse utilizando PCR mediante, por ejemplo, los métodos descritos en Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (15), 7843-7848, y en WO 92/02551.

30 La región variable VH y las regiones VL son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, en el subgrupo 1 de IgG humana pueden encontrarse VH y VL en los residuos 1-113 y 1-109 respectivamente.

Opcionalmente, una vez que se han obtenido las secuencias de los genes VH y VL, las mismas pueden expresarse en líneas de células recombinantes para producir anticuerpos enteros o fragmentos de los mismos utilizando cualquier método adecuado, al tiempo que se mantienen los apareamientos VH y VL originales, por ejemplo, generados *in vivo* (Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181; Simmons *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, 2002, 263, 133-147; Babcook *et al. supra* y WO92/02551). Una vez que se han expresado los anticuerpos, los mismos pueden someterse a cribado respecto a afinidad de unión al antígeno y características funcionales. Estos cribados pueden analizarse por primera vez si los anticuerpos no se habían sometido a cribado previamente, por ejemplo antes del aislamiento de las células B. Alternativamente, los cribados pueden utilizarse para confirmar las propiedades del anticuerpo aislado o para caracterizar ulteriormente el anticuerpo.

Una vez que se han obtenido las secuencias de la región variable a partir de al menos dos anticuerpos que se unen al mismo antígeno seleccionado, es posible agrupar las secuencias en familias de secuencias para uso en el paso (a) del método. Una familia de anticuerpos se define en la presente invención como una colección de dos o más anticuerpos que tienen en común las características siguientes:

- 50
- 1) se unen al mismo antígeno seleccionado,
 - 2) la longitud de la secuencia de aminoácidos VH CDR3 es la misma,
 - 3) las secuencias VH CDR3 tienen identidad mayor que 60% al nivel de aminoácidos.

En una realización, una familia de anticuerpos se define en la presente invención como una colección de dos o más anticuerpos generados *in vivo* que conservan los apareamientos naturales VH y VL generados *in vivo*, que tienen en común las características siguientes:

- 55
- 1) se unen al mismo antígeno seleccionado,
 - 2) la longitud de la secuencia de aminoácidos VH CDR3 es la misma,
 - 3) las secuencias VH CDR3 tienen identidad mayor que 60% al nivel de aminoácidos.

La CDR3 del dominio variable de la cadena pesada (VH CDR3) está localizada en los residuos 95-102 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

La longitud de la secuencia de aminoácidos VH CDR3 en las familias de anticuerpos de la presente invención es la misma.

- 5 El término "identidad", como se utiliza en esta memoria, se calcula para cualquier región particular de la secuencia de anticuerpos (v.g. VH CDR3) como $(1-(A/B)) * 100$, donde A es el número total de posiciones en las secuencias alineadas en las cuales al menos un miembro de la familia de anticuerpos difiere de cualquier otro miembro en la familia, y B es el número total de residuos en dicha región de secuencia. Por ejemplo, para calcular la identidad de las regiones VH CDR3, B es el número total de aminoácidos en la VH CDR3, y A es el número total de posiciones de los aminoácidos en la familia de secuencias VH CDR3 alineadas en las cuales al menos un miembro de la familia de anticuerpos difiere de cualquier otro miembro en la familia.

- 15 La semejanza global de las secuencias VH y VL enteras puede variar, dependiendo en particular del número de miembros de la familia. En el caso en que existen un número grande de anticuerpos en la familia, la semejanza global de secuencia de las secuencias VH y VL será menor que en los casos en que existen menos miembros de la familia. Ésta es una característica deseable de la invención por la cual pueden obtenerse anticuerpos de mayor afinidad utilizando esta diversidad.

Típicamente, las secuencias VH en la familia tienen identidad mayor que 50%, identidad mayor que 60%, identidad mayor que 70% o identidad mayor que 80%, dependiendo del número de secuencias en la familia como se ha expuesto anteriormente.

- 20 Análogamente, las secuencias VL en una familia pueden tener identidad mayor que 50%, identidad mayor que 60%, identidad mayor que 70%, o identidad mayor que 80%.

