

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 582**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2004** **E 04748618 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013** **EP 1639009**

54 Título: **Biblioteca de Fab para la preparación de una mezcla de anticuerpos**

30 Prioridad:

30.05.2003 EP 03076671

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

21.06.2013

73 Titular/es:

MERUS B.V. (100.0%)

Padualaan 8

3584 CH Utrecht, NL

72 Inventor/es:

HOOGENBOOM, HENDRICUS RENERUS

JACOBUS MATTHEUS y

LOGTENBERG, TON

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 408 582 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

Biblioteca de Fab para la preparación de una mezcla de anticuerpos

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular, en particular a la biología molecular médica. El reconocimiento específico desempeña un papel importante en la biología médica moderna. Las interacciones receptor-ligando, respuestas inmunes, infecciones, conversiones enzimáticas se basan todas en el reconocimiento específico entre moléculas. De particular interés son las interacciones específicas proteína-proteína, que dan una amplia selección de posibilidades para interferir en todas las clases de procesos biológicos. A lo largo de los procesos naturales biológicos se encuentra que dependen de más de una interacción proteica (simultánea). En el momento presente parece que intervenir en más de un punto en un proceso biológico va a ser más efectivo que una interferencia individual. Particularmente en la terapia de anticuerpos se ve que un anticuerpo (monoclonal) a menudo no es suficientemente efectivo para tratar un trastorno y/o enfermedad particular. Por lo tanto la atención de muchos investigadores médicos se centra ahora en terapias de combinación. Ejemplos bien conocidos de combinaciones de anticuerpos que se persiguen clínicamente actualmente son para el tratamiento de linfoma no de Hodgkin, la combinación del ya aprobado anticuerpo anti-CD20 Rituxán con el anticuerpo anti-CD22 Epratuzumab de AmGen y para el tratamiento de hepatitis B, una combinación de dos anticuerpos humanos que se desarrollan por XTL Pharmaceuticals (Galun E. y cols., Hepatology (2002) 35: 673-679). Sin embargo, la combinación de múltiples (dos o más) fármacos (sean anticuerpos u otros) tiene varios inconvenientes, técnicos, prácticos y reguladores. Los fármacos no se diseñaron como combinaciones y desarrollo con eficacia clínica óptima y la compatibilidad puede ser un problema. Como un ejemplo, las condiciones para estabilizar una pueden ser perjudiciales para la estabilidad de la(s) otra(s). Además, fuentes múltiples de producción recombinante conducen a fuentes múltiples de riesgos tales como contaminación vírica, contaminación anterior y similares.

El documento US 5.667.988 describe procedimientos para mutagénesis en una región recombinante complementaria (CDR) de un gen de cadena ligera de inmunoglobulina para el propósito de producir bibliotecas de genes de cadena ligera para usar en combinación con genes de cadena pesada y bibliotecas de genes para producir bibliotecas de anticuerpos.

Burioni y cols., Virology 228, 29-35 (2001) revelan la identificación de Fab humanos que unen la glucoproteína E2 del virus de la hepatitis C. Los Fab individuales se generaron en bacterias y se probaron en experimentos de ELISA.

Chen y cols., J. Mol. Biol. (1999) 293, 865-881 describen un anticuerpo anti-VEGF optimizado que se ha obtenido por maduración de afinidad de la parte de Fav de un anticuerpo VEGF humanizado (Fab-12; forma de IgG conocida como rhuMAb VEGF), por mutación de región determinante complementaria seguida por selección de afinidad usando presentación de fago monovalente.

El documento WO 2004/009618 describe procedimientos para la producción de mezclas de anticuerpos en los que se expresan secuencias de ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y al menos una cadena ligera en un huésped recombinante.

La presente invención proporciona combinaciones de proteínas de unión específicas, tales como inmunoglobulinas, que se diseñan para ser combinaciones verdaderas, siendo funcionales y compatibles entre sí esencialmente todos los componentes de la combinación. Produciendo combinaciones verdaderas los autores de la presente invención han abierto una vía de mejoras tanto en la producción como en las propiedades de las combinaciones. Estas mejoras y sus ventajas serán patentes a partir de la siguiente descripción.

La invención proporciona un procedimiento para producir una mezcla que comprende al menos dos anticuerpos diferentes y/o fragmentos de anticuerpo, en los que dichos al menos dos anticuerpos y/o fragmentos comprenden regiones variables emparejadas y tienen diferentes especificidades de unión, comprendiendo dicho procedimiento

(a) poner en contacto al menos tres regiones variables diferentes derivadas de cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas dentro de una célula en condiciones que permiten el emparejamiento de regiones variables;

(i) en el que al menos una de dichas regiones variables es una región variable de cadena ligera compatible de emparejamiento; y

(ii) en el que la composición de la mezcla está influenciada manipulando una cualquiera de los parámetros que afectan el nivel de expresión de las regiones variables logradas en la célula; y

(b) cosechar todos los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos que tienen especificidades de unión resultantes del citado emparejamiento.

Especificidades de unión se definen como interacciones entre moléculas que pueden distinguirse de las interacciones precedentes. Normalmente, las interacciones específicas entre moléculas tienen afinidad de unión más alta que las interacciones precedentes entre moléculas.

Las moléculas de unión específicas que por una parte importante están compuestas de residuos aminoácidos (moléculas proteínicas) a menudo requieren el emparejamiento de secuencias de aminoácidos diferentes con el fin de construir un sitio de unión. Una secuencia de aminoácidos que se empareja con otra secuencia de aminoácidos para construir un sitio de unión se designa como región variable en el presente documento. Por supuesto una

5 secuencia tal puede ser parte de una secuencia de aminoácidos más grande, que puede ser de nuevo parte de una molécula proteínica más grande, por ejemplo como una subunidad. Por ejemplo, en un anticuerpo una región determinante de complementariedad (CDR) puede ser una región variable, pero una combinación de tres CDR con sus regiones estructurales puede considerarse también como una región variable. De acuerdo con la presente invención al menos dos sitios de de unión diferentes se construyen en un sistema, en un procedimiento. Así se llevaron

10 conjuntamente regiones variables (secuencias de aminoácidos) en condiciones en las que pueden construir dos sitios de unión diferentes. Esto requiere al menos tres regiones variables, de las que una es capaz de emparejarse con ambas de las otras regiones variables, construyendo así dos sitios de unión específicos. Los dos sitios de unión específicos pueden estar en una molécula proteínica o en diferentes moléculas proteínicas, o ambas cosas.

En anticuerpos del isotipo IgG por ejemplo esto sería un anticuerpo que tiene dos sitios de unión idénticos o diferentes. Produciendo las dos especificidades de unión en un sistema, solamente hay una fuente de los productos y por lo tanto

15 menos riesgo de contaminación con virus, priones y similares. Un sistema tal puede ser un sistema libre de células, tal como un sistema de germen de trigo, pero se prefiere llevar a cabo procedimientos de acuerdo con la invención dentro de una célula, o de más células del mismo origen, preferentemente el origen de los sujetos a tratarse, normalmente humano. Para propósitos de producción y selección se prefieren normalmente otras células tales como bacterias,

20 células de insectos, levaduras y otras eucariotas.

Si el emparejamiento de las regiones variables tiene lugar en una célula, después se prefiere que la producción de las regiones variables también tenga lugar en una célula, preferentemente la misma célula. Un modo particularmente útil de producir regiones variables es a través de la expresión de ácidos nucleicos que codifican estas regiones variables. Se prefiere que todas las regiones variables en una célula se produzcan por tal expresión, es por lo tanto también

25 posible producir varias regiones variables de esta manera y haber llevado otras regiones variables, en base a técnicas diferentes de producción, o a los mismos medios de producción, pero en otra célula. Para la mayoría de los propósitos la naturaleza del ácido nucleico no es crítica, puede ser ARN, es preferentemente ADN, puede ser episomal o integrado, parte de un viral vector o un plásmido, etc. Sin embargo, para el sistema de producción final de la combinación de proteínas que tienen especificidades de unión diferentes, se prefiere que el ácido nucleico o los ácidos

30 nucleicos que codifiquen las regiones variables estén integrados establemente en el genoma del huésped. La producción de regiones variables a través de la expresión de ácidos nucleicos que los codifican da la posibilidad de manipular las secuencias codificantes, permitiendo de este modo el diseño de especificidades de unión nuevas, mejores propiedades de emparejamiento, secuencias útiles de intercambio desde una secuencia codificante hasta otra y similares. Se da también la posibilidad para selección para propiedades mejoradas o diferentes de unión y/o de

35 emparejamiento después de que se han hecho las alteraciones, dando origen a la creación de bibliotecas de muchos ácidos nucleicos diferentes en sistemas con mecanismos de selección fáciles.

De esta manera se puede reducir el número de regiones variables a expresarse para obtener sitios de unión diferentes. Alguien puede diseñar y/o seleccionar una denominada región variable promiscua, que es capaz de emparejarse con más de una región de unión diferente. El emparejamiento se define en el presente documento como cualquier clase de

40 unión para construir un sitio de unión, sea por unión covalente o no covalente, disposición conformacional, plegamiento, dimerización, multimerización o cualquier otra manera. Ello abarca términos tales como asociación, ensamblado, unión, combinación y similares, siendo ello directa o indirectamente. Particularmente cuando más de dos especificidades de unión diferentes se hacen en una célula, es útil tener regiones variables promiscuas en un sistema tal, reduciendo el número de diferentes ácidos nucleicos que tienen que expresarse. En un sistema tal, la región

45 variable promiscua no contribuiría significativamente a la especificidad de unión de las regiones emparejadas. Preferentemente está implicada mayoritariamente en plegamiento y estabilidad, influenciando por lo tanto indirectamente la especificidad de unión.

Aparte de reducir el número de ácidos nucleicos a expresarse, eligiendo una o más regiones variables promiscuas, el número de regiones variables emparejadas que no son funcionales se pueden reducir a esencialmente cero.

Particularmente en el campo de las inmunoglobulinas, que normalmente comprenden dos pares de dos regiones variables emparejadas diferentes, la producción de más de una inmunoglobulina dentro de la misma célula conduce a

50 menudo a emparejamiento de dos regiones variables que no conducen a una especificidad de unión deseada. En la presente invención, se diseñan pares tales que en un sistema esencialmente todas las regiones variables pueden emparejarse con otras en el sistema para formar un sitio de unión específico útil. En procedimientos de la técnica anterior en los que se expresaron cuatro regiones variables en híbridos-híbridomas o cuadromas, el resultado fue un

55 porcentaje bajo de anticuerpos biespecíficos deseados, un porcentaje de cualesquiera anticuerpos originales y un porcentaje sustancial de regiones emparejadas sin especificidad de unión útil significativa. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir con los procedimientos de acuerdo con la presente invención, bien conjuntamente con o bien sin la producción concomitante de los anticuerpos originales, pero normalmente esencialmente sin

60 producción de los pares no funcionales. Además se pueden producir mezclas de múltiples anticuerpos monoclonales y múltiples anticuerpos biespecíficos con los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

Los procedimientos como se desvela en la descripción detallada mantienen adaptación de los ácidos nucleicos que codifican regiones variables para el resultado final deseado. Usando emparejamiento promiscuo se puede diseñar el resultado final. Adicionalmente, los procedimientos como se revelan en la descripción detallada estipulan la adaptación de los ácidos nucleicos que codifican las regiones constantes para conducir a un emparejamiento preferencial de los sitios de unión formados por las regiones variables cuando se unen a las regiones constantes. Anticuerpos en la presente invención se desea para hacer referencia a todas las variaciones de inmunoglobulinas que mantienen unión específica, tales como Fab, Fab'2, scfvs, pero es típica para anticuerpos de acuerdo con la presente invención la presencia de un par de secuencias de aminoácidos (al menos dos CDR) que se emparejan para formar un sitio de unión. Así la invención proporciona también un procedimiento en el que dichas regiones variables se derivan de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de inmunoglobulinas, versiones manipuladas de regiones variables con elementos de cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulinas y/o un procedimiento en el que dichas moléculas proteináceas son anticuerpos, fragmentos y/o derivados de anticuerpos.

Los procedimientos de acuerdo con la invención se prefieren normalmente para la producción de múltiples (es decir tres o más) especificidades de unión en un sistema. Debido al diseño específico de las regiones variables que contribuyen esto ha llegado a ser técnicamente y comercialmente factible.

Otro elemento de la invención útil para el control de la producción es situar la expresión de diferentes regiones variables sometida al control de diferentes elementos, tales como promotores, (trans)activadores, potenciadores, terminadores, anti-represores, represores y similares. Estos elementos de control pueden ser inducibles o reprimibles. Así la producción de regiones variables puede regularse, optimizando así las condiciones de emparejamiento según se desea. Se pueden hacer combinaciones diferentes de regiones variables por separación en el tiempo de la expresión de varias regiones variables y/o las proporciones entre diferentes regiones variables emparejadas se pueden manipular regulando los niveles de expresión. Las variaciones se describen en la descripción detallada. La invención también proporciona una célula recombinante para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo ácidos nucleicos que codifican regiones variables conjuntamente con todos los elementos requeridos para expresión génica y emparejamiento, en los que dicha célula comprende medios para influir la composición de la mezcla manipulando uno cualquiera de los parámetros que afectan al nivel de expresión de las regiones variables logrado en la célula. Un sistema de expresión tal comprende al menos una célula recombinante, tal como una bacteria, una célula de levadura, una célula fúngica, al menos una célula recombinante, tal como una bacteria, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula de insecto, una célula de plantas u otra célula eucariota, en particular una célula de mamífero, más en particular una célula humana.

Un sistema tal puede proporcionarse con todos los elementos de control necesarios y útiles según se revela en el presente documento antes y como se conoce bien en la técnica. Se pueden introducir también en un sistema tal según se desee elementos de selección y elementos suicidas.

Se proporciona también una colección de células de acuerdo con la invención que comprende diversas combinaciones de especificidades diferentes, normalmente como una biblioteca para usar al seleccionar combinaciones deseadas de regiones variables.

Tales procedimientos de selección son también parte de la presente invención. Así la invención de una realización proporciona también un procedimiento para seleccionar combinaciones de moléculas proteináceas que tienen afinidad específica por al menos dos epítomos diana, comprendiendo poner en contacto una colección de acuerdo con la invención con dichos dos epítomos diana y seleccionar combinaciones que muestren dicha afinidad de especificidad.

Tales procedimientos son particularmente útiles cuando dichos dos epítomos diana están asociados con una enfermedad o trastorno. Se prefiere combinar un procedimiento tal con someter una combinación seleccionada de moléculas proteináceas a un ensayo biológico indicativo de un efecto de la combinación sobre la enfermedad y/o el trastorno.

Se describen también composiciones obtenibles por los procedimientos de la invención. Se prefieren composiciones que comprenden al menos tres regiones variables emparejadas diferentes, que tienen especificidades de unión distintas, en particular aquellas en las que dichas regiones variables se derivan de cadenas de inmunoglobulina ligeras y/o de cadenas de inmunoglobulina pesadas. Una composición de combinación que tiene como diana tanto TNF- α así como IL-1 β , es una combinación a modo de ejemplo. En tales usos terapéuticos típicos, es importante que las preparaciones de combinaciones no conduzcan a respuestas inmunes graves en el sujeto a tratarse. Al menos algunas de las partes antigénicas de las moléculas de unión, tales como las regiones constantes en los anticuerpos podrían ser de origen humano. Alternativamente, las partes antigénicas pueden omitirse o enmascarse por moléculas tales como PEG. Aunque los anticuerpos han encontrado uso en otra áreas y las combinaciones de anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden usar en otras áreas, se prefiere el uso farmacéutico de las combinaciones, tanto diagnóstico como terapéutico, con una preferencia por el último. Sin embargo, en aplicaciones industriales las combinaciones pueden ser también superiores a las técnicas de separación existentes, debido a la facilidad de producción, a la consistencia de de producción y a la disponibilidad de muchas combinaciones de especificidades, capaces de separar casi cualquier cosa de una mezcla. En realización de pruebas, sea en diagnósticos farmacéuticos o en cualquier otro campo (ambiental, agrícola, por nombrar unos pocos) las

combinaciones se pueden usar también ventajosamente. Ambos compañeros de un ensayo en sándwich se pueden elaborar en una célula. Se pueden hacer mezclas de aglutinación en una célula. Cuando se usa el formato de IgG, la expresión en la misma célula conducirá a una fracción sustancial de compuestos biespecíficos, que ofrece aplicaciones únicas en combinación con los monoclonales presentes en la misma mezcla. Por ejemplo cuando un anticuerpo monoclonal se puede unir solamente con un brazo a un antígeno, una molécula biespecífica con sitios de unión capaces de unir a dos epítomos diferentes en el mismo antígeno, puede inmovilizar o atrapar antígeno más consistentemente que la mezcla de anticuerpos monoclonales. De nuevo, la facilidad y la consistencia de producción, así como la diversidad de especificidades es un recurso de las combinaciones de la invención. Estas ventajas por supuesto también se aplican al seleccionar y producir combinaciones de especificidades para uso terapéutico y/o profiláctico, con ventajas adicionales en facilidad de selección, eficacia de combinaciones seleccionadas y los aspectos de seguridad mencionados. Una combinación simple comienza con dos especificidades presentes en la combinación. Dado que está presente una región variable promiscua, una combinación tal requiere solamente tres regiones variables diferentes. Se puede hacer la combinación de tal forma que todas las regiones variables emparejadas resultantes en una molécula proteinácea tengan la misma especificidad, dando moléculas monoespecíficas, o la variable o, si es apropiado se pueden diseñar las regiones constantes de tal forma que las moléculas biespecíficas estén también presentes. Se puede diseñar también de tal forma que estén presentes una molécula monoespecífica y una molécula biespecífica, pero que la otra molécula monoespecífica posible no surja, debido a que las regiones variables no puedan ensamblarse de esa manera. En algunas aplicaciones moléculas biespecíficas, especialmente anticuerpos, pueden ser ventajosas para unir dos antígenos conjuntamente en una superficie celular. Tales eventos de agregación se requieren a menudo en biología para transducción de una señal al interior de una célula. Los anticuerpos biespecíficos en la mezcla se pueden usar también para conectar moléculas efectoras con células diana. Los usos contemplados para anticuerpos biespecíficos en la técnica anterior se contemplaron también para moléculas biespecíficas descritas en el presente documento. Las composiciones más ventajosas comprenden más de dos moléculas de unión monoespecíficas diferentes, opcionalmente conjuntamente con las combinaciones posibles diferentes de moléculas biespecíficas o multiespecíficas que pueden resultar de diferentes eventos de emparejamiento posible. Estas mezclas multiespecíficas parecen mezclas policlonales en su eficacia para reconocer antígenos, pero sin los inconvenientes de muchas especificidades irrelevantes en la mezcla. Las mezclas parecen anticuerpos monoclonales en su constitución definida, facilidad de producción y especificidades altas, pero sin la pérdida concomitante de eficacia. Las mezclas de acuerdo con la invención se refieren como Oligoclonics™. Oligoclonics™ pueden contener así dos, tres, o más especificidades de unión y pueden existir en diversos formatos. En la forma más simple, Oligoclonics™ en el formato IgG contiene una mezcla de diferentes anticuerpos monoespecíficos y anticuerpos biespecíficos en una proporción particular dada. En el formato Fab, Oligoclonics™ contiene una mezcla de diferentes moléculas Fab que son el producto de regiones variables emparejadas correctamente. En el formato mezclado, Oligoclonics™ contiene una mezcla de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos.

Como se revela en el presente documento, los procedimientos de la invención son la producción de combinación de especificidades. Antes de la producción de combinaciones, se pueden diseñar y/o seleccionar combinaciones adecuadas. Estos procedimientos para diseño y selección son también parte de la presente invención.

Así en una realización adicional la invención proporciona un procedimiento para producir una mezcla que comprende al menos dos anticuerpos diferentes y/o fragmentos de anticuerpo, en los que dichos al menos dos anticuerpos y/o fragmentos comprenden regiones variables emparejadas y tienen diferentes especificidades de unión, comprendiendo dicho procedimiento

poner en contacto al menos tres regiones variables diferentes derivadas de cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas dentro de una célula en condiciones que permiten el emparejamiento de regiones variables,

en el que al menos una de dichas regiones variables es una región variable de cadena ligera compatible de emparejamiento;

cosechar todos los anticuerpos y/o fragmentos de los mismos que tienen especificidades de unión que resultan de dicho emparejamiento,

por lo que las regiones variables se expresan a partir de uno o más ácidos nucleicos que codifican estas regiones variables,

por lo que la expresión de dichas regiones variables está sometida a la dirección de diferentes elementos de control.

Los procedimientos de síntesis, alteración y selección se describen en más detalle en la descripción detallada.

Los ácidos nucleicos preferidos para usar en producir combinaciones de especificidades son aquellos que codifican polipéptidos de inmunoglobulina. Por supuesto todos los tipos de inmunoglobulinas, especialmente anticuerpos (IgM, IgE, IgG, etc.) pero también fragmentos (scFv, Fab, dominio individual, variantes manipuladas) se pueden usar en la invención. Las regiones variables pueden por ejemplo derivarse bien de regiones variables de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, o bien de regiones variables de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, pero también pueden manipularse híbridos de regiones variables de cadenas pesadas y ligeras (con por ejemplo regiones CDR o regiones

FR). Las regiones variables pueden obtenerse por ejemplo de hibridomas, clonando a partir de donantes inmunes o no inmunes o pueden construirse sintéticamente regiones variables. Incluso se pueden producir híbridos usando ácidos nucleicos y procedimientos de la invención. Por ejemplo se pueden hacer híbridos con sitios de unión diferentes pero funcionales proporcionando elementos de diferentes isótopos, por ejemplo IgM e IgG, o IgM e IgA. Debe tenerse en cuenta que los receptores de células T se parecen a anticuerpos en muchos aspectos. Así, los procedimientos de acuerdo con la invención se pueden aplicar ventajosamente con receptores de células T, sus regiones variables y sus ácidos nucleicos codificantes. Se prefiere así que la invención se lleve a cabo usando inmunoglobulinas que tengan cadenas diferentes (receptores de células T), especialmente anticuerpos que tengan cadenas ligeras y/o cadenas pesadas o partes/derivados de los mismos. Por supuesto partes y/o derivados de acuerdo con esta invención son tales partes y/o derivados que tienen propiedades de unión comparables a inmunoglobulinas.

Esto quiere decir que regiones variables de acuerdo con la invención deberían comprender al menos un elemento que parezca una región determinante de complementariedad de un anticuerpo (CDR). Preferentemente ello debería tener más de una CDR, preferentemente una región variable que parezca en tamaño y en propiedades fisicoquímicas una VH o VL de un anticuerpo. La descripción detallada describe la invención usando anticuerpos como una realización a modo de ejemplo de la invención.

La invención se describirá en más detalle en la siguiente descripción detallada.

Leyendas de las figuras:

Figura 1: Ejemplos de la composición de tres o seis moléculas proteínicas con tres especificidades de unión diferentes. El uso de anticuerpos con emparejamiento apropiado entre las regiones variables proporciona mezclas de anticuerpos que son biespecíficos o monoespecíficos y bivalentes (panel superior). Por manipulación apropiada para manipular el emparejamiento entre las regiones variables, surgen mezclas de moléculas solamente biespecíficas o bivalentes (paneles del lado a mano izquierda). En la leyenda del panel derecho (caja gris) se indica que los tres símbolos el círculo, el triángulo y el cuadrado, representan sitios de unión que consisten cada uno en regiones variables.

Figura 2: Procedimiento para identificar anticuerpos con elementos compatibles por análisis empírico de combinaciones de regiones variables de anticuerpos.

Figura 3: Anticuerpos con cadena ligera o pesada por selección a partir de bibliotecas con diversidad restringida. En este ejemplo de una biblioteca Fab, una de las cadenas de anticuerpos es idéntica en todos los miembros de la biblioteca (la cadena blanca), mientras que las otras contienen diversidad de aminoácidos.

Figura 4: Diferentes aproximaciones para seleccionar anticuerpos con comportamiento de emparejamiento apropiado. (a) selección de biblioteca de Fab con cadena ligera constante y equivalente para biblioteca de Fab con diversidad en cadena ligera solamente en (d); (b) selección de anticuerpo de dominio individual de unión a antígeno de biblioteca solamente de cadena pesada y equivalente para VL en (e); (c) selección de biblioteca de cadenas quiméricas de VH y VL (en la que por ejemplo algunos elementos de CDR se intercambian).

Figura 5: Seleccionar anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento reorganizando una cadena. El punto de partida del procedimiento es un repertorio de sitios de anticuerpos, con regiones variables emparejadas, tales como en este ejemplo, un repertorio Fab. De forma similar se pueden usar bibliotecas de Fv de cadena individual. En una selección típica (superior) el emparejamiento inicialmente presente de regiones variables se mantuvo por todo el procedimiento de selección reiterativa; en la selección seguida por reorganización (etapas 1-3), una de las dos regiones variables (preferentemente de la cadena pesada) de los pares que se han seleccionado en el antígeno, se combina con dominios compañeros (preferentemente cadenas luminicas) derivadas bien de la población seleccionada o bien de la población original). Después de esto la selección (etapa 4) y el procedimiento subsiguiente se repiten. Eventualmente, los anticuerpos reactivos de antígenos individuales se identifican por procedimientos de rastreo.

Figura 6: Ejemplo de una selección competitiva de anticuerpos con un comportamiento de emparejamiento deseable. El procedimiento implica la co-expresión de uno o más anticuerpos que compiten (arriba, a la izquierda) en la misma célula huésped como un miembro de una biblioteca de anticuerpos (abajo, a la izquierda). Se representa el procedimiento para fragmentos Fab, como se describe en el texto. Se representa el resultado de las oportunidades de emparejamiento de cadena VHCH1 (cajas blancas) cuando se coexpresa con otros fragmentos Fab. La combinación original de la VH con su cadena ligera análoga (caja rayada), mantendrá su afinidad de unión original por antígeno y podrá así seleccionarse.

Figura 7: Identificar anticuerpos específicos de antígeno co-transfectando bibliotecas de genes de cadenas pesadas con un gen de cadena ligera invariable y rastreando las mezclas de anticuerpos resultantes para anticuerpos reactivos frente a antígenos. Con cada ciclo de transfección y rastreo, la diversidad de la biblioteca de VH se reduce (en la posición *), para proporcionar eventualmente una población de genes variables de cadena pesada reactivos frente a antígenos. Los números indican que la toma de muestras de una biblioteca de 10^8 cadenas pesadas diferentes se puede llevar a cabo rastreando los pocillos de 10 cultivos de tejido de 96 pocillos con cada 100 clones por pocillo.

Figura 8: Identificar anticuerpos específicos de antígeno transfecando bibliotecas de genes de cadenas pesadas segregables, ensamblar con un gen de cadena ligera invariable y rastrear las mezclas de anticuerpos resultantes para anticuerpos reactivos frente a antígenos.

5 Con cada ciclo de transfección y rastreo, la diversidad de la biblioteca de VH se reduce (en la posición *), para proporcionar eventualmente una población de genes variables de cadena pesada reactivos frente a antígenos.

Figura 9: Rastrear mezclas de anticuerpos producidos por la misma célula original para bioactividad óptima. Las mezclas se hacen transfecando genes de cadenas pesadas que codifican los anticuerpos de interés (aquí el número es 10) conjuntamente con cadena ligera óptimamente emparejada, seguida de clonación de líneas celulares, seleccionando líneas celulares de producción estable y rastreando eventualmente las mezclas de anticuerpos resultantes para bioactividad óptima.

Figura 10: Ejemplos de anticuerpos con dominios cruzados. Dominios de cadena pesada (cajas con bandas de gris) y dominios de cadena ligera (cajas blancas).

Figura 11: Montaje ex vivo de anticuerpos (A) y el concepto de anticuerpo universal (B). Los anticuerpos se producen como cadenas separadas y después se combinan para formar un anticuerpo funcional. Esto es particularmente interesante cuando se hacen mezclas de anticuerpos, como se indica en (B), donde dependen de la entrada de las cadenas y de la separación de las reacciones de mezclado.

Figura 12: Expresión dependiente de cadenas de Ig. La cadena-1 es normalmente la cadena pesada, que está sometida al control de un promotor (P). La secuencia IRES enlaza la expresión de la cadena pesada con aquella de un transactivador; esto activa un promotor con capacidad de responder a Cadena-2, normalmente la cadena ligera (véase el texto para detalles).

Figura 13: La secuencia de poliengarce de pSCFV, un plásmido basado en pUC119 adecuado para clonación por etapas de regiones variables de anticuerpos y para expresión de fragmentos scFv.

Figura 14: Representación esquemática de plásmido pSCFV-3 (A) y pSCFV-3 con 3 fragmentos scFv clonados, en este caso derivados de los anticuerpos JA, JB y M57. La caja negra es una representación esquemática del tramo de histidina; se indican también otras etiquetas basadas en el extremo C-terminal. S, secuencia señal; rbs, sitio de unión a ribosoma, AMP^r, gen de resistencia a ampicilina (beta-lactamasa).

Figura 15: Representación esquemática del vector de expresión de eucariotas VHEXpress como se describe también en (Persic y cols. (1997) 187: 9-18) salvo porque esta variante tiene un promotor CMV; su uso para clonar fragmentos scFv (arriba, indicado para anticuerpo JA) tal que se logra la expresión de fusiones scFv-Fc.

Figura 16: Alineamiento de secuencia de las tres secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras de anticuerpos JA (Kappa) y JB y M57 (ambos lambdas). Se indica la posición de las CDR.

Figura 17: presentación de pFAB: Representación esquemática de presentación de pFAB (arriba) e indicación de clonación de regiones VLCL y VH; la región de poliengarce (debajo). Legenda como en la Figura 14.

Figura 18: Mutagénesis de región variable del anticuerpo JA; la región subrayada se mutagenizó. Otras regiones conocidas por ser importantes para la interacción con la VL: los residuos en las posiciones marcadas en color (parte de abajo) o con las cajas alrededor de la secuencia de JA-VH son alternativamente adecuados para mutagénesis (en base a datos de <http://www.biochem.unizh.ch/antibody/Structures/DimContacts/VHDimHistFrame.html>).

Figura 19. Resumen de un vector de expresión para anticuerpos monoclonales humanos en células eucariotas. CMV: promotor CMV; p(A): señal de poliadenilación; Neo: gen de resistencia a neomicina; Amp: gen de resistencia a ampicilina.

Figura 20. Resumen del casete de expresión y de los vectores de expresión para usar con células eucariotas. La leyenda de los elementos de los vectores se representa a la derecha. En el panel superior a mano izquierda se representan como ejemplo cuatro casetes de expresión eucariota para tres cadenas pesadas de anticuerpos y una cadena ligera. Los elementos encontrados en un casete de expresión para un gen o ácido nucleico individual que codifica cadena de anticuerpo normalmente comprenden un promotor, una secuencia líder, una fase de lectura abierta que codifica la cadena de anticuerpos de interés, una región de poliadenilación y terminador, todo en configuración operable. Se muestran sitios/regiones adicionales usados para recombinación dirigida a sitio y en algunos casos homóloga (son también opcionales; indicadas en la parte de arriba del primer casete de expresión). En el panel de arriba se representa un armazón de vector a modo de ejemplo usado para inserción en lo(s) casete(s) del panel de arriba. Este esquema presenta los elementos típicos de un vector de expresión eucariota, que comprende un origen de replicación bacteriano (tal como ColE1), un marcador de selección bacteriano (B-Select, tal como el gen de resistencia a ampicilina), un marcador de selección eucariota (Select, tal como gpt, neo, zeo etc., véase texto; útil está prevista cuando la interacción estable en el genoma de la célula huésped) y elementos adicionales opcionales tales como una región de encapsidación de bacteriófagos (para producción de cadena única de ADN, tal como el f1) y un marcador de amplificación opcional (tal como DHFR). Son opcionales otros elementos que controlan expresión (tales como BE,

STAR, LCR, MAR y similares, véase más adelante) e IRES; estos están incluidos en las figuras más tardías.

Figura 21: Los esquemas que representan formatos diferentes para la co-expresión de genes que codifican cadenas de anticuerpos, se ejemplifican aquí para el caso en que dos anticuerpos que comparten una cadena ligera común (no mostrada) tengan que coexpresarse. (A) Los casetes individuales básicos, como casetes separados y se clonan en vectores de expresión separados. (B) Este casete contiene los dos genes de cadena pesada (H) clonados en tándem, pero su expresión esta regulada individualmente, por medio de dos promotores diferentes, P1 y P2. (C) Los dos genes H se clonan en direcciones transcripcionalmente opuestas y en este ejemplo están separados por un elemento que influye la frecuencia de expresión/estabilidad/integración (se dan ejemplos adicionales en el texto). (D) Igual que en B, pero los elementos E adicionales están incluidos en el extremo 3' de cada una de las dos unidades transcripcionales. (E) Para los casos en los que dos proteínas de unión estarían presentes en la mezcla en cantidades aproximadamente similares, se inserta un IRES entre dos genes H. (F y G) Casetes de expresión para mediar la expresión de dos cadenas H, en los que cada uno de los genes H está unido por medio de un elemento IRES a un marcador de selección (que se selecciona después para usar en lugar del marcador basado en vector de armazón), sin elementos adicionales (G) o con elementos adicionales (H) en un casete para influenciar la expresión.

Figura 22: Plásmido pABExpress40 para expresión de bibliotecas de anticuerpos compatibles en células de mamífero. Se indican sitios de clonación para inserción direccional de genes de región variable de anticuerpos. Véase Ejemplo número 11 para detalles. Sin la inserción de STAR40 dentro del sitio EcoRI, este plásmido se llama pABExpress.

Figura 23: Diseño de una biblioteca de cadenas ligeras híbridas para identificar una cadena ligera compatible en emparejamiento para h4D5v8 y 2C4. Las secuencias de aminoácidos usadas por herceptina (trastuzumab, h4D5v8) y pertuzumab (Omnitarg, 2C4) se comparan entre sí y con dos bibliotecas de cadena ligera de diseño, HYB1 y HYB2 (véase ejemplo 17 para detalles del diseño).

Los residuos idénticos a aquellos de herceptina están indicados con un guión, los aminoácidos están codificados por el consenso de letra individual, X quiere decir posiciones a marcarse por diversificación en una aproximación de biblioteca. Se indicaron números para las posiciones de residuo más relevantes (véase texto para más detalles).

Figura 24: Plásmido p2Fab-HER2 usado para la identificación de una región variable de cadena ligera que es compatible de emparejamiento con dos anticuerpos de unión HER2, h4D5v8 y 2C4. La caja negra es una representación esquemática de la etiqueta de histidina (6 histidinas); se indican también otras etiquetas basadas en el extremo C-terminal. S, secuencia señal; rbs, sitio de unión a ribosoma, AMP^r, gen de resistencia a ampicilina (beta-lactamasa). La versión de la VL de h4D5 que está presente en este vector lleva dos mutaciones diseñadas en dos residuos CDR y un codón de parada (indicado con *) en la región CDR2. Por mutagénesis dirigida a sitio, la CDR2 se diversifica usando un oligonucleótido (diseñado de acuerdo con enfoque HYB2) que retira simultáneamente el codón de parada así como introduce diversidad en 3 posiciones del CDR2. Este plásmido dirige la expresión de dos cadenas pesadas de anticuerpos (como cadenas Fd) y una cadena ligera de anticuerpos y así permite producción simultánea y detección individual, de dos fragmentos Fab.

Figura 25: Las curvas de inhibición de crecimiento para h4D5 Fab y las mezclas de 4D5* y 2C4* (véase Ejemplo 17) que usan diferentes cadenas ligeras, se indicaron con VL1 a VL7. Las concentraciones diferentes de estos Fab se incuban con células positivas a HER2 sensibles al efecto inhibitor del crecimiento de anticuerpos que tienen como diana HER2.

Descripción detallada

En la lucha contra la infección, el sistema inmune crea una respuesta celular y humoral que puede combatir específicamente al agente infeccioso. La respuesta inmune humoral se basa en inmunoglobulinas, o anticuerpos, que ponen en contacto antígenos y median ciertas funciones efectoras para quitar la infección ((Roit, I.M. y cols. (1985)) y todas las referencias en el presente documento). En el sistema inmune los anticuerpos los generan los linfocitos B. Los anticuerpos consisten en cadenas pesadas y ligeras que se ensamblan por medio de emparejamiento entre dominios y puentes disulfuro intercatenarios para formar moléculas multivalentes. Existen diversos isotipos de anticuerpos naturales, incluyendo IgG (con 4 subclases en seres humanos IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgD, IgA e IgE. Una molécula de IgG contienen dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas pesadas (L), ambas con una región variable (V) y una región constante (C). Un típico anticuerpo IgG comprende dos regiones variables de cadenas pesadas (H) (abreviadas en el presente documento como VH) y dos regiones variables de cadenas ligeras (L) (abreviadas en el presente documento como VL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones estructurales" (FR). La extensión de la región estructural y de las CDR se ha definido de forma precisa (véase, Kabat, E.A. y cols. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N.º: 91-3242 y Chothia, C. y cols. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917), que se incorporan en el presente documento por referencia.

En la generación de la respuesta inmune primaria, el emparejamiento de secuencias de región variable pesadas y ligeras de anticuerpos es un procedimiento al azar. Los genes de región variable se ensamblan primero por recombinación de un conjunto escogido al azar de elementos genéticos V, (D) y J representados en el genoma como

una reserva de diversos genes. Las regiones variables pesadas y ligeras recombinadas se ajustaron después hacia sus genes de región constante respectivos y las cadenas se expresaron, se ensamblaron y se segregaron como inmunoglobulina. En esta biblioteca combinatoria, en principio cada cadena pesada puede emparejarse con cada cadena ligera, para crear un repertorio amplio de diferentes especificidades de antígeno, con diversidad derivada de los procesos de reordenamiento (que también inducen diversidad adicional en alguna de las uniones de segmentos) y del ensamblaje combinatorio de las regiones variables de cadenas pesadas y de cadenas ligeras. En principio las células B producen solamente una especificidad de anticuerpo, codificado por una secuencia de cadena pesada de anticuerpo y por una secuencia de cadena ligera de anticuerpo. El sistema inmune selecciona por medio de un procedimiento de selección de antígenos eficiente aquellos anticuerpos que pueden unirse a un antígeno dado, en particular cuando el antígeno es exógeno y parte de un patógeno.

En inmunoglobulinas naturales, la cadena ligera que consiste en dos dominios está emparejada con la cadena pesada, que consiste en al menos 4 dominios y una región de asa: tienen lugar interacciones no covalentes entre VH y VL y entre CH1 y CL; entre las últimas un puente disulfuro proporciona un enlace covalente entre las cadenas pesada y ligera. Además, las cadenas pesadas se encuentran emparejadas entre sí, es decir en el formato IgG y algunas veces asociadas adicionalmente con elementos adicionales tales como cadenas J (es decir en el formato IgM). Tiene lugar una fuerte interacción no covalente entre los dominios CL y CH1, una interacción frecuentemente más débil está presente entre VL y VH. Las cadenas pesadas se emparejaron por medio de interacciones en la región de asa (a menudo asociadas covalentemente por medio de uno o más puentes disulfuro) y entre los dominios CH2 y CH3. Secuenciando grandes reservas de genes variables de anticuerpos de células B aisladas y comparando la frecuencia de los emparejamientos de segmentos VH y VL, se confirmó que este emparejamiento entre regiones VH y VL es en promedio un proceso al azar. Sin embargo, dado que las regiones variables son genéticamente diversas y algo de esta diversidad al nivel de aminoácido está estructuralmente situada en la región de interfase predicha entre los dos dominios, el emparejamiento de una VH dada con otra VL ya no es al azar. Por ejemplo, el emparejamiento de una VH dada con otra VL distinta de la que se seleccionó inicialmente con ella, puede conducir a pérdida de afinidad de unión por el antígeno, pero puede conducir también a eficiencia de emparejamiento reducida. Dentro de una célula B, normalmente y normalmente se expresan solamente una cadena ligera y una cadena pesada, pero en los pocos casos en que se expresen otras cadenas pesadas o ligeras (tales como en dos células B fusionadas), puede tener lugar emparejamiento erróneo entre las cadenas y la unión a antígeno se pierde en esta fracción de la preparación de anticuerpos. Por ejemplo, en el pasado, la expresión de dominios variables de anticuerpos múltiples, como en cuádrimas o células transfectadas con múltiples genes de cadenas pesadas y/o ligeras, normalmente proporcionan una fracción grande de emparejamientos de regiones variables que no son funcionales. Con el fin de construir anticuerpos biespecíficos, se investigó de forma intensiva el emparejamiento de diferentes cadenas de anticuerpos pesadas y ligeras cuando se expresan en la misma célula. A partir de estudios de emparejamiento en anticuerpos derivados de hibridomas de híbridos hechos fusionando dos hibridomas que producen anticuerpos, se mostró que el emparejamiento está basado en una asociación al azar de cadenas ligeras y pesadas con algunos casos donde se vio un cierto nivel de emparejamiento preferencial, pero no suficiente para evitar que tenga lugar emparejamiento erróneo.

La presente invención describe diversos procedimientos para seleccionar anticuerpos con comportamiento de emparejamiento de cadenas de anticuerpos óptimo. Con tales procedimientos se pueden hacer composiciones de anticuerpos múltiples con diferentes especificidades de unión.

1. Anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento.

a. Sumario

En el presente documento los autores de la presente invención revelan procedimientos y medios para obtener anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento. La presencia de tales regiones variables facilita la predictibilidad y la funcionalidad del emparejamiento resultante entre las regiones variables de anticuerpos. Dos anticuerpos contienen regiones variables compatibles de emparejamiento cuando el emparejamiento de las regiones variables en una mezcla de todas las regiones variables combinadas, tiene lugar en una manera tal que surgen predominantemente sitios de unión funcionales como resultado del emparejamiento. Dos anticuerpos han emparejado regiones variables compatibles cuando por ejemplo los dominios de cadena ligera variables de ambos anticuerpos se pueden intercambiar por el del otro anticuerpo, sin alterar drásticamente la afinidad de unión a antígeno de los dos anticuerpos. Otro ejemplo de cuando los anticuerpos han emparejado regiones variables compatibles es cuando comparten una región variable idéntica o estrechamente relacionada: en ese caso el emparejamiento de los dos dominios compañeros a esta región compartida conducirá a la formación de sitios de unión funcional.

Se describen procedimientos para la identificación de anticuerpos que tienen regiones variables compatibles. En la forma más simple regiones variables compatibles de emparejamiento en conjuntos de anticuerpos se identifican en virtud de la identidad de secuencia de las regiones V. En otro enfoque se identifican regiones variables compatibles de emparejamiento por intercambio empírico de genes V o de fragmentos de genes V entre anticuerpos dados y por puesta a prueba de la unión de antígenos. En otro enfoque, anticuerpos con una alta probabilidad de contener regiones variables compatibles de emparejamiento se pueden enriquecer a partir de repertorios de anticuerpos por combinaciones de selecciones y por reordenamiento. Usando estrategias de selección apropiadas, se pueden seleccionar emparejamientos de anticuerpos para llegar a ser promiscuos o exclusivos en el contexto de los genes

variables de anticuerpos múltiples deseados. Se describe también un procedimiento para proporcionar un anticuerpo dado con secuenciación variable compatible de emparejamiento, usando diversas tecnologías de mutagénesis y selección. En otro enfoque, los anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento se seleccionan a partir de bibliotecas de anticuerpos sintéticos con una alta probabilidad de identificar anticuerpos con tales elementos (por ejemplo a partir de una biblioteca con solamente un dominio variable variegado). Además, los anticuerpos con regiones variables compatibles se crean seleccionando primero un anticuerpo de dominio individual específico de antígeno y proporcionando después este con un segundo dominio que se emparejará con el primero para formar una molécula de dos dominios.