Por tanto, en un ejemplo de la presente invención la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) se caracteriza adicionalmente porque las secuencias VH tienen identidad mayor que 60% y las secuencias VL tienen identidad mayor que 60%.

- 25 La familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende al menos dos anticuerpos. En una realización, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende tres o más anticuerpos. En una realización, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende cuatro o más anticuerpos. En una realización, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende cinco o más anticuerpos. En una realización adicional, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende seis o más anticuerpos.

- 30 Típicamente, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende entre 2 y 100 anticuerpos. En una realización, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende entre 2 y 50 anticuerpos. En otra realización, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende entre 2 y 40 anticuerpos. En otra realización, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende entre 2 y 30 anticuerpos. En otra realización, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende entre 2 y 20 anticuerpos. En una realización, la familia de anticuerpos obtenida en el paso (a) comprende entre 2 y 10 anticuerpos.

En un ejemplo, descrito en esta memoria, se obtienen en el paso (a) del método seis miembros de familia de anticuerpos, que tienen secuencias de aminoácidos VH CDR3 idénticas, y ambas regiones VH y VL tienen una identidad mayor que 80%.

- 40 En los casos en que ninguno de dos anticuerpos que se unen a un antígeno seleccionado obtenido utilizando los métodos descritos anteriormente en esta memoria comparten estas propiedades de secuencia, se pueden aislar anticuerpos adicionales y someterse a cribado utilizando los métodos arriba descritos para obtener miembros adicionales de la familia.

- 45 Una vez que se ha obtenido en el paso (a) del método una familia de al menos dos anticuerpos que comprenden regiones VH y VL, una región VH de uno de los anticuerpos de la familia se re-aparea con una región VL de un anticuerpo diferente en la familia en el paso (b) del método, para producir al menos un par VH y VL nuevo. Por tanto, en el paso (b) del método la región VH de un anticuerpo obtenido en el paso (a) del método se re-aparea con la región VL de un anticuerpo diferente obtenido en el paso (a) para producir un nuevo anticuerpo recombinante. Preferiblemente, se producen al menos dos pares VH:VL diferentes, produciéndose más preferiblemente todas las combinaciones posibles de pares VH y VL. Por ejemplo, si existen seis anticuerpos en la familia y por consiguiente seis pares de genes VH y VL, existirán 36 combinaciones posibles de pares VH y VL a testar, 30 de las cuales serán combinaciones nuevas. Por tanto, en una realización del paso (b) cada región VH de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) se re-aparea con cada región VL de tal modo que cada nueva combinación VH:VL se produce como un anticuerpo recombinante y al menos uno de los anticuerpos recombinantes producidos se somete a cribado en el paso (c). Preferiblemente, cada nueva combinación VH:VL producida en el paso (b) se somete a cribado en el paso (c).

Cualquier método adecuado conocido en la técnica puede utilizarse para re-aparear las regiones VH y VL en el paso (b) del método. Preferiblemente, en el método de la presente invención, los genes VH y VL se re-aparean por incorporación de cada gen VH y VL individual en un vector diferente y se crean combinaciones de pares VH y VL por co-expresión de un vector que contiene VH y uno que contiene VL en una célula hospedadora de tal modo que se produce un par VH y VL funcional en cualquier formato de anticuerpo adecuado.

Métodos generales por los cuales pueden construirse los vectores, métodos de transfección y métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Manual de Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing. Cualquier sistema adecuado célula hospedadora/vector puede utilizarse para expresión de las secuencias de DNA que codifican las moléculas de anticuerpo. También pueden utilizarse sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, u otros sistemas microbianos, o sistemas de expresión eucariotas, por ejemplo de células hospedadoras de mamífero. Células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen CHO y NSO. Los métodos para expresar estos anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181; Simmons *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, 2002, 263, 133-147).