Se pueden identificar regiones variables compatibles con el fin de reemplazar secuencias en un anticuerpo por las secuencias equivalentes de otro anticuerpo que se piensa que media características más favorables. La transferencia de regiones variables compatibles de emparejamiento se puede usar para alterar la capacidad de emparejamiento y la fuerza de emparejamiento de las cadenas de anticuerpo, pero ello puede también contemplarse para alterar la inmunogenicidad, el idiotipo y el rendimiento de la expresión de anticuerpos. Los anticuerpos que llevan tales elementos son también altamente adecuados para elaborar composiciones farmacéuticas de anticuerpos con sitios de unión múltiples, por ejemplo para hacer mezclas de anticuerpos que contienen tales elementos, por coexpresión en la misma célula huésped. En particular cuando las regiones variables presentan un dominio variable completo (tal como una cadena ligera) la coexpresión proporcionará sitios de unión funcionales solamente. Anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento son adecuados para la creación de mezclas de anticuerpos, en las que los anticuerpos son bien solamente monoespecíficos, o bien biespecíficos, o una mezcla de anticuerpos mono y biespecíficos, o incluso, dependiendo de la elección de isotipos con más de dos sitios de unión (por ejemplo sIgA, IgM), combinaciones de especificidades múltiples con la misma molécula de anticuerpo. Tales aproximaciones proporcionan un medio para tener en la misma preparación farmacéutica anticuerpos con especificidades múltiples y si se requiere combinaciones de especificidades dentro de la misma molécula.

b. Fuentes de anticuerpos

Los anticuerpos adecuados para la invención pueden derivarse de diversas fuentes, incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos de fagos, anticuerpos de animales transgénicos, etc. Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos usando el procedimiento de hibridoma primero descrito por Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975) o pueden elaborarse por procedimientos de ADN recombinante. En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, está inmunizado para facilitar linfocitos que son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente al antígeno usado para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Los anticuerpos pueden aislarse también de animales transgénicos que albergan genes de inmunoglobulinas humanas.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar también usando tecnología de biblioteca de anticuerpos basada en presentación, en la que se seleccionan fragmentos de anticuerpos exponiendo una biblioteca de tales anticuerpos presentada en la superficie de fagos, levadura u otra célula huésped, al antígeno de interés y aislando aquellos fragmentos de anticuerpo que se unen a la preparación antigénica. Una biblioteca de presentación es una colección de entidades; cada entidad incluye un componente polipeptídico accesible y un componente recuperable que codifica o identifica el componente peptídico. Muchos fragmentos de anticuerpos se han mostrado en la superficie de entidades que llevan el material genético que codifica el fragmento de anticuerpo dentro de la entidad, tales como bacteriófagos. Este formato se llama "presentación de fagos". La presentación de fagos se describe, por ejemplo, en Ladner y col., patente de EE. UU. N.º: 5.223.409; Smith (1985) Science 228: 1315-1317. Otros formatos de presentación usan fusiones de péptidos-ácidos nucleicos. Se pueden generar condensaciones de polipéptidos-ácidos nucleicos por la traducción *in vitro* de ARNm que incluye un grupo de puromicina unido covalentemente, por ejemplo, como se describe en Roberts y Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94: 12297-12302 y Patente de los EE.UU. N.º: 6.207.446. El ARNm puede transcribirse de forma inversa en ADN y reticularse al polipéptido. En otro formato de presentación la biblioteca es una biblioteca de presentación de células. Las proteínas se presentaron en una célula, por ejemplo, una célula eucariota o procariota. Las células procariotas a modo de ejemplo incluyen células de *E. coli*, células de *B. subtilis*, esporas, células eucariotas a modo de ejemplo incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, células de insectos y células de mamíferos. Procedimientos para la presentación de fragmentos de anticuerpos y la construcción de bibliotecas de anticuerpos en diversos formatos se describen bien en la bibliografía y se conocen por aquellos expertos en la técnica.

c. Identificación de elementos compatibles de emparejamiento en paneles de anticuerpos reactivos a antígenos

Anticuerpos con secuencias de región variable compatible de emparejamiento y por lo tanto comportamiento de emparejamiento adecuado de regiones variables, se identifican por diversos procedimientos que se revelan en este documento. En una primera aproximación, los anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento se seleccionan de paneles de anticuerpos específicos de antígenos (en los que el antígeno puede ser un antígeno diana definido pero también una colección de diferentes antígenos y el panel contiene al menos dos anticuerpos), como sigue. Las secuencias de regiones variables pesadas y ligeras se determinan e inspeccionan para encontrar clones

con dominios variables de cadena ligera o pesada idénticos o altamente similares. Si la secuencia de aminoácidos de parte de la región variable completa es idéntica para dos anticuerpos, los dos anticuerpos dados tienen una región variable compatible de emparejamiento. En otro enfoque, se identifican las regiones variables compatibles de emparejamiento en secuencias de aminoácidos que parecen relacionadas pero tienen diferencias de aminoácidos: por ejemplo si hay diferencias en la secuencia de aminoácidos pero se usa la misma línea germinal o un segmento de línea germinal relacionada, o cuando regiones CDR altamente similares se usan, o si se encuentran similares pliegues canónicos en algunas regiones CDR pero se usan segmentos de línea germinal diferentes, las regiones variables pueden comprender aún regiones variables compatibles de emparejamiento. Esto se confirma intercambiando la(s) región/regiones variable(s) entre los anticuerpos en el panel y midiendo la unión a antígenos de los nuevos pares. Experimentalmente se pueden intercambiar cadenas ligeras o pesadas y partes de las mismas por procedimientos de ADN recombinante tales como clonación de ADN basada en enzimas de restricción, mutagénesis basada en oligonucleótidos, síntesis de genes y mutagénesis mediada por PCR, procedimientos que están ampliamente disponibles en la técnica. Los ensayos de unión que se pueden usar están bien establecidos en la técnica y se conocen por aquellos expertos en la técnica; algunos se describen más adelante. Este procedimiento puede identificar casos en los que ambas regiones variables pueden intercambiarse entre dos anticuerpos, tal como dos cadenas ligeras relacionadas que se pueden intercambiar con ningún efecto o con un efecto aceptable sobre la afinidad. Puede identificar también casos en los que solamente una de las regiones variables de los dos anticuerpos puede tolerar el intercambio, por ejemplo una cadena ligera que se empareja funcionalmente con una o dos cadenas pesadas solamente, mientras que la otra cadena ligera puede emparejarse funcionalmente con ambas cadenas pesadas. En ese caso la última cadena ligera se puede usar para reemplazar la anterior no emparejada y así crear dos anticuerpos con regiones variables compatibles en emparejamiento. Emparejamiento funcional quiere decir que el emparejamiento de región variable no tiene idealmente ningún efecto en la afinidad de unión a antígeno o en la especificidad de unión a antígeno, pero puede estar permitida también una reducción en la afinidad de < 10 veces y como máximo una reducción en afinidad de 100 veces, o cualquier mejora de afinidad.

En otra realización, se identifican regiones variables compatibles de emparejamiento en paneles de anticuerpos sin conocer o usar la secuencia de las regiones variables de los anticuerpos. Primero se crea una colección de variantes de anticuerpos en la que todas las regiones variables se combinan con las otras regiones variables compañeras de los anticuerpos en el panel. Después el efecto en la unión a antígeno se establece empíricamente, para identificar aquellos anticuerpos que pueden emparejarse funcionalmente con las regiones variables de los otros anticuerpos en el panel (Figura 2). Este procedimiento identifica regiones variables compatibles de emparejamiento que no se identifican inmediatamente por comparación de secuencias. En vez de usar las regiones variables compañeras derivadas de los anticuerpos en el panel, también se pueden usar otras regiones variables compañeras. Por ejemplo la región variable de cadena pesada de cada uno de los anticuerpos en el panel está combinada con un conjunto de regiones variables de cadena ligera elegidas, que consisten por ejemplo principalmente en segmentos codificados de línea germinal representativos de una o más de las familias de genes kappa o lambda de cadena ligera. Las regiones variables compatibles de emparejamiento se identifican después rastreando las combinaciones para unión a antígeno y puntuando si una región variable común proporciona unión a antígeno para el conjunto de anticuerpos deseado en el panel. Estos procedimientos pueden estar basados en valoración de unión de antígenos de combinación individual de los genes de región variable, así la coexpresión de dos regiones variables en el formato de anticuerpos deseado, o de unión a antígeno de combinaciones múltiples de regiones variables derivadas de co-expresión en la misma célula huésped. Por ejemplo dos regiones variables de cadena pesada de anticuerpos se pueden expresar dentro de la misma célula huésped como cadena Fd y se pueden coexpresar con una cadena ligera y unión a antígeno para ambos sitios de unión a anticuerpos valorados. Adicionalmente, etiquetando diferencialmente las dos cadenas pesadas, por ejemplo con etiquetas de epítomos tales como etiquetas derivadas de c-myc, VSV, HA etc., puede seguirse el emparejamiento de las dos combinaciones H-L. Una aproximación tal es adecuada para encontrar regiones variables compatibles si está disponible un número limitado de anticuerpos de partida y permite el rastreo de colecciones grandes de regiones variables compañeras.

Ejemplos de regiones variables compatibles compañeras son regiones V basadas en segmentos de línea germinal, o regiones V que difieren por cambios en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo con mutaciones somáticas u otras, delecciones menores, adiciones, sustituciones). En tal caso el efecto del intercambio de la región homóloga en el primer anticuerpo puede diferir del efecto visto con el intercambio de la región homóloga en el segundo anticuerpo; por ejemplo hay casos donde la afinidad se cambia a un nivel permitido solamente para uno de los dos anticuerpos y casos donde esto tiene lugar para ambos anticuerpos. En una realización la región variable compatible comprende la región variable de cadena ligera o parte de la región variable de la cadena ligera. En otra realización las regiones variables compatibles comprenden la región variable de cadena pesada o parte de la región variable de la cadena pesada.

Otra realización de una aproximación para identificar regiones variables compatibles de emparejamiento en un panel de anticuerpos es el siguiente. Primero la región variable de cada uno de los anticuerpos se coexpresa con una región variable compañera derivada de los otros anticuerpos en el panel y se lleva a cabo un rastreo que detectará la presencia de anticuerpo intacto (así no hay unión a antígeno). La formación de anticuerpo intacto indica emparejamiento entre las dos regiones variables; si no se recupera nada de anticuerpo intacto, esto indicará que las dos regiones variables no están emparejadas dentro de la célula huésped. El rastreo se puede usar para identificar anticuerpos que presentan regiones variables que no se pueden emparejar entre sí en el formato de anticuerpo elegido, es decir como fragmentos Fab expresados en *E. coli* o como moléculas de IgG expresadas en células

eucariotas. Cuando se coexpresan los 4 genes de región variable, solamente tienen lugar las interacciones análogas y los genes de región variable son compatibles en emparejamiento.

d. Anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento de bibliotecas de anticuerpos

En ciertas realizaciones, los anticuerpos con regiones variables compatibles están seleccionados de bibliotecas de anticuerpos sintéticos con una probabilidad alta de identificar anticuerpos con tales elementos. Las bibliotecas de anticuerpos sintéticos son colecciones de anticuerpos que se han diversificado sintéticamente (por ejemplo, usando mutagénesis dirigida a sitio o síntesis de genes basada en PCR usando oligonucleótidos mutagenizados) en regiones/localizaciones definidas dentro de sus regiones variables. En una realización el diseño de la diversidad introducida dentro del repertorio de anticuerpos primarios es tal que al menos una parte de una región variable y preferentemente una región variable completa no está diversificada, mientras que el área resultante contiene la diversidad (ejemplos en Figuras 3, 4a, 4c y 4d). Ejemplos de tales bibliotecas son bibliotecas basadas en genes de regiones variables humanas, por ejemplo un conjunto de 49 genes de cadena pesada diferentes con diversidad introducida en el VH-CDR3, todos combinados con una cadena ligera individual (Hoogenboom, H.R. y cols. (1992) J Mol Biol 227: 381-388). Los anticuerpos seleccionados de tales repertorios contendrán por diseño regiones variables compatibles de emparejamiento. Tales repertorios se pueden crear por procedimientos de ADN recombinante y se pueden presentar sobre la superficie del fago, las células, las esporas, los ribosomas o se pueden crear en ratones transgénicos llevando solamente diversidad parcial en la composición del gen V. La diversidad de síntesis se puede introducir en todos los residuos de CDR, en un subconjunto de residuos de CDR, es decir aquellos con exposición disolvente significativa y puede diseñarse para codificar todo o un subconjunto de aminoácidos, es decir aquellos que se observan comúnmente en los CDR de anticuerpos naturales. Un ejemplo de tal biblioteca de anticuerpos adaptada, con un armazón de dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera fijo y con un número limitado de residuos de CDR de cadena pesada variegados con un número limitado de anticuerpos codificantes se describe en J Mol Biol 338: 299-310 y en el documento WO 03/102157A2. Como alternativa a bibliotecas con diversidad de síntesis en una región variable, también se pueden usar bibliotecas con diversidad natural, o combinaciones de diversidad natural y de síntesis (por ejemplo diversidad de síntesis en CDR1 y CDR2 y diversidad de síntesis en CDR3) en una región variable.

En una realización se obtienen anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento seleccionando primero un anticuerpo de dominio individual específico de antígeno y proporcionando después este con un segundo dominio que se emparejará con el primero para formar una molécula de dos dominios (ejemplos en la Figura 4b en 4e). Se aíslan preferentemente anticuerpos de dominio individual a partir de repertorios de presentación *in vitro* hechos de repertorio de dominio único de ciertos fragmentos de región variable humana, tales como repertorios de VH humanas o de VL humanas. En otra realización se aíslan anticuerpos de dominio individual a partir de repertorios de VHH no inmunizados, inmunizados o sintéticos, basado en dominios de cadenas pesadas de anticuerpos desprovistos de forma natural de cadenas ligeras (por ejemplo anticuerpos de camellos, de llamas o de algunos tiburones). Se pueden combinar anticuerpos basados en VH de dominio individual con actividad de unión a antígenos por medio de tecnología de ADN recombinante con una cadena ligera individual, un repertorio pequeño de cadenas ligeras, una colección elegida de cadenas ligeras o un gran repertorio de cadenas ligeras, preferentemente de naturaleza humana. Variantes de unión a antígeno de dominios individuales ahora forzados a contener una cadena ligera emparejada, se pueden aislar usando tecnología de presentación basada en procedimientos equivalentes. En otra realización se combinan anticuerpos basados en VH de dominio individual con actividad de unión a antígenos por medio de tecnología de ADN recombinante con una cadena ligera individual, un repertorio pequeño de cadenas ligeras, una colección elegida de cadenas ligeras o un gran repertorio de cadenas ligeras, preferentemente de naturaleza humana. Variantes de unión a antígeno de dominios individuales ahora forzados a contener una cadena pesada emparejada, se pueden aislar usando tecnología de presentación basada en procedimientos equivalentes. En las realizaciones de la Figura 5, las variantes derivadas de la misma vía de aislamiento compartirán siempre una secuencia de región variable, así serán capaces de proporcionar emparejamiento funcional cuando se pongan en el contexto de regiones variables múltiples de emparejamiento.

Si al menos una parte de una región variable y preferentemente una región completa no está diversificada, mientras el resto de la(s) región/regiones variable(s) contienen la diversidad, los anticuerpos de unión a antígenos seleccionados que vienen de tales repertorios contendrán por diseño regiones variables compatibles de emparejamiento. En muchos de los enfoques en la bibliografía usados para construir anticuerpos de afinidad alta a partir de bibliotecas de anticuerpos sintéticos, la diversidad en la biblioteca inicial se construye por todos los genes de región variable de anticuerpos y en particular en la mayoría de las seis CDR. Dependiendo de la elaboración genética de estas bibliotecas, habría una probabilidad superior o inferior de identificar anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento. Se pueden diseñar bibliotecas para ajustar específicamente esta aplicación nueva, introduciendo diversidad en una región variable solamente y no diversificar adicionalmente la región variable compartida, incluso en procedimiento de maduración de afinidad adicionales. Se usan preferentemente bibliotecas en las que la diversidad está restringida a las tres CDR en una cadena. La región variable compañera es después preferentemente una región codificada por genes de la línea germinal o un pequeño conjunto de regiones codificadas por genes de la línea germinal sin cualquier diversidad adicional. En la biblioteca principal o en las bibliotecas de seguimiento, se puede introducir diversidad en aquellas áreas de las regiones V de anticuerpos que es menos probable que interactúen con la cadena compañera, para incrementar así las probabilidades para encontrar anticuerpos de unión a antígenos con alta

afinidad pero regiones variables que se emparejan bien.

Los anticuerpos con una alta probabilidad de contener regiones variables compatibles de emparejamiento pueden también enriquecerse a partir de repertorios de anticuerpos no influidos en su elaboración genética, por combinaciones de selecciones y por reordenamiento de preferentemente la región V completa de una población dada o de un clon dado (ejemplificada en la Figura 5). Esto se enriquecerá por aquellos anticuerpos específicos de antígenos con una probabilidad alta de contener regiones variables compatibles de emparejamiento, por ejemplo debido a que son tolerantes en su emparejamiento con la región reordenada mantendrán aún unión a antígenos, o debido a que es menos probable que la región reordenada contribuya a unión a antígenos. Por ejemplo, una biblioteca de Fab de anticuerpo se enriquece primero en antígeno y las cadenas pesadas seleccionadas obtenidas después de una o más rondas de selección se recombinan después con el repertorio de cadenas ligeras seleccionadas o no seleccionadas (líneas discontinuas en Figura 5) y seleccionadas de nuevo en antígeno (Figura 5, etapa 4). De esta manera los dominios de cadena pesada variable de anticuerpos seleccionados tendrán la propensión a unirse al antígeno de forma relativamente independiente de la cadena ligera a la que están emparejados. Los anticuerpos para un primer y segundo antígeno se pueden identificar usando la selección descrita anteriormente y el experimento de reordenamiento, seguido por un rastreo como anteriormente, para detectar unión de antígenos de las cadenas pesadas seleccionadas en combinación con una colección de cadenas ligeras. Alguien puede identificar aquellos anticuerpos que se unen bien al primero o bien al segundo antígeno de forma relativamente independiente de la cadena ligera, o en presencia de un miembro de familia de cadenas ligeras relacionada. Debido a la dominancia de la cadena pesada en unión a antígenos en estos anticuerpos, muchas de las cadenas ligeras es probable que se emparejen funcionalmente con las regiones variables de múltiples cadenas pesadas. La co-expresión de anticuerpos con una región variable que está mediando unión a antígenos (tal como la VH) y en la que el dominio compañero no está implicado o no es importante para unión a antígeno (tal como la VL), conducirá de forma similar a la formación de principalmente o solamente sitios de unión funcionales).

En otra realización la invención describe un procedimiento para obtener anticuerpos con regiones variables pesada y ligera que preferencialmente o en el mejor caso, exclusivamente, se emparejan entre sí y no con las regiones variables ligeras y pesadas respectivas de uno o más anticuerpos, por ejemplo aquellos que se coexpresan en el mismo huésped. Tal selección se puede hacer para presentar metodología, pero también usando una vía de selección intracelular que se basa en la coexpresión de cadenas ligeras de anticuerpos y de cadenas Fd en la misma célula, permitiendo competición entre las cadenas y rescate de la combinación por medio de presentación de fagos o por medio de cualquier otra vía adecuada. El emparejamiento preferencial o idealmente exclusivo que se encuentra en los anticuerpos fieles ayudará en la formación de sitios de unión principalmente o solamente funcionales cuando se coexpresan tales anticuerpos. Este procedimiento permite esencialmente un nivel alto de sitios de unión a anticuerpos funcionales para formar incluso cuando se usan genes de regiones variables que tienen composiciones muy distintas. Se describe aquí un procedimiento para identificar anticuerpos con comportamiento de emparejamiento deseado en base a selección de competición. Los anticuerpos se seleccionan a partir de una biblioteca de fragmentos de anticuerpo, llevando a cabo una selección directamente en una célula huésped que coexpresa diferentes anticuerpos. Por ejemplo cuando se aplica para usar bibliotecas de bacteriófagos este concepto es el siguiente. Las bacterias se proporcionan con un genoma de fago o de fagémido que lleva los genes que codifican un fragmento Fab en una manera tal que tras la expresión, una de las cadenas se unirá a una partícula de fagos. En la misma célula huésped, se coexpresan otros fragmentos Fd de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos, por ejemplo los genes de Fab que codifican un anticuerpo dado, o cualquier conjunto de anticuerpos múltiple. Por ejemplo considerar co-expresión de dos Fab en la misma célula, una de las cuales está unida por medio de su cadena pesada (fragmento Fd, esencialmente VH-CH1) a la proteína de recubrimiento de fago. Como una consecuencia de esta co-expresión, tiene lugar competición dentro de la misma célula (en este caso en el periplasma) entre las dos cadenas ligeras por el emparejamiento a la cadena Fd unida a fago. Adicionalmente, la cadena pesada soluble del Fab que compete será capaz de emparejarse con ambas cadenas ligeras presentes en la misma célula. En este sistema las partículas de fagos con actividad de unión a antígeno tendrán lugar con diferentes tipos de emparejamientos. Primero, si la cadena ligera correcta se emparejará con su cadena pesada compañera solamente en el fago (emparejamiento exclusivo) y en segundo lugar, si la cadena pesada en la superficie del fago es dominante en unión a antígeno y tolerante para emparejamiento, la unión de antígenos que se producen producción será virtualmente independiente de con qué cadena ligera se emparejen. Funcionalmente tales pares de anticuerpos se comportarán de la misma manera. En el caso de la primera situación, cuanto menores sean las interacciones entre compañeros de los dos pares de anticuerpos respectivos, mayor es la proporción de Fab funcional en el fago. El procedimiento descrito puede estar dirigido adicionalmente a anticuerpos con preferentemente un emparejamiento exclusivo, proporcionando etiquetas en las cadenas y enriquecimiento o depleción para combinaciones particulares (por ejemplo depleción para aquellos fagos que llevan las cadenas ligeras competidoras por medio de una etiqueta única presente en estas cadenas). Este procedimiento cuando se aplica al aislamiento de anticuerpos por medio de la selección de una biblioteca de fagos de Fab, proporcionará una frecuencia alta de anticuerpos que tendrán un comportamiento apropiado y rendimiento funcional alto cuando se producen como mezcla por co-expresión. El uso de competición-selección para desviar los anticuerpos seleccionados a ser compatibles en co-expresión, se puede aplicar también a otras bibliotecas de presentación (por ejemplo bibliotecas de presentación de levaduras) y a sistemas de bibliotecas in vitro basados en presentación de ribosomas o en presentación de ARNm (sistema de puromicina), con procedimientos de rastreo o selección de anticuerpos que reconocen antígeno como se describe de forma extensiva en la técnica. Adicionalmente

el procedimiento descrito de competición-selección de fragmentos de anticuerpos para emparejamiento mejorado (o selección de antígenos y emparejamiento compatible) usando presentación de fagos se puede traducir fácilmente en un sistema de selección intracelular (periplásmica) basado en complementación de proteínas o enzimas. En tales aproximaciones, enzimas fragmentados, complementarios o autoinhibidores se usan para dirigir la selección de moléculas de interacción que se condensan a los componentes del sistema de selección. Solamente cuando hay una interacción de una fuerza mínima llegará a activarse la proteína o la enzima y en condiciones de selección apropiadas, las células sobrevivirán. Tales procedimientos se han descrito por ejemplo para las enzimas beta-lactamasa y DHFR, con sus aplicaciones en la selección de anticuerpos o fragmentos de ADNc expresados que presentan un comportamiento de unión particular. Por ejemplo se ha descrito selección competitiva para la maduración de afinidad de anticuerpos en el sistema TACZYME de Kalobios Inc. En la invención actual, no es la unión a antígeno sino la fuerza de emparejamiento la que puede hacerse la fuerza selectiva para una población dada de anticuerpos presentes en tal sistema.

En una realización preferida se usa el procedimiento para identificar anticuerpos nuevos de bibliotecas de fagos que muestran regiones variables compatibles de emparejamiento con un anticuerpo existente que tiene secuencias de región variable dadas. El anticuerpo con la especificidad antigénica conocida está clonado para co-expresión como fragmento Fab en célula huésped que expresa colectivamente una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos de Fab humanos. Esto puede hacerse proporcionando la casete de expresión de Fab en un plásmido que es compatible con la presencia de un genoma de fago o de fagémido, tal como el plásmido basado en pBR322. Las células huésped que albergan este plásmido se infectan después con las partículas de fagos que codifican una biblioteca de Fab humanos clonados por ejemplo en un vector de fagémido tal como pUC 119, o en un vector de fago tal como fd-tet-DOG1. Mientras se expresa el fragmento Fab que compete, se recogen las nuevas partículas de fagos (después de infección con fago ayudante si es apropiado) a partir de este cultivo. Estas partículas se usan para selección en antígeno y el fago resultante se re infecta dentro de células que albergan el fragmento Fab competidor. Después de unas pocas rondas reiterativas, los Fab de fagos se rastrean por unión a antígeno en un ensayo de unión; el comportamiento de emparejado entre los Fab reactivos y las regiones variables del Fab que compete pueden ponerse a prueba adicionalmente por ensayos de coexpresión y de unión. El formato preferido para esta selección es el formato Fab y no el formato scFv, principalmente debido a que para la mayoría de las aplicaciones los anticuerpos de tipo IgG completos necesitarán establecer que tienen interacciones entre las cadenas que albergan las regiones variables que imitan aquellas vistas en el formato Fab. La Figura 6 representa un ejemplo de como este procedimiento trabaja por dos Fab que compiten con anticuerpos en una biblioteca de fagos.