En un ejemplo, los vectores apropiados contienen regiones constantes de cadenas pesada y ligera o partes de las mismas de tal modo que pueden producirse anticuerpos enteros o fragmentos de anticuerpos tales como Fab o Fab'. Con cada VL y VH en vectores separados es posible co-transfectar fácilmente cada combinación VH y VL en una célula hospedadora adecuada, por ejemplo células CHO. Por ejemplo, la región V puede sub-clonarse en los vectores de expresión pMRR10 y pMRR14 (véase por ejemplo WO 2004/072116). Estos son vectores separados para expresión de la cadena ligera y pesada respectivamente y contienen genes de región constante de DNA genómico que codifican la cadena ligera kappa humana y la cadena pesada gamma 4, respectivamente. Estos vectores pueden co-transfectarse luego en células CHO y producirse anticuerpos enteros por cultivo de las células CHO.

Alternativamente, pero de modo menos conveniente, cada par VH y VL puede expresarse en el mismo vector sea como anticuerpos enteros o como fragmentos, con inclusión de scFv.

Después de la expresión de las secuencias VH y VL re-apareadas, los anticuerpos que pueden purificarse opcionalmente, se someten a cribado en el paso (c) del método a fin de identificar aquellos anticuerpos con afinidad mejorada sobre la población restante de anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método.

Opcionalmente, en el paso (c), la unión de los anticuerpos al antígeno seleccionado puede determinarse antes de la determinación de la afinidad de dichos anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado; alternativamente, pueden determinarse la unión del antígeno y la afinidad de manera simultánea. Por ejemplo, en el paso (c), puede utilizarse ELISA para ensayar todos los anticuerpos producidos en el paso (b) a fin de determinar qué anticuerpos se unen al antígeno seleccionado y subsiguientemente aquellos anticuerpos que se unen al antígeno se someten a cribado para identificar aquéllos que tienen una afinidad mejorada sobre las poblaciones de anticuerpos de partida. En otro ejemplo, en el paso (c) se determinan simultáneamente la unión de antígeno y la afinidad utilizando por ejemplo BIAcore™.

En el paso (c) del método se selecciona un anticuerpo si el mismo tiene afinidad mejorada para el antígeno seleccionado comparado con uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método. En el paso (c) pueden seleccionarse uno o más anticuerpos con afinidad mejorada. Preferiblemente, en el paso (c) del método se selecciona al menos el anticuerpo con la afinidad máxima para el antígeno seleccionado. Si en el paso (c) no se identifica un anticuerpo con afinidad mejorada, pueden repetirse los pasos (b) y (c) del método para diferentes pares VH:VL hasta que se identifica en el paso (c) un anticuerpo con afinidad mejorada.

Un aumento de afinidad puede determinarse por cualquiera de los métodos descritos en esta memoria. Un aumento de afinidad incluye también una reducción en el grado de disociación, es decir una disminución del grado de disociación entre el anticuerpo y el antígeno (Kd) como se observa en los ejemplos descritos en esta memoria.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método de obtención de al menos un anticuerpo recombinante con afinidad mejorada para un antígeno seleccionados a partir de una familia de anticuerpos generados *in vivo* que se unen al antígeno seleccionado, que comprende:

a) obtener una familia de dos o más anticuerpos generados *in vivo* que se unen al mismo antígeno y conservan los apareamientos VH y VL generados *in vivo* en los cuales la secuencia de aminoácidos VH CDR3 de cada anticuerpo en la familia es de la misma longitud y tiene una identidad mayor que 70% al nivel de aminoácidos.

b) re-aparear la región VH de cada uno de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) con la región VL de cada uno de los otros anticuerpos de tal modo que cada nueva combinación VH:VL se produce como un anticuerpo; y

c) someter a cribado cada anticuerpo producido en el paso (b) en cuanto a la unión al antígeno seleccionado, determinar la afinidad de unión de cada uno de los anticuerpos que se unen al antígeno seleccionado, identificar cuál de dichos anticuerpos tiene afinidad mejorada para el antígeno seleccionado comparado con uno cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el paso (a) y seleccionar uno o más de dichos anticuerpos cada uno de los cuales tiene afinidad mejorada.