Este procedimiento requiere algunas etapas de optimización, por ejemplo el uso de un mutante CH1 con afinidad reducida por su CL y Fab que no presentan un puente disulfuro intermolecular de tal forma que el emparejamiento permanecerá no covalente. Los residuos posicionados en la región de interfase CH1-CL pueden estar mutados de tal forma que la afinidad entre estos dos dominios está reducida, por ejemplo 10 veces o 100 veces y como un resultado en el formato de Fab el emparejamiento de los dominios variables llegará a ser más dominante en dirigir las dos cadenas conjuntamente. Los anticuerpos seleccionados de tales bibliotecas de Fab mutadas, o de bibliotecas de Fv en las que no hay asociación covalente entre las dos regiones variables, pueden estar influidos hacia un comportamiento de emparejamiento preferencial.

En una realización adicional la invención comprende la creación de bibliotecas de anticuerpos en las que se hacen provisiones para mediar el emparejamiento único entre las cadenas pesada y ligera, de tal forma que es improbable que interactúen con anticuerpos derivados de una composición "regular" o de una composición influida no deliberadamente. Un ejemplo de tal provisión es un par CH3-CH3 manipulado con ensamblaje de botón en ojal, en el que se proporciona un dominio con un aminoácido con una cadena lateral grande, voluminosa (por ejemplo una tirosina; el botón) que sobresale afuera hacia la región de interfase, mientras que el otro dominio en la posición equivalente estructural, porta una o más mutaciones (por ejemplo tres) para crear un ojal dentro del que se ajustará el "botón". Ejemplos de tales interfases de dominios manipuladas se han publicado también para regiones variables (Zhu y cols. (1997) Protein Science 6: 781-788). Se mostró que los efectos de mutantes de una interfase de dominio son dependientes del contexto (anticuerpo), lo que proporciona además una oportunidad para manipular las interacciones de dominio de región variable en una manera específica de anticuerpo, en un modo tal que cuando se permitan emparejarse pares de genes de anticuerpos variables, principalmente o solamente se recuperan los emparejamientos análogos. Como alternativa instalar un enlace disulfuro entre los dominios puede mediar un emparejamiento preferencial. Como alternativa, se introducen reemplazamientos de carga en las regiones estructurales, o combinaciones de estos con mutaciones complementarias estéricamente, para desfavorecer emparejamiento erróneo con una, y/o emparejamiento más favorable con la otra región variable compañera. Se han descrito anteriormente procedimientos de selección con bibliotecas mutantes e incluyen la selección de las bibliotecas de dominios en antígenos por medio de presentación de fagos de las regiones variables emparejadas (en scFv o Fab o, formato IgG), o presentación de ribosomas de los fragmentos scFv, o selecciones en base a la interacción en sí misma en lugar de aquella con antígeno. Un ejemplo de lo último se describe para heterodímeros seleccionados del dominio CH3 de inmunoglobulina gamma-1 (Atwell y cols. (1997) J Mol Biol 270: 26-35), que es aplicable para la presente invención como sigue: encender y apagar las regiones variables que deberían y no deberían interaccionar (dependiendo de cuál de ellas nos gustaría seleccionar, repulsión o atracción/emparejamiento) se presenta en fago (preferentemente como cadena VLCL o como cadena VHCH1), mientras que la otra se marca genéticamente y se produce en solución (preferentemente como VHCH1 o como VLCL). La interacción entre las dos regiones variables puede seleccionarse

para usar protocolos de selección de fagos estándar y reactivos anti-etiqueta. Se puede usar co-expresión con un par de regiones variables competidoras no marcadas como se describe anteriormente para dirigir la selección hacia pares de región variable que se emparejan exclusivamente ente sí.

En otra realización de sitios de unión con comportamiento de emparejamiento apropiado, los autores describen aquí el uso de anticuerpos derivados de bibliotecas VH-VH por un lado y de bibliotecas VL-VL por el otro; o el uso de bibliotecas quiméricas en las que están intercambiados elementos (una o más regiones CDR) entre VH y VL. En otra realización la invención comprende la creación de dos bibliotecas de anticuerpos con provisiones tales hechas para mediar emparejamiento único entre las cadenas pesadas y ligeras, tal que cuando los anticuerpos de estas bibliotecas se coexpresan, se emparejarán preferentemente con el compañero correcto.

Las bibliotecas de anticuerpos citadas pueden tomar diversas formas. Como una fuente de anticuerpos, se puede usar una biblioteca humana sin inmunizar, tal como las bibliotecas de anticuerpos descritas por Griffiths (Griffiths, A.D. y cols. (1993) EMBO J 12: 725-734), Vaughan (Vaughan, T.J. y cols. (1996) Nat Biotechnol 14: 309-314) o de Haard (de Haard, H.J. y cols. (1999) J Biol Chem 275 (274): 18218-18230). Tanto las cadenas pesadas como las ligeras en estas bibliotecas se derivan de los repertorios de genes V reordenados derivados del ARNm de linfocitos de sangre periférica (PBL) a partir de seres humanos no inmunizados y son por lo tanto altamente diversas. Como alternativa como una fuente de anticuerpos se usa un huésped o paciente inmunizado con respuesta humoral influida (por ejemplo pacientes con infecciones, enfermedades autoinmunes etc.). En bibliotecas inmunes hechas de un animal inmunizado frente a los haptenos, se mostró que muchos de los clones eran promiscuos y permitieron el emparejamiento de las cadenas pesada y ligera seleccionadas originalmente con cadenas compañeras derivadas de otros clones seleccionados. Así los anticuerpos con regiones variables compatibles pueden estar más frecuentemente en tales bibliotecas inmunitarias que en bibliotecas no inmunitarias.

La selección citada y las tecnologías de rastreo de anticuerpos recombinantes y sus fragmentos están bien establecidas en el campo. Los polipéptidos específicos de antígeno se pueden identificar a partir de bibliotecas de presentación por rastreo directo de la biblioteca, o pueden seleccionarse primero en antígeno para incrementar el porcentaje de clones reactivos de antígenos. El procedimiento de selección puede llevarse a cabo por diversas técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo usar el antígeno unido a una superficie (por ejemplo, una superficie de plástico, como en fijación), o usando el antígeno unido a una partícula de fase sólida que puede aislarse sobre la base de las propiedades de las perlas (por ejemplo, perlas de látex coloreadas o partículas magnéticas), o por clasificación celular, especialmente clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Como será patente para alguien experto en la técnica, el reactivo de afinidad específico de antígeno puede unirse directa o indirectamente (por ejemplo, por medio de un anticuerpo secundario) a la tinción, sustrato, o partícula. Los procedimientos de selección se han descrito selectivamente en la bibliografía (véase, por ejemplo, Hoogenboom, (1997) Trends Biotechnol. 15: 62-70). Otras publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nanomolar) de colecciones muy largas de anticuerpos y la maduración de afinidad de estos anticuerpos por reorganización de las cadenas u otras aproximaciones (revisadas en, por ejemplo, (Hoogenboom, H.R. y cols. (2000) Immunol Today 21: 371-378)). La unión de anticuerpos a sus respectivos antígenos puede llevarse a cabo usando técnicas de ensayo basadas en anticuerpos, tales como técnicas de ELISA, prueba de bandas de Western, inmunohistoquímica, análisis por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR), cromatografía de afinidad y similares, de acuerdo con procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo Sambrook y cols., 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma tradicionales para aislamiento de anticuerpos "monoclonales" (especialmente cuando se requieren anticuerpos humanos) que están abarcadas por la presente invención.

Lo siguiente describe realizaciones posibles de ensayos a modo de ejemplo para ensayos de unión: ELISA. Polipéptidos codificados por una biblioteca de presentación pueden rastrearse después por una propiedad de unión usando un ensayo de ELISA. Por ejemplo, cada polipéptido se pone en contacto con una placa de microvaloración cuya superficie del fondo se ha revestido con la diana, por ejemplo, una cantidad limitante de la diana. La placa se lava con tampón para eliminar polipéptidos unidos no específicamente. Después la cantidad del polipéptido unido a la placa se determina sondeando la placa con un anticuerpo que puede reconocer el polipéptido, por ejemplo, una etiqueta o parte constante del polipéptido. El anticuerpo está unido a una enzima tal como fosfatasa alcalina, que produce un producto colorimétrico cuando se proporcionan los sustratos apropiados. El polipéptido se puede purificar a partir de células o se puede ensayar en un formato de biblioteca de presentación, por ejemplo, como una fusión a un revestimiento de bacteriófago filamentoso. En otra versión del ensayo de ELISA, cada polipéptido de una biblioteca se usa para cubrir un pocillo diferente de una placa de microvaloración. El ELISA después se lleva a cabo usando una molécula diana constante para consultar cada pocillo.

Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). La interacción de unión de una molécula aislada de biblioteca de diversidad de hebras con una diana puede analizarse usando SPR. Por ejemplo, después de secuenciación de un miembro de biblioteca de presentación presente en una muestra y verificado opcionalmente, por ejemplo, por ELISA, el polipéptido presentado se puede producir en cantidad y se puede ensayar para unir la diana usando SPR. SPR o Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) detecta interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar cualquiera de los interactuantes. Cambios en la masa en la superficie de unión (indicadores de un evento de unión) del chip de BIA dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la

resonancia de plasmón superficial). Los cambios en la refractividad generan una señal detectable, que se mide como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas. Procedimientos para usar SPR se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º: 5.641.640; Raether (1988) *Surface Plasmon* Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63: 2338-2345; Szabo y cols. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699-705 y recursos en Internet proporcionados por BIAcore International AB (Uppsala, Suecia). La información de SPR se puede usar para proporcionar una medida segura y cuantitativa de la constante de disociación en el equilibrio (K_d) y parámetros cinéticos, incluyendo k_{on} y k_{off} , para la unión de una biomolécula a una diana. Tales datos se pueden usar para comparar biomoléculas diferentes. Por ejemplo, las proteínas codificadas por ácidos nucleicos seleccionadas de una biblioteca de hebras de diversidad pueden compararse para identificar individuos que tienen afinidad alta por la diana o que tienen una k_{off} lenta. Esta información se puede usar también para desarrollar relaciones estructura-función (SAR). Por ejemplo, los parámetros de unión cinético y en el equilibrio de versiones maduras de una proteína parental pueden compararse con los parámetros de la proteína parental. Pueden identificarse aminoácidos variantes en posiciones dadas que correlacionan con parámetros de unión particulares, por ejemplo, afinidad más alta y k_{off} lenta. Esta información puede combinarse con modelización estructural (por ejemplo, usando modelización de homología, minimización de energía, o determinación de estructura por cristalografía o RMN). Como un resultado, una comprensión de la interacción física entre la proteína y su diana puede formularse y usarse para guiar otros procedimientos de diseño.

Ensayos de unión homogéneos. La interacción de unión del polipéptido candidato con una diana se puede analizar usando un ensayo homogéneo, es decir, después de que están añadidos todos los componentes del ensayo, no se requieren manipulaciones de fluidos. Por ejemplo, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) se puede usar como un ensayo homogéneo (véase, por ejemplo, Lakowicz y cols., Patente de los EE.UU. N.º: 5.631.169; Stavrianopoulos y cols., Patente de los EE.UU. N.º: 4.868.103). Otro ejemplo de un ensayo homogéneo es Alpha Screen (Packard Bioscience, Meriden CT). Alpha Screen usa dos perlas marcadas. Una perla genera oxígeno singlete cuando se excita con un láser. La otra perla genera una señal lumínica cuando el oxígeno singlete difunde desde la primera perla y choca con ella. La señal solamente se genera cuando las dos perlas están en proximidad. Una perla puede unirse al miembro de la biblioteca de presentación, el otro a la diana. Las señales se miden para determinar el grado de unión. Los ensayos homogéneos se pueden llevar a cabo mientras que el polipéptido candidato esté unido al vehículo de la biblioteca de presentación, por ejemplo un bacteriófago.

Rastreo automatizado. Los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento son también adecuados para rastreos automatizados de bibliotecas de diversidad para encontrar clones con regiones variables compatibles de emparejamiento. Por ejemplo, una biblioteca de presentación de Fab o scFv se puede rastrear en busca de miembros que se unen a una molécula diana. La biblioteca puede rastrearse directamente o seleccionarse primero en antígeno una o varias veces. Los aglutinantes a partir de una primera ronda de rastreo pueden amplificarse y re-rastrear, una o más veces. Los aglutinantes a partir de una segunda ronda o a partir de rondas subsiguientes se aíslan individualmente, por ejemplo, en una placa de micropocillos. Cada aglutinante individual puede someterse a ensayo después para unión a la molécula diana, por ejemplo, usando ELISA, un ensayo de unión homogéneo, o un ensayo de proteínas. Estos ensayos de clones individuales pueden automatizarse usando robots. Las secuencias de los clones seleccionados se pueden determinar usando robots y cebadores oligonucleotídicos que permiten leer las secuencias de región variables de los clones seleccionados. Los resultados del ensayo y las secuencias se pueden almacenar en un sistema de computadora y se pueden evaluar a simple vista o usando software, por ejemplo, para identificar clones que cumplen con parámetros particulares (por ejemplo, por afinidad de unión y/o especificidad de unión y por homología de secuencia).

e. Forzar emparejamiento apropiado de regiones variables de anticuerpos por medio de mutación y selección

Hay casos donde los anticuerpos con secuencias de región variable, especificidad de antígeno y afinidad de antígeno están disponibles, pero donde no se puede lograr comportamiento de emparejamiento con las secuencias existentes. Algunos de los procedimientos mencionados anteriormente se pueden aplicar para resolver esto, en particular el rastreo de un panel combinatorio de pares de región variable para encontrar fortuitamente pares compatibles, o la selección de anticuerpos nuevos que tienen el comportamiento de emparejamiento deseable, por ejemplo usando selección de competición con uno de los anticuerpos de la especificidad definida. En esos ejemplos donde no hay una opción deseable y preferentemente se usan los anticuerpos existentes, se pueden usar los siguientes procedimientos para crear regiones variables compatibles de emparejamiento para el conjunto de anticuerpos a producirse como una mezcla Oligoclonics™.

Primero de todo, se puede influir sobre el emparejamiento usando variantes de Fv de cadena simple de los anticuerpos. La provisión de un engarce entre región variable de cadenas pesada y ligera incrementará la probabilidad de que los dos dominios se emparejen el uno con el otro, en vez de emparejarse con moléculas no unidas o con otras moléculas Fv de cadena individual de la misma o de diferente especificidad presentes en la misma célula. Si tales moléculas se condensan a regiones Fc y se coexpresan en la misma célula huésped, el resultado es una mezcla de moléculas scFv-Fc que están emparejadas por medio de la región Fc de la cadena pesada, formando moléculas monovalentes o biespecíficas. Hay también una solución alternativa que no se basa en emparejamiento en el formato scFv. Con un conjunto de anticuerpos dados por el Ejemplo 3, una mezcla de anticuerpos constituida esencialmente por moléculas formateadas de IgG se puede hacer marcando los genes de la región variable compatibles unos con

otros. Primero se determina la secuencia de las cadenas ligeras de anticuerpo y la cadena que es la más común para la secuencia de las otras dos regiones variables de cadena ligera, o la más cercana a su secuencia de aminoácidos de línea germinal identificados. Para los dos anticuerpos que llevan la cadena ligera diferente, se crea una biblioteca de cadenas pesadas que es diversa en las CDR incluyendo la CDR3 que produce una fracción sustancial de las interacciones entre secuencias de regiones variables pesadas y ligeras. Estas cadenas pesadas se combinan con la cadena ligera no mutada, elegida en un formato que proporciona capacidades de expresión y rastreo, o presentación y selección. De tal manera, los dos anticuerpos que quedan están forzados a aceptar la nueva cadena ligera, que podría afectar emparejamiento y afinidad; la provisión de mutaciones en las cadenas pesadas y la selección (bien por separado como fragmentos scFv o Fab, o bien como Fab en competición con su cadena ligera original en un procedimiento descrito anteriormente para selección de competición), se enriquecerá para variantes que hayan corregido una posible deficiencia en eficiencia de emparejado y/o pérdida de afinidad.

f. Anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento de ratones transgénicos

Es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Transferencia del disposición de genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humana en ratones mutantes que llevan una delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpos (JH) y por lo tanto no producen ya anticuerpos murinos, da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígenos. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits y cols., Nature 362: 255-258 (1993). Los anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento pueden identificarse de paneles de anticuerpos hechos en estos animales, o de tales anticuerpos y anticuerpos derivados de otros procedimientos. Se contempla que los anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento pueden identificarse incluso más frecuentemente en ratones transgénicos que llevan solamente el locus de la cadena pesadas o el locus de la cadena ligera y solamente un conjunto individual o limitado de cadenas compañeras elegidas; en ese caso la inmunización conduciría a la generación de anticuerpos que llevan todos una cadena común compatible. Los anticuerpos con regiones variables compatibles se identifican después usando los procedimientos descritos en el presente documento. La eficiencia con la que tales anticuerpos pueden identificarse puede incrementarse adicionalmente reduciendo la extensión de la hipermutación somática de la cadena o cadenas compañeras. Esto puede hacerse por ejemplo retirando las secuencias reguladoras que rodean las regiones variables, o mutando los codones de las regiones variables de tal forma que los genes lleguen a ser un sustrato menos probable para la maquinaria de hipermutación celular, o recogiendo las células B más pronto después de las inmunizaciones.

Otro enfoque adicional es combinar las cadenas pesadas de los tres anticuerpos con un repertorio de cadenas ligeras altamente diversas y rastrear los emparejamientos, si es necesario después de selección en antígeno, para cadenas ligeras que mantienen emparejamiento funcional (y unión a antígeno) y que comparten una secuencia común. Esto se puede llevar a cabo fácilmente usando instalaciones automatizadas para ELISA de alto rendimiento, como se presenta anteriormente.

g. Usos de anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento

Los anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento tienen muchas aplicaciones. Se revela en el presente documento que la preparación de una mezcla de anticuerpos funcionales deseada es factible cuando la composición de las cadenas pesadas o ligeras variables de los diversos anticuerpos se selecciona cuidadosamente para contener regiones variables de anticuerpos que llevan regiones variables compatibles de emparejamiento tales que el emparejamiento de las regiones variables de anticuerpos producen predominantemente sitios de unión funcionales. Después de selección de anticuerpos con regiones variables compatibles como se describe anteriormente, los genes de región variable se pueden clonar en vectores de expresión que dirigirán la expresión de un anticuerpo del formato deseado, IgG, IgA, IgM. En una realización la invención describe la producción de mezclas de anticuerpos por la coexpresión de genes de región variable unidos operativamente a genes de región constante, en los que estos genes de región variable codifican diferentes anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento. Sin la selección de anticuerpos emparejados apropiadamente con región variable de emparejamiento compatible, la co-expresión conduciría a la formación de una mezcla de anticuerpos con muchas combinaciones de cadenas pesadas-ligeras no funcionales. Cuando se ha definido emparejamiento compatible de regiones variables, surgirá un nivel alto de sitios de combinación de anticuerpos funcionales. En una realización la región variable de cadena pesada está unida operativamente al primer dominio de la región constante de cadena pesada, seguido por una región de asa, seguida por los dominios que quedan de la región constante de cadena pesada. La región variable de la cadena ligera por otro lado está unida operativamente a un dominio constante apropiado en la familia kappa o lambda.

En una realización preferida, la región variable compatible de emparejamiento es una cadena ligera idéntica. En ese caso la co-expresión de esta cadena ligera y por ejemplo dos cadenas pesadas diferentes derivadas de anticuerpos con la cadena ligera completa como región variable compatible de emparejamiento, en la misma célula proporcionará una mezcla de las dos moléculas bivalentes esperadas y una molécula biespecífica. De forma similar, cuando se coexpresa esta cadena ligera con más de dos cadenas pesadas derivadas de anticuerpos que tienen todos sitios de unión a antígenos funcionales cuando se emparejan a alguna esa misma cadena ligera, la mezcla contendrá en una

cierta fracción cada una de las moléculas bivalentes y varias moléculas biespecíficas con combinaciones de todos los sitios de unión por ejemplo 3 cuando se introducen 3 cadenas pesadas de anticuerpos, 6 cuando se introducen 4 cadenas pesadas de anticuerpos, 10 cuando se introducen 5 cadenas pesadas de anticuerpos etc. En este caso se espera que la afinidad de los sitios de unión monoméricos en estas diversas especies sea muy similar a la afinidad de los sitios de unión originales. En otra realización, los anticuerpos comparten una región variable compatible de emparejamiento, pero la secuencia de este elemento es diferente entre los dos anticuerpos y tras intercambiar, la afinidad de uno o ambos de los anticuerpos puede estar alterada. Si tales anticuerpos se usan para coexpresión, la mezcla de anticuerpos finales contendrá anticuerpos con la afinidad de unión original y la alterada en todas las especies que se mencionaron anteriormente. En la realización preferida tales anticuerpos muestran una cadena ligera común compatible. En otra realización los anticuerpos comparten una cadena pesada común compatible. Los niveles de expresión de los componentes individuales pueden elegirse o pueden manipularse para alterar la fracción de las especies de anticuerpos que contienen el componente.

2. Mezclas de proteínas con regiones variables emparejadas de forma óptima.

Usando los procedimientos de acuerdo con la invención, se obtienen anticuerpos con un comportamiento de unión adecuado para la preparación de mezclas biofarmacéuticas. Tradicionalmente antes de usar para terapia humana, los fármacos proteicos se expresan y purifican hasta homogeneidad, consistiendo en una especie molecular principal. En algunos casos la terapia es más eficaz con combinaciones o proteínas u otros fármacos. Esta invención describe procedimientos para hacer una mezcla proteinácea que contendrá al menos dos especies moleculares principales, compuestas de al menos tres regiones variables y tales que algunas regiones variables se emparejan para formar un sitio de unión funcional. La elaboración a gran escala de la mezcla proteinácea es un prerrequisito para su uso clínico y un procedimiento de purificación simple es una característica importante del procedimiento de desarrollo. La presencia de regiones variables emparejadas inapropiadamente conducirá inevitablemente a un procedimiento de purificación más complicado. En una realización los genes que codifican los componentes de los dos compuestos proteináceos se coexpresan en la misma célula huésped y las especies moleculares principales diferentes que están presentes en la mezcla y tienen una especificidad de unión funcional específica purificada usando técnicas bioquímicas/biofísicas bien conocidas en la técnica. En una realización se usa el procedimiento para realizar una mezcla de un número definido de anticuerpos. Las especies moleculares principales que comprenden una o más especificidades de unión diferentes podrían compartir una proporción mínima de su información genética codificada (por ejemplo una región Fc, una etiqueta común, u otro dominio o característica compartida), tal característica compartida proporcionará un mecanismo/ensayo común para seguir a los compuestos individuales en la mezcla. En otra realización las especies moleculares principales se copurifican preferentemente debido a un comportamiento biofísico/bioquímico similar, o debido a un dominio compartido que media copurificación (por ejemplo un Fc). En otro enfoque las especies moleculares principales se fusionan a una subunidad de una proteína tal que pueden multimerizarse entre sí (por ejemplo región CH2-CH3). La invención también proporciona mezclas biofarmacéuticas producidas usando este procedimiento. La aplicación preferida es la co-expresión de anticuerpos, con la elección de los genes V y el comportamiento de emparejamiento entre los dominios VH y VL tal que principalmente o solamente funcionalmente se elaboran los sitios de unión funcionales y la purificación de la mezcla puede tener lugar por medio de la característica compartida, una región Fc. Los procedimientos para purificación de inmunoglobulina se conocen bien en la técnica, incluyendo proteína A, proteína G y otras matrices de afinidad. Otras mezclas proteináceas que se podría contemplar que tienen regiones emparejadas son proteínas de fusión entre anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y otras moléculas, anticuerpos de dominio individual derivados de camello, llama o anticuerpos de dominio individual manipulados a partir de genes de región variable murinos o humanos, dominios extracelulares de receptor, péptidos, proteínas equipadas con un sitio de unión manipulado, o citocinas. Preferentemente los compuestos proteináceos comparten una característica (como por fusión adicional a una región Fc de inmunoglobulinas; procedimientos bien conocidos en la técnica), tal que pueden co-purificarse usando los mismos procedimientos. El emparejamiento óptimo de las regiones variables en los diferentes compuestos proteináceos conducirá también a un nivel óptimo de sitios de unión funcionales en estos compuestos, minimizando así el número de etapas de purificación requeridas para obtener el componente activo de la mezcla de proteínas.

3. Seleccionar compuestos proteináceos específicos de antígeno usando mezclas de ADN codificante.

En una realización preferida los compuestos proteináceos son anticuerpos. En la invención los anticuerpos se identifican en colecciones o reservas de anticuerpos genéticamente diversos, en los que el emparejamiento de los genes variables se optimiza de tal manera que tras coexpresión de al menos dos anticuerpos dentro de la misma célula surge un emparejamiento óptimo, proporcionando una cantidad máxima de sitios de unión funcionales. En una realización preferida el emparejamiento de todos los sitios de unión está optimizado debido al uso de un gen de región variable compartida, preferentemente la cadena ligera. La diversidad de los otros elementos en la biblioteca será tal que los anticuerpos con alta afinidad pueden seleccionarse aún. Debido a esta elección de la elaboración genética de las regiones variables, el emparejamiento de las regiones variables de anticuerpos será tal que un nivel muy alto de sitios de unión funcionales estarán presentes cuando regiones variables múltiples que forman más de un sitio de unión de anticuerpos están en contacto unas con otras, por ejemplo cuando se expresan en la misma célula. En una realización primero se elabora una biblioteca o colección de genes de cadena pesada de anticuerpos y se clona dentro de un vector de expresión de células eucariotas. Esta biblioteca se introduce dentro de células huésped de tal manera que cada célula huésped estará elaborando múltiples cadenas pesadas de anticuerpos diferentes. En una realización

preferida, se clonan "elementos anti-represores" (Kwaks y cols., 2003. Nat. Biotechnol 21: 553) en uno o ambos extremos del gen de la cadena pesada de anticuerpos. Tales elementos confieren nivel de expresión estable y alto de un transgén dado como se muestra en esta citación y en esta invención los autores de la presente invención describen su uso para mediar expresión estable y de alto nivel para cada copia individual del transgén (véase también más adelante).

En una realización de esta invención, representada en las Figuras 7-8, la región o las regiones variables con comportamiento de emparejamiento optimizado para las otras regiones variables está o están también genéticamente codificadas en un vector de expresión apropiado, bien antes, bien durante o bien después de la introducción de la otra región variable. El casete de expresión con las regiones variables puede ser también parte de un sistema vírico tal que se pueden lograr niveles altos de eficiencia de transfección/infección. En el caso de que la reserva de primeras regiones variables sean cadenas pesadas de anticuerpos, la segunda región variable con comportamiento emparejado optimizado puede ser una o más cadenas ligeras. Las células huésped que se transfectan con ambos compañeros de emparejamiento, por ejemplo la mezcla de cadenas pesadas de anticuerpos y el conjunto de cadenas ligeras, se expanden y crecen en condiciones que permiten la expresión de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Preferentemente se usa solamente una cadena ligera, como se ejemplifica en la Figura 7. Por ejemplo la expansión puede tener lugar en pocillos de cultivo de tejidos, en una forma tal que los pocillos de cultivo de tejidos contendrán entre 10-1000 clones transfectados originalmente diferentes, expresando cada uno de los clones emparejamientos múltiples de las regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos específicos de antígenos pueden recuperarse entre estos clones y pocillos por diversos procedimientos, preferentemente por ELISA o prueba equivalente de las mezclas de anticuerpos de cada pocillo (véase también descripción anterior de ensayos de unión). Si se usa la transfección estable, con la posibilidad de seleccionar líneas celulares transfectadas para copias integradas de forma estable de los ADN que codifican anticuerpos, el anticuerpo o anticuerpos relevantes se pueden clonar por medio de dilución limitada. Como alternativa, el ADN que codifica los genes variables de anticuerpos relevantes puede recuperarse amplificando y secuenciando los genes de anticuerpos de las células en el pocillo usando los procedimientos conocidos en la técnica. Si se requiere el ADN que codifica cadenas pesadas de anticuerpos puede amplificarse también, reclonarse para expresión en el mismo sistema, el ADN amplificado y después usarse para repetir el experimento de transfección, expresión y rastreo. Con este ciclo de transfección y rastreo, después de una pocas rondas, los anticuerpos reactivos frente a un antígeno empiezan a dominar la población. En cada ronda la complejidad de la mezcla producida por una célula individual puede reducirse reduciendo la complejidad del ADN introducido en la célula, para llegar a ser eventualmente una población oligoclonal. A partir de los pocillos transfectados, el gen de anticuerpos V puede rescatarse directamente (por ejemplo, por medio de PCR) y análisis adicional y/o rastrearse en este sistema, eventualmente en condiciones que proporcionan expresión del anticuerpo monoclonal. Como alternativa las regiones variables a partir de pocillos reactivos se pueden clonar dentro de otros sistemas para rastreo rápido de la especificidad de unión de los pares individuales de las regiones variables, por ejemplo por medio de expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpos o IgG completos, expresión en otros huéspedes, por medio de procedimientos de presentación in vitro, procedimientos de presentación de bacteriófagos, etc.

En otra realización preferida se segregan las cadenas pesadas por la célula huésped dentro del sobrenadante, donde ellas pueden reconstituirse dentro de fragmentos de unión de antígenos funcionales, por la adición de y emparejamiento con una cadena ligera compañera. Esto puede ser una familia pequeña de cadenas relacionadas, pero preferentemente una única cadena solamente. En este enfoque, se usan células que no evitan secreción de la cadena pesada no emparejada. Esta realización se representa en la Figura 8. Se han descrito células S2 de *Drosophila* que contienen un homólogo de BiP (Proteína de Unión), hsc72, que interacciona específicamente con cadenas pesadas de inmunoglobulina, pero no evitan su secreción. Como alternativa, las cadenas pesadas necesitarán llevar mutaciones aminoacídicas de una manera tal que células que normalmente mantienen cadenas pesadas cuando no se emparejan con cadenas ligeras, no mediarán retención más. Por ejemplo se pueden mantener mutaciones o, se pueden seleccionar en, los sitios de reconocimiento principales para sitios BiP que se localizan en el dominio CH1 de la cadena pesada. Por ejemplo el dominio CH1 puede reemplazarse (por ejemplo por una región CL o CH3) en la medida en que la cadena ligera puede emparejarse con esta forma de molécula (u otras variantes, véase también sección en variantes de entrecruzamiento de anticuerpos), o mutarse para evitar la retención por BiP. El resultado de tales variaciones es que las diferentes cadenas pesadas se segregan por la célula huésped. Las cadenas se reconstituyen después con dos o más cadenas compañeras que llevan la(s) región/región variable(s). Se revisan extensamente en la bibliografía procedimientos para establecer esto en el análisis bioquímico y en el ensamblado de moléculas de anticuerpos. Los pares de región variable reactivos de antígenos se pueden identificar de la misma manera como de describe para otra realización.

En aún otro anticuerpo de realización el primer compañero de las dos regiones variables emparejadas (tal como la cadena pesada para una anticuerpo) está unido a una superficie celular eucariótica y la otra región variable está proporcionada por expresión en la misma célula huésped o por medio de la reconstitución en la superficie celular. Este diseño permite un rastreo directo para unión a antígeno en la superficie de la célula huésped, por ejemplo por medio de citometría de flujo con antígeno marcado fluorescentemente, o por medio de una selección directa, por ejemplo por medio de procedimientos de clasificación celular.

Se han descrito procedimientos para identificar anticuerpos reactivos a antígenos a partir de poblaciones de células B y se pueden aplicar a estas sistemas basados en transfección también. En tales sistemas descritos se tomaron

muestras de diversidad combinatoria al azar y el emparejamiento de genes variables de anticuerpos está también no optimizado o influenciado. El uso de tales pares combinatorios al azar de regiones variables no garantiza que tras la producción de una mezcla de anticuerpos, el emparejamiento sea óptimo, por el contrario: las regiones variables emparejadas incorrectamente serán una fracción sustancial de los compuestos proteínicos producidos. En esta invención un elemento importante es que esta diversidad combinatoria está limitada, reduciendo la diversidad de uno de los genes de región variable. La diversidad que está presente en el repertorio emparejado resultante se origina principalmente a partir de una de las regiones variables. Preferentemente es una o un pequeño conjunto de cadenas ligeras. Como una consecuencia, en el procedimiento reiterativo de seleccionar las regiones variables reactivas de antígenos, solamente será necesario identificar uno de los dos compañeros del par. No es necesario recuperar tanto la secuencia de la región variable de cadena ligera como la de cadena pesada de la misma célula. Otra diferencia importante es que se introducen y expresan múltiples genes de anticuerpos a partir de la misma célula huésped. Cuando se usa diversidad al azar una característica tal conduciría a una multiplicación de la diversidad y a una reducción de la cantidad de combinaciones individuales en el grado en que la detección de dejar solo clonación del gen de anticuerpo responsable llegaría a ser muy difícil, si no imposible. Considerar el caso en el que la célula estaría haciendo combinaciones múltiples de pares de cadenas pesadas y ligeras, después la posibilidad de recuperar la combinación correcta del anticuerpo que media reactividad de antígeno, estaría llegando a ser menor según la célula está haciendo un número más alto de cadenas diferentes. Si la célula estaría expresando 10 cadenas pesadas y ligeras diferentes, la diversidad combinatoria generada por esta célula única sería de 100 tipos diferentes de sitios de unión a anticuerpos; solamente 1/10 de los genes variables de anticuerpos amplificados sería el relevante, así la posibilidad de ser capaz de clonar los genes del anticuerpo correcto es muy baja. Como una consecuencia de esta diversidad combinatoria reducida en el presente sistema, habrá también una cantidad más alta de cada uno de los anticuerpos individuales, que hace una posible una detección más sensible. Así en esta invención la expresión de los diferentes anticuerpos en la misma célula huésped es una característica deseada. Primero como se explica anteriormente, es una característica importante para el sistema de selección de antígenos encontrar anticuerpos reactivos frente a antígenos cuando se usan poblaciones celulares transfectadas. En segundo lugar, la invención se dirige a la producción de mezclas de proteínas y más en particular anticuerpos o sus fragmentos, que requieren emparejamiento de las regiones variables, en particular cuando se producen tales mezclas por coexpresión en la misma célula huésped. En el procedimiento preferido descrito anteriormente, la cotransfección de genes de región variable dentro de las mismas células conduce a la expresión de anticuerpos múltiples en la misma célula huésped. Los procedimientos se usan de forma útil para seleccionar pares de regiones variables de anticuerpos individuales que son reactivos con un epítipo diana dado pero también para seleccionar una mezcla de diferentes pares de región variable todos reactivos con un epítipo diana dado (en el procedimiento del rastreo, se seleccionarán o identificarán múltiples pares de región variable de anticuerpos, pero cuando el procedimiento se repite, estos anticuerpos es probable que se mezclen eventualmente y terminen en la misma célula huésped). Adicionalmente si el rastreo o selección de la mezcla se lleva a cabo con dianas con epítopos múltiples, o dianas múltiples, la mezcla puede contener también anticuerpos para múltiples epítopos o dianas, aún con emparejamiento compatible de co-expresión de los genes de expresión variable.

La invención también es adecuada para el rastreo de mezclas de proteínas con regiones variables emparejadas que tienen una especificidad de unión definida (Figura 9). Los genes que codifican estos compuestos se introducen como una mezcla dentro de una célula huésped como anteriormente (en la Figura 9 se dan ejemplos de 10 anticuerpos diferentes) y clones individuales que han integrado algunas o múltiples copias de los genes que codifican las diversas regiones variables expandidas. En el modo descrito anteriormente, aplicado a anticuerpos, los sobrenadantes de las líneas celulares resultantes se rastrean hacia los diversos antígenos. Los niveles de cada uno de los pares de anticuerpos individuales pueden variar y cuando el formato de anticuerpos es el isotipo IgG, también el nivel de los anticuerpos biespecíficos resultantes puede ser altamente variable. Las células que segregan la mezcla que comprende la composición deseada se identifican y usan como un huésped de producción estable para esta mezcla. La invención proporciona un procedimiento para rastrear rápidamente miles de mezclas de anticuerpos diferentes. El emparejamiento optimizado de las regiones variables pesada y ligera asegurará un nivel alto de sitios de unión funcional en los anticuerpos presentes en tales mezclas.

4. Compuestos basados en anticuerpos con regiones variables emparejadas y entrecruzamiento o mutaciones en las regiones constantes.

El emparejamiento de las regiones variables y constantes de un anticuerpo puede manipularse adicionalmente como sigue, por dominios de entrecruzamiento. Se elaboran anticuerpos entrecruzando o intercambiado o reemplazando elementos dentro de la región Fab del anticuerpo (o la región Fd de cadena pesada del anticuerpo y la región de cadena ligera del anticuerpo) y combinando los elementos adecuados para establecer un sitio de unión en el contexto de una molécula de inmunoglobulina (se dan ejemplos en la Figura 10). En su forma más simple, la región Fd de la cadena L y la cadena H se intercambian. Una cadena VL-CL-asa-CH2-CH3 se empareja así con un dominio VH-CH1. En un segundo formato, los genes de región constante entre H y L se intercambian. En otra forma la CH1 se reemplaza por una CL. En otra forma la VH y las VL se intercambian. En otra forma las regiones CDR entre VH y VL se intercambian. La eficiencia de emparejamiento puede someterse a seguimiento en tales variantes de entrecruzamiento, de tal forma que combinaciones adecuadas de anticuerpos no entrecruzados con anticuerpos entrecruzados, o combinaciones de diferentes anticuerpos entrecruzados, se pueden usar para mediar emparejamiento óptimo cuando se elaboran mezclas de al menos dos moléculas de anticuerpos (con anticuerpo

también incluyendo aquí variantes de entrecruzamiento como se describe anteriormente). En otra forma el efecto de emparejamiento erróneo entre diferentes VH y/o VL se reduce uniendo la VH y la VL por medio de un engarce a una variante de Fv de cadena simple, lo que favorecerá la asociación entre estos dos dominios. Como alternativa el emparejamiento entre regiones variables se puede manipular por la introducción en las posiciones apropiadas de

5 cisteínas que tras emparejarse de los dominios variables pesados y ligeros pueden formar un puente disulfuro. La invención también proporciona procedimientos para seleccionar fragmentos de anticuerpos que unirán antígeno en un formato de entrecruzamiento apropiado, seleccionando a partir de bibliotecas apropiadamente formateadas, o rastreando uno o más anticuerpos de unión a antígeno para la actividad en el formato de entrecruzamiento. Los anticuerpos en los que el dominio CH1 no es parte de la cadena pesada se pueden segregar como moléculas libres no

10 emparejadas a cadenas ligeras, permitiendo enfoques alternativos para la producción de anticuerpos y los formatos de fusión nuevos. Los anticuerpos en los que las regiones variables están intercambiadas pueden ser funcionalmente no equivalentes y proporcionan un espectro diverso, no natural o diferente de actividad de unión a antígenos o biológica (el posicionamiento de las regiones de las cadenas ligera y pesada se espera que no sea siempre completamente equivalente). Además de los efectos del intercambio de los genes de las cadenas pesada y ligera en afinidad y/o

15 especificidad, el intercambio puede alterar la flexibilidad del anticuerpo e impactar el comportamiento biológico. Finalmente, un sitio de unión a anticuerpo con regiones quiméricas VH-VL (con regiones CDR o FR intercambiadas entre los dos dominios variables) puede también proporcionar una alternativa, conjunto posiblemente mayor pero estructuralmente no solapante de parátomos de anticuerpos.

En segundo lugar, la manipulación selectiva de las regiones constantes o de la interacción de las regiones variables con regiones constantes puede afectar también el comportamiento de emparejamiento adecuado de los genes de la región variable. Modificando la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, la fracción de anticuerpos

20 biespecíficos funcionales se puede incrementar o disminuir. En este enfoque la cadenas pesadas de anticuerpos se pueden manipular para dirigir la heterodimerización o la homodimerización. Esto puede hacerse introduciendo mutaciones complementarias estéricamente en la interfase de dominio CH3, por ejemplo, como se ha descrito en la bibliografía para incrementar el porcentaje de anticuerpos biespecíficos funcionales en la mezcla de anticuerpos que

25 surgen de la coexpresión de dos cadenas pesadas y ligeras. El emparejamiento de la región variable de sitio de unión de anticuerpos puede así influenciarse por el emparejamiento de las regiones constantes variegadas, de los dominios de regiones constantes pesadas y ligeras.

5. Emparejamiento extracelular de mezclas proteínicas

Esta invención proporciona un procedimiento para elaborar anticuerpos completos usando un procedimiento de emparejamiento *in vitro* de las cadenas pesadas y ligeras producidas en células huésped diferentes. En una

30 realización, una de las dos cadenas de anticuerpos se expresa en una primera célula huésped y la otra cadena se expresa en una segunda célula huésped (Figura 11A). Las cadenas de anticuerpos se llevan juntas después sometidas a condiciones en las que tiene lugar el emparejamiento de los dos dominios, fuera así de la célula. En una

35 realización el emparejamiento tiene lugar *in vitro*, con cadenas purificadas con cadenas purificadas y en condiciones que están optimizadas para el emparejamiento de las regiones variables deseadas. En otra realización la expresión tiene lugar por medio del uso de una o dos cadenas falsas, temporalmente emparejadas a las regiones variables respectivas, eliminando las falsas de sus parejas por medio de un procedimiento suave y controlado y emparejando las

40 regiones variables no emparejadas apropiadamente entre sí para formar un sitio de unión no funcional. En una realización aplicada a los anticuerpos, esta asociación se hace más fácil usando pares de cadenas pesadas-ligeras mutadas en una o en la otra cadena para facilitar el proceso del emparejamiento, por ejemplo mutadas en el residuo de cisteína que forma normalmente el puente las cadenas H y L (bien ambas mutadas, por ejemplo a Ser, o bien

45 solamente una mutada y no la otra), o mutaciones que tienen alterada la afinidad de una cadena por la otra, o, preferentemente mutaciones en la cadena pesada usada para el emparejamiento temporal, en particular el que se empareja con la cadena pesada; así tal cadena ligera falsa se emparejará con una cadena nativa, no mutada y llevará mutaciones de tal forma que se puedan eliminar fácilmente a partir del anticuerpo purificado.

Una extensión de este concepto es que es posible producir anticuerpos usando cadenas de anticuerpos universales (Figura 11B). La invención proporciona un procedimiento para expresar una región variable invariante compartida,

50 dentro del formato de cadena apropiado (por ejemplo una cadena ligera VL-CL) en una célula huésped dada y la otra cadena (por ejemplo una cadena pesada constituida por VH-CH1 o VH-CH1-asa-CH2-CH3) que es dominante en o proporciona la mayoría o toda la especificidad, en otra célula huésped. Para la producción de dos anticuerpos, necesitan elaborarse tres cadenas, que se pueden ensamblar *in vitro* para formar dos anticuerpos diferentes. Por ejemplo si la cadena ligera es idéntica, solamente tendrá que elaborarse un dominio VL-CL y dos cadenas pesadas que contengan VH. Estas también se ensamblarán extracelularmente, preferentemente *in vitro*. El emparejamiento de

55 las regiones variantes habrá sido óptimo de tal forma que la mezcla proteínica proporcione un nivel alto de sitios de unión funcionales. La cadena ligera se puede usar universalmente para todos los anticuerpos que la acomodarán (y los anticuerpos seleccionados de acuerdo con ello si se requiere). La cadena pesada se puede expresar en células de mamífero para proporcionar una glucosilación adecuada; para las cadenas ligeras se puede elegir cualquier célula huésped de expresión adecuada. Cuando se usa esta invención con las variantes de entrecruzamiento descritas en la

60 sección anterior, en la que la cadena luminica está condensada al asa y al Fc y la región variable de cadena pesada se proporciona como la cadena más ligera (como VH-CH1 o VH-CL), una ventaja importante de este diseño es patente: la cadena ligera fusionada al Fc (representada como cadena "constante" en la Figura 11B), con sus características de

glucosilación funcionalmente importantes, se puede elaborar como la cadena universal. La cadena pesada puede llevar las características dominantes para la especificidad y una mezcla de cadenas pesadas que mediarán especificidades de unión diferentes se pueden hacer en una célula huésped diferente que no necesita proporcionar glucosilación. Tal característica hace posible la producción de mezclas en dos etapas: se puede usar una expresión procariótica más barata para hacer mezclas de regiones variables codificando cada una una especificidad de unión única, mientras que la producción más cara de la otra región variable que también requiere análisis más fino, se puede hacer en un huésped eucariota. Todos los anticuerpos que pueden emparejarse con el último gen variable sin afectar su especificidad y afinidad general, se pueden producir por emparejamiento extracelular con la misma cadena universal. La última se puede diseñar para optimizarse para aplicaciones farmacéuticas; una región variable ampliamente expresada, relativamente común, con un número mínimo de epítomos de clase II de MHC, de origen humano y de línea germinal en secuencia. Este procedimiento de mezclado puede hacerse con cadenas pesadas separadas o con una mezcla de las diferentes cadenas pesadas; cuando se aplican al formato IgG como se representa en la Figura 11B, el resultado es una mezcla de anticuerpos con o sin biespecíficos, respectivamente. El mezclado y el emparejamiento manual de estos genes de regiones variables proporcionará adicionalmente mucho más control sobre el emparejamiento, ello puede hacerse de una manera por etapas, por anticuerpo, por grupo de anticuerpos etc. Para algunas aplicaciones, por ejemplo ejemplo donde hay una necesidad absoluta de evitar la formación de anticuerpos biespecíficos en una mezcla compleja con tres o más anticuerpos, este procedimiento tiene una ventaja sobre el enfoque basado en la línea celular.

6. Controlar la expresión de regiones variables en el contexto de la producción de regiones variables en la misma célula huésped

La región variable codificante de ácidos nucleicos, por ejemplo de anticuerpos, puede coexpresarse en la misma célula para hacer mezclas de diferentes sitios de unión funcionales. Con comportamiento de emparejamiento apropiado, estará presente un nivel alto de sitios de unión funcionales. También será importante sin embargo controlar la expresión de las regiones variables individuales y sus proporciones de expresión, debido a que esto efectuará la composición de la mezcla de anticuerpos final. El nivel de expresión y la estabilidad de la expresión es una función del sitio de integración del transgén; si el transgén se integra cerca del o dentro de la cromatina inaccesible, es probable que la expresión se silencie. En esta invención describimos el uso para la producción de mezclas de anticuerpos en la misma célula, o elementos que, cuando flanquean los genes de anticuerpos, incrementarán la predictibilidad del nivel de expresión, el rendimiento e incrementarán la estabilidad. Tales elementos pueden por ejemplo hacer esto contrarrestando represión de genes asociados a cromatina. Tales elementos anti-represores proporcionan un nivel alto de predictibilidad de expresión, niveles altos de expresión y expresión estable a lo largo del tiempo, de la mezcla de anticuerpos (Kwaks y cols., 2003).