Se proporciona también por la presente invención al menos un anticuerpo de afinidad alta obtenido en el paso (c) del método de la presente invención. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene al menos afinidad picomolar para el antígeno seleccionado. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de 100 pM o menos para el antígeno seleccionado. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de 75 pM o menos para el antígeno seleccionado. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de 50 pM o menos para el antígeno seleccionado. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de 25 pM o menos para el antígeno seleccionado. Preferiblemente, el anticuerpo tiene una afinidad de 10 pM o menos para el antígeno seleccionado, más preferiblemente, 5 pM o menos, y aún más preferiblemente 1 pM o menos.

En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene al menos una afinidad 1,5 veces mayor para el antígeno seleccionado que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a). En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene al menos una afinidad 2 veces mayor para el antígeno seleccionado que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a). En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene al menos una afinidad 5 veces mayor para el antígeno seleccionado que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a). En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene al menos una afinidad 10 veces mayor para el antígeno seleccionado que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a). En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene al menos una afinidad 20 veces mayor para el antígeno seleccionado de uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a). En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene una afinidad que es al menos 50 veces mayor para el antígeno seleccionado que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a). En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene una afinidad que es al menos 100 veces mayor para el antígeno seleccionado que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a).

Los anticuerpos seleccionados en el paso (c) del método tienen típicamente un grado de disociación más bajo (más lento) que los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método. En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene un grado de disociación (kd 1/s) que es al menos 1,5 veces menor que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método. En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene un grado de disociación (kd 1/s) que es al menos 2 veces menor que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método. En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene un grado de disociación (kd 1/s) que es al menos 2,5 veces menor que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método. En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene un grado de disociación (kd 1/s) que es al menos 3 veces menor que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método. En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene un grado de disociación (kd 1/s) que es al menos 4 veces menor que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método. En una realización, el anticuerpo seleccionado en el paso (c) del método tiene un grado de disociación (kd 1/s) que es al menos 5 veces menor que uno cualquiera de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) del método.

Los anticuerpos obtenidos por el método de la presente invención pueden ser anticuerpos enteros, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fv, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')₂ y fragmentos que se unen a epítopos de cualquiera de los anteriores.

Se apreciará que el formato de anticuerpo del anticuerpo recombinante obtenido por el método de la presente invención puede alterarse una vez que el mismo ha sido seleccionado en el paso (c) del método. Por ejemplo, el método puede comprender además un paso adicional (d) en el cual el anticuerpo seleccionado en el paso (c) se humaniza. Los anticuerpos humanizados son típicamente moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, US 5.585.089). Se apreciará que en los casos en que el anticuerpo aislado de una respuesta inmune generada *in vivo* es un anticuerpo humano, éste puede 'humanizarse' también para hacer el anticuerpo conforme a una secuencia marco existente más frecuentemente o para incorporar o eliminar características específicas.

Por tanto, la invención proporciona también un anticuerpo humanizado de afinidad alta obtenido en el paso (d) del método. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado tiene una afinidad picomolar para el antígeno seleccionado. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de 100 pM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de 75 pM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de 50 pM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de 25 pM o menos. Preferiblemente, el anticuerpo tiene una afinidad de 10 pM o menos para el antígeno seleccionado, más preferiblemente 5 pM o menos, y aún más preferiblemente, 1 pM o menos.

La presente invención se describirá a continuación únicamente a modo de ejemplo, en el cual se hace referencia a:

Figura 1: Muestra las fases de disociación de complejos antígeno/anticuerpo por BIAcore™. El apareamiento original de H5 y L5 se compara con nuevos apareamientos de H5 con L1 y H5 con L4.

Figura 2: Muestra las fases de disociación de complejos antígeno/anticuerpo por BIAcore™. El apareamiento original de H3 y L3 se compara con el nuevo apareamiento de H3 con L2.