Nat. Biotechnol 21: 553). Tales elementos confieren nivel de expresión estable y alto de un transgén dado como se muestra en esta citación y en esta invención los autores de la presente invención describen su uso para mediar expresión estable y de alto nivel para cada copia individual de una mezcla de transgenes, que codifican regiones variables múltiples. Una variedad de tales elementos y otros sistemas para lograr un resultado similar se han identificado en la técnica, incluyendo regiones de control de locus (LCR), elementos de apertura de cromatina, cromosomas artificiales (por ejemplo tecnología ACE a partir de Chromos Molecular Systems Ltd) y elementos de apertura de cromatina ubicuos. Por ejemplo, LCR son elementos reguladores transcripcionales que poseen una remodelación de cromatina dominante y capacidad de activación transcripcional que confiere niveles fisiológicos totales de expresión en un gen unido en cis, cuando se integra en el genoma de la célula huésped. En la siguiente sección la invención se describe para "elementos antirrepresores" pero otros elementos de control, diferentes tales como los mencionados y en la medida en que proporcionan la oportunidad para regular la expresión de alto nivel de múltiples genes, pueden ser igualmente adecuados para lograr una expresión controlada de las diferentes regiones variables.

En una realización de la presente invención, las mezclas de anticuerpos se hacen de regiones de pares variables en las que una domina la unión y la es una región variable compartida. En una realización preferida una es la cadena pesada, la segunda la cadena ligera. En la realización preferida la menos una de las cadenas pesadas de los anticuerpos está flanqueada por un elemento antirrepresor, o por dos elementos antirrepresores idénticos o dos elementos antirrepresores diferentes localizados en cada extremo del gen de la cadena pesada; en otra realización más de uno o posiblemente todos los genes de cadena pesada que necesitan expresarse están flanqueados por elementos antirrepresores. En una realización las cadenas pesadas se basan en el mismo plásmido, en otra están en plásmidos separados. En otra realización se usan como huéspedes células CHO; en otra realización se usan células PER.C6.

La elaboración de mezclas de anticuerpos expresados en la misma línea celular requerirá emparejamiento de región variable apropiada y también un nivel de expresión estable de todas las cadenas de anticuerpos implicadas, así como una proporción estable de las diversas cadenas, de una manera que la mezcla de anticuerpos resultante después de elaboración incluso en condiciones de GMP, tiene una composición estable. Tales composiciones estables pueden trasladarse en actividad biológica estable y perfil de toxicidad estable. Si la expresión de solamente una cadena de anticuerpos cambiara, ello podría afectar la composición y por lo tanto también podría alterar su actividad biológica. La provisión de elementos que proporciona un nivel de expresión más predecible y asociado a número de copias es

también importante para construir líneas celulares que expresen niveles similares o o incluso niveles equimolares de diferentes anticuerpos. Si por ejemplo cinco cadenas de anticuerpos han de expresarse, es muy difícil construir una línea celular que exprese todas estas cadenas en cantidades similares cuando usan una aproximación de integración y selección al azar sin los elementos anti-represores. Usando tales elementos, se puede introducir un número de copias más alto de cadenas de anticuerpos sin comprometer la estabilidad de la línea celular resultante. Así se pueden introducir múltiples cadenas pesadas de anticuerpos, donde el número de copias integradas para cada cadena pesada reflejará también a cierto nivel su nivel de expresión absoluta. Con tales elementos será mucho más fácil y más rápido alterar las proporciones de los niveles de expresión entre las cadenas pesadas, por ejemplo manipulando la proporción de los ADN que codifican las cadenas pesadas en el momento de la transfección.

Esto también explica la incorporación preferida de tales elementos antirrepresores en vectores a usarse para crear bibliotecas de anticuerpos y para seleccionar anticuerpos reactivos de antígenos a partir de estas reservas (véase sección 4); elementos antirrepresores preferentemente insertados en los vectores de expresión que incorporan la cadena pesada, en Figuras 7, 8 y 9.

7. Sistemas de expresión para múltiples regiones variables en el contexto de la producción de regiones múltiples en la misma célula huésped

Cuando se expresan regiones variables múltiples dentro de la misma célula, la productividad máxima se logrará solamente si los compañeros que necesitan emparejarse se coexpresan a un nivel equivalente, de tal manera que hay poca posibilidad de lo que es esencialmente desecho: la región variable no emparejada. La composición de la mezcla está influenciada manipulando uno cualquiera de los parámetros que afectan el nivel de expresión logrado en la célula huésped. El nivel de expresión de un componente dado es una función de muchos factores incluyendo las secuencias reguladoras que dirigen la expresión del componente, cuando el componente es una cadena pesada también los niveles de expresión de las cadenas ligeras, la elección de la célula huésped, el procedimiento de expresión (transitorio y estable) y para expresión estable, el número de copias y el sitio de integración. Los niveles de expresión pueden verse afectados adicionalmente por muchos parámetros incluyendo elección de los elementos reguladores transcripcionales (incluyendo elección de promotor, potenciador, aisladores, antirrepresores etc.). La expresión de las dos cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos que se ensamblan a partir de la mezcla de las cadenas puede hacerse independientemente para cada una de las cadenas, o hacerse dependientes entre sí.

El vector o los vectores de expresión que comprenden los genes de anticuerpos de interés contienen secuencias reguladoras, incluyendo por ejemplo un promotor, unido operativamente al/a los ácido(s) nucleico(s) de interés. Se conocen grandes cantidades de vectores y promotores adecuados por aquellos expertos en la técnica y están comercialmente disponibles para generar las construcciones recombinantes de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión apropiados para usar con huéspedes procariotas y eucariotas se describen por Sambrook y cols., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Elsevier, Nueva York, 1989), la revelación de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 y pRIT5 (Pharmacia). Eucarióticos: pWLneo, pSV2cat, pOG44,

PXTI, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia). Las regiones promotoras se pueden seleccionar de cualquier gen deseado usando vectores de CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos particulares incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P y trc. Los promotores eucariotas incluyen CMV inmediatamente antes, HSV timidina cinasa, factor de elongación 1a, SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus, metalotioneína-I de ratón y diversos promotores específicos de tejidos conocidos en la técnica. Pueden usarse procedimientos bien conocidos para aquellos expertos en la técnica para construir vectores que contienen un polinucleótido de la invención y señales de control transcripcionales/traduccionales apropiadas.

Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor adecuado y además cualesquiera sitios de unión a ribosomas necesarios, sitio de poliadenilación, donadores de ajustamiento y sitios aceptores, secuencias de terminación transcripcionales y secuencias flanqueantes 5' no transcritas. Las secuencias de expresión reguladoras pueden comprender promotores, potenciadores, regiones de unión a armazón, elementos reguladores negativos, sitios de iniciación transcripcional, sitios de unión a proteínas reguladoras o combinaciones de dichas secuencias. Como alternativa, las secuencias que afectan la estructura o la estabilidad del ARN o proteína producido se puede reemplazar, retirar, añadir, o modificar de otra forma dirigiendo, incluyendo señales de poliadenilación, elementos de estabilidad del ARN, sitios de ajustamiento, secuencias líderes para potenciar o modificar propiedades de transporte y secreción de la proteína, u otras secuencias que alteran o mejoran la función o estabilidad de las moléculas proteicas de ARN. Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de inmunoglobulina diversificado, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.ºs: 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables

preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped *dhfr*⁻ con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

En un sistema a modo de ejemplo para expresión recombinante de un anticuerpo modificado, de la invención, se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican al menos una cadena pesada o ligera de anticuerpos dentro de células *dhfr*⁻ CHO por transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, el gen de cadena pesada o ligera de anticuerpo está operativamente unido a elementos reguladores de potenciador/promotor (por ejemplo, derivado de SV40, CMV, adenovirus y similares, tal como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de pAdMLP) para dirigir niveles altos de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen de DHFR, que permite selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación de metotrexato. Las células huésped transformantes se cultivan para permitir expresión de las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos. En muchos casos el vector de expresión puede contener tanto genes de cadena pesada como genes de cadena ligera y la cotransfección conducirá a la producción de anticuerpos intacto, recuperado a partir del medio de cultivo. Las técnicas de biología molecular estándar se usan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, se pueden aislar algunos anticuerpos por cromatografía de afinidad con una proteína A o proteína G.

El huésped de la presente invención puede ser también una levadura u otros hongos. En levadura, se puede usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Para una revisión véase, Current Protocols in Molecular Biology, volumen 2, Ed. Ausubel y cols., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, capítulo 13 (1988); Grant y cols., Expression and Secretion Vectors for Yeast, en Methods in Enzymology, Ed. Wu & Grossman, Acad. Press, N.Y. 153: 516-544 (1987); Glover, DNA Cloning, volumen II, IRL Press, Wash., D.C., capítulo 3 (1986); Bitter, Heterologous Gene Expression in Yeast, en Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y. 152: 673-684 (1987); y The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Eds. Strathern y cols., Cold Spring Harbor Press, volúmenes I y 11 (1982). El huésped de la presente invención puede ser también un organismo procariota, tal como *E.coli*. Como un ejemplo representativo pero no limitante, vectores de expresión útiles para bacterias pueden comprender un marcador seleccionable y origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos comercialmente disponibles que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega, Madison, WI, EE.UU.).

La introducción de la construcción recombinante dentro de la célula huésped se puede llevar a cabo, por ejemplo, por transfección de fosfato de calcio, DEAE, transfección mediada por dextrano, o electroporación (Davis, L. y cols., Basic Methods in Molecular Biology (1986)).

El ADN que codifica los anticuerpos de la invención se aísla y se secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales para clonación, preparación de ADN y secuenciación como se describe por Sambrook y cols., en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Elsevier, Nueva York, 1989), la revelación de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Para secuenciación se pueden usar sondas oligonucleotídicas que son capaces de unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos o a las secuencias de vectores que rodean los fragmentos génicos y las secuencia de ADN determinada por secuenciación basada en dideoxi (Sanger, F. y cols. (1977) PNAS 74: 5463-5467). Una vez aisladas, el ADN que codifica regiones apropiadas de los anticuerpos puede estar situado en vectores de expresión, codificando regiones apropiadas del anticuerpos puede situarse en vectores de expresión, que se transfectan en células huésped. La célula huésped puede ser una célula huésped eucariota superior, tal como una célula de mamífero, una célula huésped eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana.

En una realización preferida, los anticuerpos con regiones variables compatibles de emparejamiento se producen en células de mamífero. Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos de clones o los fragmentos de unión a antígenos de los mismos incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO *dhfr*⁻ descritas en Urlaub, G. y cols. (1980) PNAS 77: 4216-4220), usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en (Kaufman, R.J. y cols. (1982) J Mol Biol 159: 601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, C127, 3T3, CHO, células epidérmicas humanas A431, Jurkat, U937, HL-60, células L de ratón, células de riñón de hámster bebé, células COS o células CV-1, células PER.C6 (Pau, M.G. y cols. (2001) Vaccine 19: 2716-2721), otras líneas celulares de primates transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios y una célula de un animal transgénico, por ejemplo un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial de mamífero. Otros tipos celulares adecuados para expresión, en particular para expresión transitoria, son células COS de simio (Gluzman, Y. (1981) Cell 23: 175-182) y células de riñón embrionarias humanas de linajes 293, 295T y 911 (Hek293, 295T, 911).

Como alternativa, puede ser posible producir el anticuerpo como fragmento o como anticuerpo completo en eucariotas inferiores tales como levadura o en procariotas tales como bacterias (Simmons, L.C. y cols. (2002) J. Immunol. Methods 263: 133-147). Las cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*,

Schizosaccharomyces pombe, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas. Si se elabora el anticuerpo completo en levadura o bacterias como IgG, puede ser necesario modificar la proteína producida en él, por ejemplo por fosforilación o glucosilación de los sitios apropiados, con el fin de obtener la proteína funcional. Tales uniones covalentes pueden llevarse a cabo usando procedimientos químicos o enzimáticos conocidos. Los polipéptidos y las proteínas recombinantes producidos en cultivos bacterianos están aislados usualmente por extracción inicial a partir de sedimentos celulares, seguidos por uno o más de desalado, intercambio iónico acuoso o etapas cromatográficas de exclusión por tamaño. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de plantilla también codifica una etiqueta polipeptídica, por ejemplo penta- o hexa-histidina. Los polipéptidos recombinantes codificados por una biblioteca de hebras de diversidad pueden purificarse después usando cromatografía de afinidad. Las células microbianas empleadas en expresión de proteínas pueden romperse por cualquier procedimiento conveniente, incluyendo ciclo de congelación-fusión, sonicación, disrupción mecánica, o uso de agentes de lisado celular.

Los autores de la presente invención describen un procedimiento para referirse directamente a la expresión de las dos regiones variables compañeras que se requieren para emparejar de tal manera que haya residuo mínimo (Figura 12). El ácido nucleico que codifica la primera región variable se clona dentro de un casete de expresión, de tal forma que estará sometido al control de un promotor dado (normalmente el promotor de CMV fuerte u otro) y tal que su secuencia codificante está seguida por un Sitio de Entrada Ribosómico Interno (IRES) y la secuencia codificante del transactivador del elemento de respuesta a tetraciclina (TRE) condensado al dominio de activación de la proteína V16 del herpes simplex (tTa). El ácido nucleico que codifica la segunda región variable se clona dentro de un casete de expresión de tal forma que la expresión se regula por medio de un promotor inducible, por ejemplo el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE), existiendo 7 copias del operador de tetraciclina procariota condensado a un promotor de CMV mínimo. Cuando se introducen ambos casetes de expresión dentro de la misma célula (en vectores diferentes o en los mismos vectores, al mismo tiempo o uno antes del otro), existirá la siguiente relación entre la expresión de las dos regiones variables: expresión de la primera región variable, que está sometida al control de por ejemplo un promotor constitutivo, conducirá a la expresión de la proteína tTa. Esta proteína activa el promotor basado en TRE que dirigirá la expresión de la segunda región variable. Así la producción de la segunda región variable es ahora dependiente de la producción de la primera región variable. Si estas regiones se requieren para emparejar, la producción de los componentes individuales del emparejamiento puede hacerse dependiente.

Cuando los anticuerpos del tipo IgG se producen por medio de una cadena pesada y ligera, la producción de la cadena ligera puede hacerse dependiente de la producción de la cadena pesada. Considerar la realización preferida, la producción en la misma célula huésped de una mezcla de anticuerpos que comparten todos una cadena ligera compatible de emparejamiento. El gen de la cadena ligera se clona sometido a control del elemento TRA, mientras que las cadenas pesadas se proporcionan todas con el IRES y el gen tTa, como se describe anteriormente. En la célula huésped, cada cadena pesada individual que se expresa activará la producción de más cadena ligera compañera. Esto es importante, debido a que con múltiples cadenas pesadas expresándose, es probable que el nivel de la cadena ligera pueda llegar a ser limitante y que el exceso de cadena pesada no emparejada inducirá posiblemente toxicidad en la célula huésped (como se ha descrito para células B). Este concepto es también aplicable a la realización descrita en la sección 4, para la selección de anticuerpos reactivos a antígenos para reservas elaboradas en células eucariotas. Se ha descrito otros sistemas de promotor-transactivador y son también aplicables en este concepto. En el mismo campo de aplicación, en aquellos casos donde las proporciones de dos cadenas pesadas particulares necesitan controlarse o fijarse, este procedimiento de expresión dependiente se puede usar para unir la expresión de dos cadenas pesadas.

Generalmente se conoce un gran número de vectores y promotores adecuados por aquellos expertos en la técnica y están comercialmente disponibles para generar las construcciones recombinantes de la presente invención. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo para la expresión en células eucariotas de dos o tres anticuerpos que comparten una secuencia de cadenas ligeras. Los genes que codifican cadenas de anticuerpos se clonan dentro de casetes de expresión que proporcionan todas las señales reguladoras y de secreción que se usan normalmente para expresión de anticuerpos, como se representa en la Figura 20. En una primera realización, la expresión de múltiples cadenas pesadas de anticuerpos se hace dependiente una con respecto a las otras en la siguiente manera. En la primera realización, el ácido nucleico que codifica la primera cadena pesada (H1) se clona dentro de un casete de expresión, de tal manera que estará sometido al control de un promotor dado (normalmente el promotor de CMV fuerte u otro) y de tal manera que su secuencia codificante está seguida por un Sitio de Entrada Ribosómico Interno (IRES). Esto está seguido inmediatamente por una segunda región codificante de cadena pesada de anticuerpo (H2, como se describe en la Figura 21). El promotor P1 dirigirá la expresión de H1 y H2, conduciendo a una proporción de expresión 1:1 aproximada entre estas dos proteínas; a menudo aunque la segunda región codificante está ligeramente menos bien expresada. Así si la proporción de expresión se ha dirigido hacia un intervalo predefinido, el uso de las secuencias IRES es particularmente útil. Este intervalo predefinido está influido entre otros factores por la naturaleza de la secuencia IRES y las secuencias IRES diferentes mediarán proporciones finales diferentes. De forma similar la proporción de expresión entre tres cadenas pesadas de anticuerpos puede ligarse entre sí usando un casete de expresión tricistronica, en el que el casete previamente descrito está seguido por otro IRES y región codificante de cadena pesada. Se describen ejemplos de sistemas de expresión tricistronica y de secuencias de IRES de configuraciones para otros sistemas en la bibliografía (Li y cols., J. Virol. Methods 115: 137-44; When y cols.,

Cancer Gene Therapy 8: 361-70; Burger y cols. 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 345-53). En estas realizaciones la cadena ligera de anticuerpos compartida puede proporcionarse en un plásmido de expresión aparte, en uno o más de los vectores que continúan o multiplican las cadenas pesadas de anticuerpos, o que pueden expresarse ya por la célula huésped usada para la transfección con el vector o los vectores de expresión de cadena pesada.

En otra realización, los genes de las cadenas pesadas de anticuerpos están transfectados secuencialmente dentro de la célula huésped. Primero los autores de la presente invención consideran la realización para bibliotecas de células que producen mezclas de 2 anticuerpos. Las células se transfectan con los dos genes de anticuerpos clonados en vectores diferentes pero la transfección se hace secuencialmente en el tiempo. Por ejemplo las regiones codificantes de cadenas pesadas y ligeras del primer anticuerpo se introducen dentro de la célula huésped y los transfectantes estables que expresan este anticuerpo se identifican y se aíslan. Los genes de anticuerpos que codifican un segundo anticuerpo, en los que las regiones de anticuerpos variables son de emparejamiento compatible, se transfectan dentro de la célula huésped que ya expresa los primeros genes de anticuerpos a nivel alto. Este procedimiento de llevado a cabo de transfecciones secuenciales (y si es apropiado selecciones de integración entre ellas) es también adecuado para elaborar colecciones de mezclas con hasta 4-5 anticuerpos diferentes. Para incrementar el número de clones celulares que expresan anticuerpos múltiples, los vectores que llevan los genes que codifican los genes de anticuerpos, llevan también un marcador de superficie único, de tal forma que las células transfectadas que tienen integrada la secuencia del vector puedan seleccionarse fácilmente y pueden identificarse los clones que expresan anticuerpos. Como una realización alternativa para elaborar células que expresan anticuerpos múltiples con emparejamiento compatible, se usa el siguiente procedimiento. Primero, como anteriormente, se produce clon celular que expresa un conjunto de cadenas de anticuerpos (esto puede ser una H y una L o múltiples H y una L, por ejemplo) y se selecciona sobre la base de un primer marcador de selección. En paralelo, se produce un clon celular que expresa otro subgrupo de cadenas de anticuerpos (por ejemplo una o más H y una L) y que se selecciona sobre la base de un marcador de selección diferente (por ejemplo neo, gpt, zeo, bdl, etc.). Estos clones celulares se fusionan y se seleccionan después para la presencia de ambos de los marcadores selectivos. Se describen extensivamente procedimientos para la fusión celular en la bibliografía y se conocen por aquellos que trabajan en el campo; son similares a aquellos descritos en Norderhaug y cols., 2002 (Eur. J. Biochem 269: 3205-10). Las células híbridas tienen el potencial de expresar todas las cadenas de anticuerpos. De forma similar, este procedimiento se puede repetir si han de elaborarse colecciones de grandes números de cadenas de anticuerpos. Adicionalmente, el uso de poblaciones celulares más que de clones celulares, en este enfoque de transfección celular o de fusión celular, proporciona un procedimiento para lograr grandes colecciones de célula que expresan las cadenas de anticuerpo a diferentes proporciones.

En una realización la región codificante o las regiones codificantes de las moléculas proteínicas están flanqueadas por secuencias que median la integración dirigida de sitio dentro del genoma de la célula huésped (como se representa en la Figura 20). Sin estas, la integración de transgenes tiene lugar al azar y a menudo se integran varias copias del transgén al mismo tiempo, algunas veces en la forma de un tándem cabeza-cola, con el sitio de integración y el número de copias integrado variando de una célula transfectada a otra. El uso de los sitios de recombinación como se representan en la Figura 20 permite que se tome como diana el sitio preciso de integración por recombinación homóloga entre vector y genoma de célula huésped. Esto proporciona un medio para insertar la región codificante dentro de un sitio de actividad transcripcional alta, con la opción de proporcionar un promotor en el transgén o usar el que está presente en el sitio de integración. Con inserción mediada por recombinación al azar u homóloga de los ácidos nucleicos que codifican la cadena de anticuerpos se quiere decir cualquier inserción en el genoma de la célula huésped, o dentro de los ácidos nucleicos en un orgánulo subcelular, o dentro de un cromosoma artificial.

Las realizaciones preferidas son para emplear por vector de expresión usado en la construcción de biblioteca no más de 3 cadenas pesadas de anticuerpos y preferentemente 2 por vector. Preferentemente los plásmidos no contienen más de 3 promotores y 3 secuencias de IRES y no más de 6 elementos STAR o MAR. Se prefiere limitar el tamaño del vector de expresión a 20 kb y si se requieren en la mezcla más de 5 sitios de unión y estos no pueden codificarse de forma funcional en un plásmido que sea de menos de 20 kb en tamaño, usar dos o más plásmidos diferentes.

Se pueden posicionar MAR y STAR en cada lado de la secuencia de ADN a transcribirse. Por ejemplo, los elementos pueden situarse aproximadamente 200 pares de bases a aproximadamente 1 kb, 5' a partir del promotor y al menos aproximadamente 1 kb a aproximadamente 5 kb a partir del promotor, en el extremo 3' del gen de interés. Además, se puede situar más de un elemento 5' a partir del promotor o en el extremo 3' del transgén. Por ejemplo, se pueden situar dos o más elementos 5' a partir del promotor. El elemento o elementos en el extremo 3' del transgén puede situarse en el extremo 3' del gen de interés, o en el extremo 3' de una secuencia reguladora 3', por ejemplo, una región reguladora 3' no traducida (UTR) o una secuencia 3' flanqueante. Los elementos de apertura de cromatina pueden estar flanqueados en ambos extremos del casete de expresión (Fig. 21D), o pueden situarse 5' del casete de expresión (Fig. 21C).