Método de referencia 1

5 Se derivaron anticuerpos a partir de ratones hiperinmunes utilizando métodos esencialmente como los descritos en WO 92/02551 y utilizando un antígeno proteínico soluble de tamaño mayor que 15 kDa. Después del cribado de los sobrenadantes en cuanto a unión al antígeno, se obtuvieron pares de secuencias individuales de la región V a partir de células B individuales aisladas que se detectaron utilizando el método descrito en WO 2004/051268. Las regiones V obtenidas, después del análisis de la secuencia, se agruparon en familias. En una familia se identificaron 6 miembros de familia. Los seis tenían secuencias de aminoácidos VH CDR3 idénticas, y las regiones VH tenían una identidad de 84% y las regiones VL una identidad de 88% al nivel de aminoácidos. Las regiones V se clonaron en regiones constantes de ratón en vectores génicos individuales y se expresaron transitoriamente en células CHO en cada uno de los pares de cadenas pesada y ligera posibles. V.g., H1 y L1, H1 y L2, H1 y L3, H1 y L4, H1 y L5, H1 y L6, H2 y L1, H2 y L2, etc.

15 Se crearon y se sometieron a cribado la totalidad de las 36 combinaciones de cadenas H y L, encontrándose que 30 de dichas combinaciones eran nuevas.

Método para medidas largas del grado de disociación para complejos anticuerpo-antígeno

Preparación de la superficie de captura

20 Todos los experimentos se realizaron en un biosensor Biacore™ 3000. Se acopló IgG-Fc anti-ratón de cabra (Jackson 115-006-071) acoplado a la superficie del sensor CM5 utilizando química estándar de acoplamiento amínico. El nivel de acoplamiento se restringió a ~ 3600 RU. Se preparó también una celdilla de flujo en blanco. Todos los datos se basan en la sustracción de la señal obtenida en la celdilla de flujo en blanco de la señal obtenida en la superficie de IgG-Fc anti-ratón de cabra.

Determinación del grado de disociación

25 Todos los experimentos se realizaron en tampón HBS-EP (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% v/v agente tensioactivo P20) que contenía 1 mg/ml de CD-Dextrano.

Los anticuerpos se capturaron en la superficie del sensor para dar ~ 200 RU de material capturado (típicamente, una inyección de 10 µl de una solución de 3 µg/ml de anticuerpo a 10 µl/min). El antígeno se unió al anticuerpo (3 minutos de inyección de antígeno 12,5 nM a 30 µl/min. La tasa de flujo se aumentó luego a 100 µl/min y se siguió la disociación del antígeno unido durante 45 minutos.

30 La disociación del anticuerpo capturado de la superficie de IgG-Fc anti-ratón se controló por realización de un experimento de disociación en el cual se empleó tampón en sustitución del antígeno en el experimento principal de disociación. Este dato de control de tampón se sustrajo de los datos de disociación del antígeno ("referenciación doble") antes del análisis de los datos.

Presentación de los datos

35 Los datos se presentan por alineación de los mismos para diferentes anticuerpos desde el comienzo de la fase de disociación. Visualmente, está claro qué combinaciones de cadena/anticuerpos tienen el grado de disociación mejorado (más lento) (Figuras 1 y 2).

40 Estos mismos datos pueden adaptarse también a un modelo de disociación monofásico y calcularse la constante de grado de disociación derivada de esto. Este es un procedimiento automático que utiliza el software BIAevaluation (versión 3.2).

Los datos se muestran en la Tabla 1:

Par	kd (1/s)
H3 L3	2,73E-05
H3 L2	1,07E-05
H5 L5	3,63E-05
H5 L4	3,32E-05

H5 L1	6,18E-06
-------	----------

Tabla 1: Constantes de grado de disociación para los pares de cadenas pesada y ligera.

Tres nuevos pares tenían unión al antígeno mejorada con respecto a los pares originales.

REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de al menos un anticuerpo recombinante con afinidad mejorada para un antígeno seleccionado a partir de una familia de anticuerpos generados *in vivo* que se unen al antígeno seleccionado, que comprende:
 - 5 a) obtener a partir de células B una familia de dos o más anticuerpos generados *in vivo* que se unen al mismo antígeno y conservan los apareamientos VH y VL generados *in vivo* en los cuales la secuencia de aminoácidos VH CDR3 de cada anticuerpo en la familia tiene una identidad de 100%;
 - b) re-aparear la región VH de un anticuerpo obtenido en el paso (a) con la región VL de un anticuerpo diferente obtenido en el paso (a) para producir un nuevo anticuerpo recombinante; y
 - 10 c) someter a cribado el anticuerpo recombinante producido en el paso (b) y seleccionar dicho anticuerpo si tiene afinidad mejorada con respecto a la población inicial de anticuerpos obtenida en el paso (a) en donde en el paso (a) los anticuerpos se obtienen a partir de células B aisladas individuales y se obtienen las secuencias que codifican las regiones variables de los anticuerpos.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la familia de dos o más anticuerpos obtenida en el paso (a) se caracteriza adicionalmente porque la región VH de cada anticuerpo tiene una identidad mayor que 60% al nivel de aminoácidos y la región VL de cada anticuerpo tiene una identidad mayor que 60% al nivel de aminoácidos.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual en el paso (b) cada región VH de los anticuerpos obtenidos en el paso (a) se re-aparea con cada región VL de tal modo que cada nueva combinación VH:VL se produce como un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo y al menos uno de los anticuerpos recombinantes producidos se somete a cribado en el paso (c).
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el cual cada nueva combinación de anticuerpos producida en el paso (b) se somete a cribado en el paso (c).
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual los pasos (b) y (c) se repiten para diferentes pares VH:VL hasta que se identifica un anticuerpo con afinidad mejorada en el paso (c).
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el cual se obtienen tres o más anticuerpos en el paso (a).
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende adicionalmente el paso (d) en el cual el anticuerpo obtenido en el paso (c) se humaniza.

Figura 1

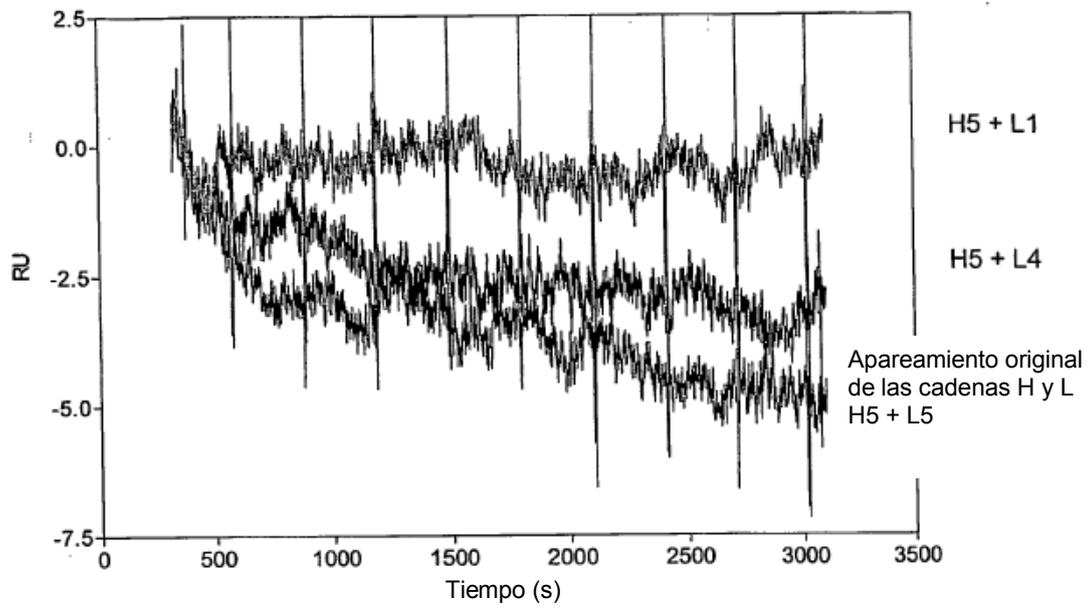


Figura 2