En particular cuando elementos reguladores múltiples tales como STAR y UCO se han introducido dentro de uno y de los mismos plásmidos, se usan preferentemente elementos que tienen actividad hacia ambos extremos del elemento de tal forma que puedan proporcionarse en mitad de un casete de expresión. Dado que se ha comunicado que los MAR funcionan cuando se cotransfectan en *trans* con el transgén (Zahn-Zabel y cols. (2001) J. Biotechnology 87: 29-42), tienen la ventaja de que no se requiere ninguna etapa de clonación de ADN para unirlos físicamente a

casete(s) de expresión SPCBP. En ese caso el tamaño del elemento MAR o del vector de expresión que lleva los casetes SPCBP no es más una limitación. No obstante, se han descrito elementos MAR tan pequeños como 1,3 kb, así son factibles inclusiones en cis múltiples. También se ha comunicado que MAR se añaden tanto en cis como en trans y en esta configuración incrementan niveles de expresión de anticuerpos en células CHO 14 veces. En otra función de estos elementos además su efecto sobre estabilidad es que ellos incrementan el número de células transformadas independientemente que expresan la proteína y promueven cantidades más altas de la proteína recombinante. El aislamiento de clones y los niveles de producción son generalmente más altos, así en una realización preferida esta invención se pone en práctica usando estos elementos para elaborar grandes colecciones de líneas celulares que producen composiciones que comprenden sitios de unión funcionales múltiples.

8. Mezclas proteináceas con regiones efectoras múltiples y tipos múltiples de sitios de unión

La invención se puede usar para crear composiciones de moléculas proteináceas que tienen regiones efectoras múltiples. En el caso de anticuerpos, están incluidas composiciones que presentan una o más regiones de unión a antígenos en combinación con dos o más regiones efectoras naturales. Son ejemplos las regiones efectoras codificadas por IgG 1 e IgG4, que tienen por ejemplo regiones de unión diferentes para C1q y los diversos receptores Fc basados en sus regiones constantes codificantes. Tales mezclas pueden ser clínicamente más efectivas que sus compuestos monoefectores: la mezcla combina efectores naturales múltiples y máximos, que por diversas razones no están nunca presentes en el isotipo de anticuerpos naturales y la mezcla imita así mucho más estrechamente la pleiotropía natural de los efectores inmunes que evoca un antígeno/patógeno individual cuando nuestro sistema inmune lo encuentra. Algunos formatos son IgG1 e IgG4, o IgG e IgM, o IgG 1 y Fab, o IgG e IgA, o IgA e IgM, o condensación de IgG1-citocina y parecidos. En lugar de elaborar tales proteínas en diferentes huéspedes, la coexpresión de tales formatos de anticuerpos diferentes, todos asociados con el mismo sitio de unión (o posiblemente con sitios de unión múltiples pero relacionados con una diana y preferentemente con una enfermedad o indicación), permite la producción directa de cócteles de anticuerpos con efectores diferentes. Tales mezclas son más eficaces en su actividad biológica.

Además de anticuerpos, las técnicas de manipulación de proteínas recientes han permitido la producción de sitios de unión con especificidad predeterminada usando estructuras similares pero también varias veces usando estructuras muy diferentes. Por ejemplo se han creado ligandos específicos de antígenos usando procedimientos de fagos, bacterianos, ribosómicos o de levaduras, a partir de bibliotecas de variantes de proteínas, en las que las proteínas en algunas posiciones se variegaron usando mutagénesis al azar o basada en oligonucleótidos, pero se mantuvo el armazón principal de la proteína nativa en las variantes. Las proteínas para las que ya se ha aplicado incluyen el dominio de proteína Z de la proteína A, diversos dominios de Kunitz, lipocalinas, proteína fluorescente verde, uno de los dominios de fibronectina, otros dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas y ankyrinas. Tales mimetizadores de anticuerpos son así moléculas proteináceas con una actividad de unión no natural, obtenidas por ejemplo manipulando dentro de la molécula uno o más residuos o regiones con secuencias variegadas, bien en posiciones definidas o bien en posiciones al azar e identificando la molécula con propiedades de unión a antígeno por procedimientos de rastreo o selección. Ejemplos de los procedimientos son rastreo de alto rendimiento para unión a antígenos por ELISA, o procedimientos de selección descritos en la bibliografía tales como procedimientos de presentación *in vitro* tales como presentación ribosómica y presentación de puromicina, procedimientos de presentación celulares o víricos tales como fago filamentoso, fago lambda, bacterianos, de levaduras o presentación de células eucariotas. Las moléculas proteináceas resultantes con el sitio de unión nuevo son un mimetizador de anticuerpo en el sentido de que contendrá una región de unión para antígenos en la posición donde estaba inicialmente una región variable, similar a una molécula de anticuerpo con dos regiones variables.

9. Elaborar composiciones de compuestos proteináceos múltiples con diferentes especificidades de unión.

La tecnología del ADN recombinante proporciona procedimientos bien conocidos en la técnica para clonar los genes de regiones variables y para producir líneas celulares que expresen la forma recombinante del anticuerpo. En particular las propiedades de anticuerpos se están aprovechando con el fin de diseñar agentes que se unen a moléculas diana humanas, denominadas, "autoantígenos" y a antígenos de enfermedades víricas o bacterianas. Por ejemplo, varios anticuerpos monoespecíficos se han aprobado como productos terapéuticos humanos. Estos incluyen Orthoclone OKT3, que tiene como diana antígeno CD3; ReoPro, que tiene como diana glucoproteína IIb/IIIa; Rituxán, que tiene como diana CD20; Zenapax y Simulect, que tienen como diana receptores de interleucina-2; Herceptina, que tiene como diana el receptor HER2; Remicade y Humira, que tienen como diana el factor de necrosis tumoral; Synagis, que tiene como diana la proteína F de virus sincitial respiratorio; Mylotarg, que tiene como diana CD33; y Campath, que tiene como diana CD52.

Para muchas aplicaciones clínicas la eficacia del tratamiento se incrementaría si se usan combinaciones de anticuerpos monoclonales. Una preparación oligoclonal se puede hacer mezclando anticuerpos recombinantes individuales que se han elaborado cada uno por procedimientos convencionales, que incluyen la expresión y la purificación del recombinante individual o de los anticuerpos monoclonales derivados de hibridomas y la mezcla subsiguiente de estas moléculas. El desarrollo farmacéutico de anticuerpos producidos por separado y después anticuerpos monoclonales mezclados es inhibidoramente caro. Los anticuerpos monoclonales recombinantes del isotipo IgG se hacen comúnmente por co-expresión de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la cadena

ligera y pesada del anticuerpo en la misma célula huésped, proporcionando un anticuerpo monoclonal, que lleva dos sitios de unión idénticos. La producción de varios anticuerpos a partir de líneas celulares individuales elaborando cada una un anticuerpo (y en las que cada línea celular se controla para estabilidad o expresión y consistencia), no es económica con los procedimientos de producción biotecnológicos actuales.

Un enfoque para combinar monoclonales es combinar los sitios de unión de la molécula, creando así un anticuerpo multiespecífico. Esto permite el marcado como diana de muchos epítopos en el mismo antígeno, o de múltiples antígenos en la misma entidad diana (por ejemplo una célula, un virus, una bacteria, un antígeno), o de epítopos en diferentes entidades, proporcionando un puente entre estas entidades. De los anticuerpos multiespecíficos, los más investigados han sido los anticuerpos biespecíficos, para marcar como diana entidades terapéuticas o diagnósticas a células tumorales, por ejemplo una célula T citotóxica, una célula NK un quelante que lleva un radionúclido. Pero en el anticuerpo específico los dos sitios de unión están acoplados covalentemente el uno al otro, lo que limita la flexibilidad y el uso de tales compuestos. Adicionalmente, muchos de los anticuerpos biespecíficos recombinantes (por ejemplo fusiones Fab-scFv, diacuerpos, Fv de cadena simple) carecen de la provisión de la región Fc de anticuerpos. Dado que los mecanismos efectores dependientes de Fc tales como ADCC son importantes para la eficacia de muchos anticuerpos (por ejemplo Rituxán y Herceptina), será importante mantener esta región en la molécula multiespecífica.

El enfoque alternativa es usar anticuerpos monoclonales que comprenden la respuesta inmune completa de un huésped a un inmunógeno. Los anticuerpos policlonales derivados del suero de reserva de animales inmunizados o de humanos seleccionados se han usado terapéuticamente por ejemplo para inmunización pasiva o activa, por ejemplo policlonales anti-factor rhesus D, anti-digoxina, anti-rabia, anti-veneno de serpiente y en algunos casos trabajan más efectivamente que un monoclonal comparable, por ejemplo anticuerpo monoclonal de conejo de Sangstat frente a timocitos contra Simulect™. Los inconvenientes para el uso de anticuerpos monoclonales son el riesgo de agentes infecciosos (virus, priones, bacterias) en estas preparaciones a menudo almacenadas, pero también la variabilidad en eficacia, la disponibilidad limitada, la respuesta inmune dirigida a la preparación si el anticuerpo policlonal es no humano y la abundancia de anticuerpos no relevantes en estas preparaciones. Se han hecho ya policlonales usando procedimientos recombinantes, pero de nuevo, la producción de grandes ensayos de anticuerpos a partir de líneas celulares individuales elaborando cada una un anticuerpo no es económica con los procedimientos de producción biotecnológicos actuales. La producción de la mezcla de anticuerpos policlonales cultivando las líneas celulares en lote sería más afectada por diferencias en estabilidad, velocidad y crecimiento de producción, diferencias en rendimiento de purificación etc.

La presente invención proporciona procedimientos para producir mezclas de anticuerpos, preferentemente por expresión a partir de una célula huésped individual, usando anticuerpos con regiones variables que se emparejan apropiadamente entre sí para proporcionar esencialmente solamente combinaciones de sitios de unión funcional. Los procedimientos para obtener tales anticuerpos se describieron anteriormente. Las regiones variables resultantes pueden así coexpresarse en procedimiento biotecnológicamente viable y simple y en una mezcla de anticuerpos aislados usando procedimientos conocidos en la técnica.

Después de la selección de anticuerpos con el comportamiento de emparejamiento adecuado (tales como anticuerpos con regiones variables compatibles, elementos compatibles de coexpresión etc. como se describe anteriormente), los genes de región variable de anticuerpos se clonan en vectores de expresión que dirigirán la expresión de un fragmento de unión a antígeno en por ejemplo el formato siguiente: Fab, Fab', Fab'2, IgG, IgM. En muchos casos el uso de anticuerpos con por ejemplo regiones variables compatibles de emparejamiento simplifica las construcciones de ADN que median la expresión del formato de anticuerpo particular. Por ejemplo, para la expresión de dos anticuerpos diferentes como fragmentos Fab'2 en los que una de las dos cadenas de anticuerpos es la región variable compatible de emparejamiento, solo tres cadenas de anticuerpo en vez de las 4 normales se expresan para formar diferentes sitios de unión. Tales construcciones de expresión simplificada pueden conducir a una expresión más estable y controlada más fácilmente e incrementar rendimientos funcionales minimizando problemas asociados con emparejamiento erróneo de dominios de cadenas pesadas y ligeras.

La mezcla puede contener una selección dada de anticuerpos, epítopos de reconocimiento en las mismas o diferentes dianas; se dan ejemplos más adelante. Una nueva aplicación es el uso de mezcla que contiene anticuerpos específicos para complejos formados por otro anticuerpo unido a una diana dado. Ambos de los anticuerpos se pueden proporcionar en la mezcla, proporcionado un primer anticuerpo para unir el antígeno y un segundo para "sellar" la primera interacción, proporcionando la mezcla de anticuerpos con un incremento en afinidad general y especificidad. Otra realización de la invención es usar moléculas de anticuerpos emparejadas asimétricamente en la mezcla de tal manera que las funciones efectoras de la mezcla resultante están alteradas. El propósito de tal mezcla es alterar las propiedades del mecanismo efectos de los anticuerpos individuales en la mezcla, en una manera específica de antígeno/dirigida a sitio de unión, por ejemplo los anticuerpos mono-específicos pueden tener cada uno un efector diferente a partir de los componentes biespecíficos presentes en la mezcla. Considerar el siguiente ejemplo, una mezcla de dos sitios de unión de anticuerpo formateados como Oligoclones™ en el formato IgG, compuesta de la cadena pesada gamma-1 de cadena pesada para una región variable de anticuerpo y la cadena pesada gamma-4 para la otra región variable de anticuerpo. La mezcla de Oligoclones™ contendrá los dos anticuerpos mono-específicos, que serán bien de un isotipo IgG 1 o bien de un isotipo IgG4 y presentarán sus funciones efectoras respectivas y además un dímero híbrido de gamma-1 y gamma-4, con funciones efectoras alteradas o perdidas. Dado

que muchos receptores Fc se unen en una manera asimétrica a la región Fc dispuesta en forma simétrica, las regiones Fc asimétricas a menudo perderán interacciones con los receptores Fc y así actividad ADCC u otra. Los mutantes de las regiones Fc con por ejemplo mutaciones en el resto de receptor Fc γ 3

(residuos 233-238 en la región de asa inferior CH2-), o mutantes con unión a C1q reducida, o mutantes con asa intercambiada o acortada, o con dominios intercambiados por otros dominios de la familia de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, o regiones Fc optimizadas por su interacción con regiones Fc particulares (por ejemplo unión mejorada al receptor de activación Fc γ RIII y/o unión disminuida al receptor inhibidor Fc γ RIIb), se pueden usar para el ensamblaje de tales regiones Fc asimétricas. Las aplicaciones de tales pares asimétricos están proporcionando en una mezcla un compuesto pero no otros con una función efectora particular, o para retirar un efector, por ejemplo en los compuestos biespecíficos o monoespecíficos.

10. Ejemplos de usos de composiciones de compuestos proteínicos múltiples con diferentes especificidades de unión.

Hay aplicaciones para mezclas de diferentes sitios de unión en el mismo antígeno, para mezclas de diferentes sitios de unión en diferentes antígenos, para mezclas de diferentes sitios de unión en diferentes antígenos en la misma diana o en diferente diana. Como un ejemplo de uso de una mezcla en el tratamiento de una enfermedad vírica, se discute el ejemplo de infección por virus de la hepatitis B (HBV). Vacunas de HBV recombinantes proporcionan un medio seguro y efectivo para prevención de HBV que confiere inmunidad a largo plazo a través de inmunización activa. En contraste con la aparición lenta de protección tras esta vacunación, la inmunoterapia pasiva con anticuerpos a HBV proporciona protección inmediata pero a largo plazo contra transmisión e infección víricas. Se cree que los anticuerpos inhiben infección bloqueando la entrada de HBV dentro de las células. Tal inmunoterapia pasiva es aconsejable para individuos quienes hayan estado expuestos a material positivo para HBV (heridas por agujas o cortes) y para neonatos cuyas madres sean portadoras de HBV, para pacientes que sufren trasplante de hígado. En la actualidad tal tratamiento se lleva a cabo con inmunoglobulina de hepatitis B, un derivado de plasma, una preparación de anticuerpos policlonales obtenida de donantes quienes eran positivos a anticuerpos de antígenos antihepatitis B de superficie. La disponibilidad de este suero es limitada y adicionalmente los asuntos de precio y de seguridad con respecto al uso de productos sanguíneos, hacen necesario el desarrollo de un tratamiento alternativo. Un anticuerpo monoclonal humano sería ventajoso presentando una fuente estable y reproducible para inmunoterapia prolongada. Sin embargo, los estudios muestran que un anticuerpo monoclonal dirigido al antígeno S y que neutraliza la capacidad contra HBV en chimpancés retardó pero no evitó la infección con HBV. En parte esto puede causarse por la aparición de variantes de escape, mutantes en el antígeno S que pueden no estar unidos más por el anticuerpo monoclonal. De forma similar, surgen mutantes de escape en pacientes después de trasplante de hígado en ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales. Por lo tanto el tratamiento con un anticuerpo monoclonal individual puede ser ineficaz e insuficiente. Estudios de seguimiento han implicado mezclas de anticuerpos monoclonales humanos. Los estudios llevados a cabo por XTL Biopharmaceuticals y colegas muestran que una mezcla de dos anticuerpos es más eficaz en reducir la carga viral y en inhibir la infección por HBV en sistemas de modelos animales que una mezcla policlonal. Esto indica que la potencia de una respuesta inmune humoral policlonal puede reducirse a unos pocos anticuerpos y que una mezcla definida de unos pocos anticuerpos trabajaría igual de bien o mejor que algunas preparaciones policlonales. Una mezcla de dos anticuerpos que reconocen diferentes epítomos en la superficie vírica se mostró así que es más efectiva en la prevención de infección por HBV.

En otro ejemplo de uso de una mezcla de anticuerpos monoclonales en el tratamiento de una enfermedad vírica, se discute el ejemplo del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). La infección con VIH-1 conducirá al desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) si se deja sin tratar. Durante la infección con VIH-1, se desarrollan los anticuerpos neutralizantes que se dirigen contra diversos epítomos en las moléculas glucoproteicas gp41 y gp120 de la envoltura de VIH-1. En un ensayo clínico publicado en 1992, la administración de plasma seropositivo en VIH-1, conteniendo valoraciones de neutralización de anticuerpos de VIH-1 altas, se asoció con una reducción en la viremia de VIH-1 y con varias infecciones oportunistas. Varios grupos han publicado subsiguientemente que la administración de plasma seropositivo en VIH-1 da como resultado retraso en el primer evento que define el SIDA y en mejora de los síntomas clínicos. Sin embargo, el entusiasmo por la terapia pasiva declinó cuando se encontró que los anticuerpos fallaban en eliminar el virus y daba como resultado la aparición de variantes de escape de neutralización en pacientes. Se demostró que los anticuerpos que se inducen durante la infección de VIH-1 natural neutralizan pobremente el virus, dando como resultado una potencia baja de sueros hiperinmunes usados para inmunoterapia pasiva de infección por VIH-1. Además, se demostró que algunos anticuerpos que surgen durante la infección natural pueden incluso potenciar la infección. Se realizó que para terapia de anticuerpos de VIH-1, se necesitaban anticuerpos monoclonales neutralizantes potentes y bien caracterizados.

Estos hallazgos tempranos estimularon el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos contra glucoproteínas de envoltura de VIH-1. En años recientes, se han aislado varios anticuerpos monoclonales humanos contra las glucoproteínas de envoltura vírica gp41 y gp120 del VIH-1 y se han caracterizado por su actividad neutralizante vírica in vitro. Experimentos subsiguientes en modelos de primates no humanos de infección y transmisión de VIH han mostrado que anticuerpos monoclonales humanos que tienen como diana diferente epítomos de glucoproteínas de envoltura de VIH-1 presentan fuerte sinergia cuando se usan en combinación. Se ha sugerido que las combinaciones de anticuerpos monoclonales anti-VIH humanos pueden aprovecharse clínicamente para inmunoprofilaxis pasiva

frente a VIH-1.

El tercer ejemplo se refiere al campo de la rabia. La rabia es una enfermedad neurológica aguda causada por la infección del sistema nervioso central con el virus de la rabia, un miembro del género *Lyssavirus* de la familia de *Rhabdoviridae*. Casi invariablemente fatal una vez aparecen los síntomas clínicos, el virus de la rabia continua siendo una amenaza importante para infección humana o veterinaria debido a los reservorios extensos en diversas especies de la vida salvaje. Por todo el mundo, son endémicas distintas variantes de virus de la rabia en especies de animales terrestres particulares, con relativamente poco en común entre ellos. El virus de la rabia tiene de manera característica forma de bala, virión envuelto de genoma ARN de sentido negativo de hebra individual y cinco proteínas estructurales. De estas una diana para neutralización de diana es la glucoproteína (G) vírica. Los determinantes antigénicos de G varían sustancialmente entre las cepas del virus de la rabia. El tratamiento apropiado después de la infección consta de inmunoterapia pasiva y activa. Para inmunoterapia pasiva se usa mayoritariamente suero almacenado de individuos inmunes a la rabia o de caballos inmunizados, pero con riesgo de contaminación con patógenos humanos conocidos o desconocidos, o con el riesgo de reacciones anafilácticas, respectivamente. Además, la inmunoglobulina anti-rabia es cara y puede estar en suministro corto o no existente en la mayoría de los países en desarrollo donde la rabia canina es endémica. Hay por lo tanto una necesidad para composiciones y procedimientos para producir mezclas de anticuerpos, preferentemente anticuerpos humanos, para usar en inmunoterapia pasiva de infecciones de rabia. Se han elaborado varios anticuerpos monoclonales hechos por fusión del virus Epstein-Barr transformado, heterohibridomas humanos específicos del virus de la rabia (Champion y cols., J. Immunol. Methods (2000) (235: 81-90). También se han clonado varios anticuerpos que neutralizan virus derivados de estos anticuerpos (PCT/IS02/26584 y PCR/US01/14468 y Morimoto y cols. (2001), J. Immunol. Methods 252: 199-206). Varios otros anticuerpos monoclonales que neutralizan la rabia se han descrito en la técnica, lo que podría usarse en los experimentos más adelante. Como se indica en estas publicaciones, una mezcla de diferentes anticuerpos humanos que neutralizan la rabia sería un reactivo ideal para inmunoterapia pasiva de rabia.

En general para la enfermedades víricas, el ensamblaje funcional de mezclas de anticuerpos antivíricos puede incrementar la eficacia clínica del tratamiento cuando se compara con terapia monoclonal, disminuyendo la probabilidad de mutantes de escape víricos resistentes al tratamiento y reduciendo la probabilidad de resistencia vírica con terapia prolongada. En la mezcla, se pueden incluir anticuerpos que unen a diferentes epítomos del virus. Puede también ser factible incluir anticuerpos para subtipos diferentes del virus, para ampliar la utilidad del fármaco para una población de pacientes más amplia. Se pueden añadir anticuerpos antivíricos adicionales dirigidos a epítomos lineales, que pueden ser menos propensos al efecto de mutantes de escape que los anticuerpos dependientes de conformación. El efecto de especificidades de unión múltiples presentes en la mezcla de anticuerpos puede proporcionar una señal más fuerte para eliminación vírica que cuando se usa un anticuerpo monoclonal. Hay aplicaciones para mezclas de esencialmente un sitio de unión con diferentes especificidades finas para unir este antígeno. Por ejemplo, cuando el antígeno es propenso a mutación como es el caso con muchos antígenos víricos, en el curso de un tratamiento el epítomo en el antígeno puede alterarse de tal forma que se pierda la unión del anticuerpo original. Cuando se usa una mezcla, por ejemplo en base a la misma cadena pesada emparejada con un conjunto pequeño de cadenas ligeras que proporcionan un intervalo de especificidades finas, hay posibilidad de que las mutaciones afecten a la unión de algunas especies en la mezcla, pero no de otras con una química de unión diferente mediada por la región variable compatible de emparejamiento. En un caso tal será preferible usar distintas químicas de unión para la interacción con el antígeno, así las regiones variables compatibles de emparejamiento estarían lo menos relacionadas posible. Como alternativa se pueden usar anticuerpos que usan químicas de sitios de unión muy diferentes teniendo regiones variables de cadenas pesadas y ligeras no relacionadas, pero presentan comportamiento de emparejamiento exclusivamente de tal forma que su producción en la misma célula proporciona sitios de unión funcionales principalmente. Tales mezclas son preferentemente más activas que los componentes individuales y en algunos casos actuarán sinérgicamente.

En el formato de Oligoclonics™, los anticuerpos del isotipo IgG se hacen por coexpresión de los genes de las cadenas pesadas y ligeras con comportamiento de emparejamiento apropiado en la misma célula huésped. El resultado de este proceso es una mezcla de diferentes proteínas, los anticuerpos bivalentes monoespecíficos que llevan dos sitios de unión idénticos y anticuerpos específicos que llevan dos sitios de unión diferentes. Habrá ocasiones donde la presencia de esta clase biespecífica de anticuerpos potenciará adicionalmente la eficacia de la mezcla de anticuerpos. Solamente cuando hay múltiples epítomos presentes en el antígeno o microorganismo y estos epítomos se presentan en el posicionamiento correcto, un anticuerpo monoclonal del isotipo IgG será capaz por ejemplo de unir ambos de sus brazos Fab al antígeno. En muchos casos donde un antígeno es un monómero o un multímero pequeño, como citocinas, interleucinas e interferones, mayoritariamente solamente un anticuerpo IgG monoclonal se unirá al antígeno. El componente biespecífico de los Oligoclonics™, proporciona una nueva oportunidad para unir con un puente epítomos vecinos y formar un anticuerpo altamente ávido de unión. Se pueden seleccionar emparejamientos que tienen este comportamiento usando las metodologías de mezclas de rastreo de anticuerpos como se describe en el presente documento. Además de esta ventaja de avidez, las moléculas biespecíficas pueden también reticular receptores que anticuerpos bivalentes aún monoespecíficos en la misma mezcla no pueden reticular. Oligoclonics™ pueden proporcionar así una mezcla de anticuerpos que por unidad de masa neutralizará virus, citocinas, toxinas etc. con más efectividad cuando se comparan con anticuerpos monoclonales y en casos específicos, por ejemplo con un componente biespecífico de unión ávidamente o con un reticulador de receptor u otro mecanismo único mediado por el anticuerpo específico, también comparado con mezclas de anticuerpos monoclonales. Los compuestos biespecíficos

son también útiles para explorar vías tradicionalmente desarrolladas con anticuerpos biespecíficos, tales como el redireccionamiento de moléculas o células efectoras inmunes tales como células T, proteínas del complemento y células que expresan receptor de Fc para células tumorales o patógenos.

Así las mezclas de anticuerpos pueden ser adecuadas para enfrentar patógenos incluyendo virus como VIH y rabia, bacterias, hongos y parásitos. Otros ejemplos donde un suero policlonal o una gammaglobulina se usa actualmente que podría reemplazarse con una mezcla de anticuerpos definida, incluye enfermedades tales como rabia, hepatitis, virus varicela-zóster, herpes y rubeola. Las enfermedades bacterianas que podrían tratarse con mezclas de anticuerpos incluyen meningitis, enfermedades causadas por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Hemophilus*, *Nisseria*, *Pseudomonas* y los actinomicetos. Las dianas pueden incluir también aquellos implicados en sépsis bacteriana tales como lipopolisacáridos (LPS), lípido A, factor de necrosis tumoral alta o proteínas de unión a LPS. Algunos de los patógenos aparecen en serotipos múltiples y no se requiere uno sino múltiples anticuerpos para neutralizar los diversos serotipos. Una mezcla de anticuerpos proporcionará, por la elección de las especificidades de unión, una cobertura más amplia de serotipos que pueden tratarse y por lo tanto más pacientes se pueden tratar con la misma mezcla de anticuerpos. Las mezclas por esta u otra razón pueden formar también diagnósticos adecuados y parte de los kits diagnósticos para la detección de una enfermedad o trastorno en un paciente.

Las mezclas de anticuerpos pueden ser más efectivas que los anticuerpos monoclonales también en el tratamiento de enfermedades oncológicas tales como linfoma no Hodgkin (NHL) y tumores celulares epiteliales como carcinoma de mama y carcinoma de colon. Marcar como diana tanto CD20 como CD22 en NHL con anticuerpos ha demostrado ya ser menos efectivo que marcar las células tumorales con los anticuerpos individuales. Los antígenos diana adecuados para mezclas de anticuerpos en enfermedades oncológicas son muchos, incluyendo CD19, CD20, CD22, CD25 (receptor de IL-2), CD33, el receptor de IL-4, receptor de EGF, receptor de EGF mutante, antígeno carcino-embriónico, antígeno específico de próstata, ErbB2/HER2, carbohidrato de Lewisy, mesotelina, Mucina-1, el receptor de transferrina, el antígeno de membrana específico de próstata, VEGF y receptores, EpCAM y CTLA-4. Se pueden ver efectos sinérgicos cuando se usan anticuerpos que unen a dianas y a rutas diferentes en la enfermedad, tales como anticuerpos con efectos anti-angiogénesis y anti-proliferativos. Hay también aplicaciones en este campo para una mezcla de esencialmente un sitio de unión con diferentes afinidades para unir su antígeno. Por ejemplo, la eficiencia de penetración de tumor sólido in vivo está limitada para anticuerpos de alta afinidad debido a la barrera de sitio de unión, aún se requiere una mínima afinidad para lograr una acumulación sustancial en el tumor. Con los procedimientos descritos en el presente documento, se puede establecer una mezcla de anticuerpos, por ejemplo basados en la misma cadena pesada emparejada con un conjunto pequeño de cadenas ligeras que todavía tienen comportamiento de emparejamiento apropiado que proporciona un intervalo de afinidades cuando se emparejan con la cadena pesada. Tales mezclas se pueden usar para incrementar la acumulación en el tumor y el cóctel mejor equilibrado encontrado eligiendo los componentes y sus niveles de expresión. Tales mezclas son preferentemente más activas que los componentes individuales y pueden actuar sinérgicamente.

Las mezclas de anticuerpos pueden ser también adecuadas para neutralizar múltiples dianas diferentes, por ejemplo en el campo de enfermedades inflamatorias, donde están implicados factores múltiples de una manera u otra en mediar la enfermedad o agravar sus síntomas. Ejemplos de estas enfermedades son artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes insulino dependiente, diabetes mellitus y soriasis. El tratamiento óptimo de muchas de estas enfermedades implica la neutralización o de agentes patológicos circulantes y/o aquellos en la superficie de células marcadas en la respuesta inflamatoria específica en el paciente. En enfermedades de autoinmunidad e inflamatorias las dianas adecuadas son generalmente interferones, citocinas, interleucinas, quimiocinas y marcadores específicos en células del sistema inmune y en particular interferón alfa, receptor de interferón alfa, receptor de interferón gamma, receptor de interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, receptor de factor de necrosis tumoral, receptor de antígeno de HLA-clase II, interleucina-1beta, receptor de interleucina-1beta, interleucina-6, receptor de interleucina-6, interleucina-15, receptor de interleucina-15, IgE o su receptor, CD4, CD2, e ICAM-1.

También son adecuadas mezclas para la neutralización de efectos mediados por agentes de guerra biológica, incluyendo toxinas tales como neurotoxina botulínica derivada de *Clostridium botulinum*, ántrax, viruela, virus de fiebres hemorrágicas y la peste. La neutralización de la toxina botulínica se discute aquí como un ejemplo. Las toxinas botulínicas, las sustancias más venenosas conocidas, causan la enfermedad humana paralizadora botulismo y son uno de los agentes amenazadores de alto riesgo de bioterrorismo. El anticuerpo neutralizador de toxina se puede usar para profilaxis o tratamiento pre- o pos-exposición. Existen pequeñas cantidades tanto de antitoxina equina humana como de inmunoglobulina botulínica humana y actualmente se usan para tratar el botulismo de adultos e infantes. El anticuerpo monoclonal recombinante proporciona un suministro ilimitado de antitoxina libre de enfermedades infecciosas y no requiere donantes humanos para plasmáfesis. Se generó un panel de anticuerpos monoclonales humanos y murinos a partir de los linfocitos B de donantes hiperinmunes y de ratones inmunizados usando tecnología de presentación de anticuerpos de fagos. Se probaron anticuerpos monoclonales y combinaciones individuales por su capacidad para proteger ratones de dosis mortales de neurotoxinas (Nowakowski, A. y cols. (2002) PNAS 99: 11346-11350). Mientras que los anticuerpos monoclonales individuales no mostraron ninguna protección de los ratones contra dosis letales de toxinas, las combinaciones de solamente tres anticuerpos monoclonales contra diferentes epítomos de la toxina dieron protección muy potente. La combinación de tres anticuerpos monoclonales neutralizó 450.000 dosis letales de toxina botulínica, una potencia 90 veces más grande que la globulina hiperinmune

humana. De forma importante, la potencia de la mezcla de anticuerpo monoclonal se debió principalmente a un gran incremento en la afinidad de unión de anticuerpos. Así, procedimientos que permiten la producción rentable, controlada y eficiente de mezclas de anticuerpos monoclonales contra neurotoxina botulínica proporcionan una vía para el tratamiento y la prevención de botulismo y también otros patógenos y agentes de amenaza biológica. Como se muestra en este estudio, una mezcla de tres anticuerpos que unen epítomos no solapantes en neurotoxina botulínica, tuvieron un efecto sinérgico en neutralización de toxinas debido a una avidéz general incrementada.

Las mezclas de anticuerpos se pueden aplicar para retrasar la aparición de las respuestas anti-idiotípicas en pacientes, proporcionando idiotipos múltiples de una familia de anticuerpos, uniendo todos a la misma diana, en la forma más simple mutantes aminoacídicos del mismo anticuerpo con una especificidad y afinidad de unión similar resultante, a una mezcla más compleja de anticuerpos múltiples dirigidos contra el mismo epítipo.

Las mezclas de anticuerpos se pueden aplicar también para desarrollar derivados de las mezclas de proteínas, incluyendo inmunotoxinas, versiones marcadas con radioisótopos, inmunoconjugados, conjugados anticuerpo-enzima para terapia con profármacos (ADEPT), inmunopolímeros (Allen, (2002) Nat Rev Cancer 2: 750-763). Las mezclas de los anticuerpos pueden bien modificarse en lote con las sustancias apropiadas, bien fusionarse genéticamente a un gen que codifica una toxina o a un gen que codifica una enzima como se describe en la técnica para anticuerpos monoclonales.

Habiendo descrito en general la invención, la misma se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se desean como limitación.

Ejemplos:

Ejemplo 1. Descripción de los anticuerpos anti-rabia derivados de hibridoma usados en los estudios.

Este ejemplo describe varios anticuerpos neutralizantes de rabia que se usan en los ejemplos adicionales. Los siguientes anticuerpos son anticuerpos humanos neutralizantes de virus: (1) JB.1 (abreviado a JB en la sección siguiente): descrito en Champion y cols., J. Immunol. Methods (2000) 235: 81-90 y la clonación y secuencia en el documento PCT/IS02/26584. (2) JA-3.3A5 (abreviado a JA en la sección siguiente): descrito en Champion y cols., J. Immunol. Methods (2000) 235: 81-90, la clonación en Morimoto y cols. (2001), J. Immunol. Methods 252: 199-206 y también en el documento PCT/US01/14468. (3) M57: anticuerpo y su clonación se describieron en Cheung y cols. (1992), J. Virol. 66: 6714-6720 y adicionalmente en el documento PCT/IS02/26584. Las secuencias nucleotídicas de las secuencias nucleotídicas de cadenas pesadas y ligeras completas y también de las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables se revelan en los listados de secuencias (SEC. ID. N.^{os}: 1-12). En base a los datos en la bibliografía todos estos anticuerpos neutralizan diversos aislados de rabia, pero no todos la misma, proporcionando un espectro más amplio de aislados neutralizados que cuando se usa un monoclonal.

Ejemplo 2. Producción de mezclas de fragmentos de anticuerpos scFv basados en anticuerpos antirrabia derivados de hibridoma reclonados y coexpresión.

Este ejemplo describe la producción de una mezcla de tres sitios de unión como tres proteínas. Usando como plantilla los genes de la región variable de los tres anticuerpos descritos en el Ejemplo 1, la clonación se usa construyendo tres casetes de expresión, uno por cada uno de los anticuerpos y clonando estos en un vector de expresión apropiado.

Primero los genes de la región variable se amplifican con oligonucleótidos que hibridan con los extremos 5' y 3' de las secuencias nucleotídicas y proporcionan sitios de restricción apropiada de enzimas para clonación. Las técnicas de clonación estándar se describen en Sambrook y cols., 'Molecular cloning', segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987). Los genes de regiones variables clonadas se amplifican por la reacción en cadena de la polimerasa usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Para anticuerpo JA, se usa el siguiente procedimiento: se diseñan cebadores en la región FR1 y en la región FR4 de la secuencia de nucleótidos de cadena pesada variable, tal que la región variable se clona corriente abajo de una secuencia líder bacteriana y corriente arriba de la fase de lectura con una secuencia codificante de Gly-Ser. El poliengarse dentro del que se clonan las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se indica en la Figura 13. Los cebadores se diseñan manteniendo la secuencia aminoterminal de las regiones FR1 y FR4 e incluyendo un sitio de enzimas de restricción para clonación de la región variable dentro de la región de poliengarse de pSCFV (Figura 13). pSCFV es un derivado de pUC119 que es esencialmente pHEN 1 (Hoogenboom y cols. (1991) Nucl. Acids Res. 19: 4133-4137) dentro de la que el fragmento SfiI-NotI se reemplaza con la secuencia SfiI-NotI representada en la Figura 13 y en la que el sitio NotI está seguido por una etiqueta de c-myc, para detección y purificación del fragmento de anticuerpo. Además el gen III de fago filamentoso se elimina en este plásmido. Varias opciones para clonación direccional son factibles, indicadas por las localizaciones de sitios de restricción en el mapa de poliengarse en la Figura 13. Para la VH de JA, se usan los siguientes oligonucleótidos amplificando las regiones VH: 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCA GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GG-3' y el complemento reverso de 5'-ACC CGG GTC ACC GTC TCC TCC-3'. La reacción de PCR se lleva a cabo con el gen de anticuerpo de plantilla que ya se clonó, plásmido SPBN-H (Morimoto y cols. (2001), J. Immunol. Methods 252: 199-206), durante 25 ciclos, desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 50 °C durante 60 segundos y elongación a 72 °C durante 90 segundos, usando ADN polimerasa Taq (Promega, Madison, WI). El producto resultante de aproximadamente 400 pares de bases se purifica,

se digiere con las enzimas de restricción, Sfi I y BstEII y se clona en pSCFV, dando como resultado pJA-VH. De forma similar, la cadena ligera de JA se amplifica a partir de pSPBN-L con oligonucleótidos apropiadamente diseñados y se clona en pJA-VH, proporcionando pSCFV-JA. La integridad de las secuencias se confirma usando el kit de secuenciación de AmpliTaq (Perkin-Elmer, Foster City, EE.UU.) con cebadores específicos basados en el armazón del vector justo adyacente a los insertos de la región variable. De forma similar, las regiones variables de anticuerpos a partir de hibridomas JB y M57 se clonan en el formato Fv de cadena simple.

La expresión de los fragmentos de anticuerpos individuales se hace como sigue. Los fragmentos de scFv se expresan tras inducción con isopropil-p-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a partir del promotor lacZ que dirige la expresión del scFv en plásmidos basados en pSCFV y se recogieron del espacio periplásmico de células TG1 de *E. coli*. Confirmando la unión de los scFv individuales, se elabora un ELISA usando placas de Polysorb (Nunc) revestidas con 5 microgramo/ml de glucoproteína del virus de la rabia. La purificación de virus y la purificación de glucoproteínas se han descrito en otros puntos (Dietzschold y cols. (1996) Laboratory Techniques in Rabies, Eds Meslin, Kaplan and Korpowski. Organización Mundial de la Salud, Génova, página 175). Como alternativa se usa para el revestimiento una fuente de glucoproteína de rabia (G) recombinante del tipo apropiado. La secuencia de G de rabia está disponible para la persona experta en la técnica y así están las técnicas de clonación, expresión y purificación.

En la etapas siguientes los casetes de expresión de scFv se clonan uno después del otro en plásmido pSCFV-3 (representado en la Figura 14A), que es un derivado de sitios de restricción únicos que llevan pSCFV para clonar genes scFv, dos detrás del mismo promotor lacZ y separados por medio de un nuevo sitio de unión a ribosomas (rbs) y una nueva secuencia señal (S) y una detrás de un promotor inducible por arabinosa, rbs y S (Figura 14A). Ello lleva diferentes etiquetas, una por cada uno de los casetes scFv, c-myc (como en pSCFV; secuencia EQKLISEEDL), la etiqueta VSV (la secuencia YTDIEMNRLGK) y la etiqueta (HA) de hemaglutinina del virus influenza (la secuencia YPYDVPDYA) y todo seguido por un tramo de 3 alaninas y 5 histidinas. Este diseño proporciona un procedimiento para detección de anticuerpos individuales en la mezcla y un procedimiento genético para purificación, en base a cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) usando procedimientos bien conocidos en la técnica. El plásmido se usa también en Ejemplo 17 (con insertos de restricción y sitios de clonación descritos en las SEC. ID. N.ºs: 16 y 17). Los genes scFv están amplificados con oligonucleótidos que introducen los sitios apropiados y se clonan en este plásmido. El plásmido finalmente resultante, pSCFV-JA-JB-M57 (Figura 14B) se introduce dentro de la célula TG1 huésped de *E. coli* y la expresión de los scFvs se indujo con IPTG (para JA y JB) y/o arabinosa (M57). Por inducción con IPTG, se logra la expresión de una mezcla de dos fragmentos scFv funcionales, en la que el enlace directo favorece el emparejamiento entre las regiones variables unidas intermolecularmente. Por inducción individual con arabinosa, se coexpresa un fragmento de scFv adicional. Como alternativa, los tres casetes de expresión de scFv se clonan en plásmidos separados dentro de plásmidos compatibles tales como pBR322 y pACYC y se mantienen en la misma célula huésped antes de inducción. La unión de la mezcla a glucoproteína de rabia (G) se pone a prueba como antes usando ELISA. La contribución a la unión en la mezcla de cada uno de los fragmentos scFv se confirma usando uno de los tres anticuerpos anti-etiqueta (la unión del anticuerpo monoclonal de ratón 9E10 a marca de epítipo c-Myc humano (código del producto de abcam, www.abcam.com: ab32) y anticuerpos policlonales contra la etiqueta HA (ab3413) o contra la etiqueta VSV (ab3556). Verificando si la producción se lleva a cabo por una bacteria y su progenie y no por tres clones que cada uno produce uno de los fragmentos de anticuerpo, el cultivo se somete a purificación de colonias después de 4 horas en la fase de inducción y se pone a prueba la producción de tres clones independientes, confirmando que la expresión es clonal. Determinando el porcentaje de regiones variables emparejadas correctamente, la mezcla de scFv se purifica primero a partir del extracto periplásmico de *E. coli* usando IMAC. Brevemente, un cultivo de 500 ml inducido con IPTG y arabinosa (mantenido 4 horas a 30 °C), se agita a 4600 x g durante 20 minutos a 4 °C y el sedimento bacteriano se resuspende en medio salino tamponado en fosfato (PBS) conteniendo inhibidores de proteasa (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo y benzamidina). La solución se sonica a 24 °C usando un desintegrador ultrasónico (MSE Scientific Instruments) y la suspensión se centrifuga a 50.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. La fracción de sobrenadante se incuba con resina TALON™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Clontech). Después de lavado exhaustivo, las proteínas se eluyen usando imidazol 100 mM. Tras este procedimiento, los fragmentos scFv se purifican adicionalmente por filtración de gel usando una columna Superdex 75 (Amersham Pharmacia Biotech) conectada a un instrumento biológico (Biorad). Las concentraciones de ScFv se cuantifican usando el kit del ácido bicinonínico (Pierce). Una fracción de la mezcla de anticuerpos está unida a un exceso molar de proteína G biotinilada en un volumen de 0,5 ml. La proteína con scFv unidos se captura sobre la superficie de un exceso de perlas revestidas de estreptavidina paramagnética (200 microlitros de DYNAbeads, Dynal, Noruega), de una manera similar a la que se describe en el Ejemplo 4 para selecciones de fagos. Los sobrenadantes de la mezcla se ponen a prueba después para la presencia de fragmentos scFv en un SDS PAGE seguido por análisis de prueba de bandas de Western con los anticuerpos anti-etiqueta caracterizando los anticuerpos no funcionales. El experimento proporciona evidencia para la producción simultánea de tres fragmentos scFv por la misma célula huésped y la recuperación eficiente de sitios de unión funcionales, así regiones variables emparejadas correctamente a partir de esta preparación.

Ejemplo 3. Producción de mezclas de anticuerpos de scFv-Fc en base a los anticuerpos antirrabia derivados de hibridoma reclonados y a la co-expresión en un sistema eucariota.

Este ejemplo describe la producción de una mezcla de tres o seis proteínas diferentes compuestas de regiones variables emparejadas formando dos o tres especificidades de unión. En un ejemplo adicional, los genes scFv están

subclonados en un vector de expresión eucariota basado en pCDNA3 que lleva la región gamma-1 humana. Este plásmido, VHEXpress, se manipuló extensamente eliminando los sitios de enzimas de restricción internos (Persic y cols. (1997) 187: 9-18) y contiene un promotor (CMV en vez de EF-lalfa como en publicación), una secuencia líder eucariota, un poliengarce con sitios de clonación para una región variable de anticuerpo, el gen gamma-1 y el sitio de poli A de la hormona del crecimiento bovina (Figura 15). Adicionalmente ello contiene los genes que codifican resistencia a amp y resistencia a neo y contiene el origen de replicación de SV40. La secuencia completa se da en SEC. ID. N.º: 13. Este vector es adecuado para la expresión de genes de región variable de anticuerpos formateados como fragmentos scFv. La clonación del gen de scFv del anticuerpo JA se lleva a cabo como sigue. El scFv se usa como una plantilla en una reacción de PCR con oligonucleótidos 5'-TATC CGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG TTT GAG TCT GGG GG-3' y el complemento reverso de 5'-ACC CGG GTC ACC GTC TCC TCC GGT GAG TCC TAG CGC TTT TCG T-3'. El fragmento de PCR de aproximadamente 750-800 pares de bases se aísla, se digiere con BssHII y Eco47III y se clona dentro de plásmido VHEXpress cortado de forma similar. De forma similar, los genes scFv de anticuerpos JB y M57 se clonan dentro de este plásmido; evitando digestión en sitios internos se usa el otro sitio adecuado (Bpu1102I) o una ligadura de 3 formas que proporciona también el mismo plásmido. Los plásmidos resultantes con scFv clonado correctamente, llamados respectivamente pscFv-Fc-JA, pscFv-Fc-JB y pscFv-Fc-M57, se introducen dentro de las células huésped, en este ejemplo células PER.C6™.

Para un análisis inicial, estos plásmidos se expresan transitoriamente bien solos o bien en combinaciones de dos o tres construcciones scFv-Fc. Las células cultivadas a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo con suero fetal de ternera al 10 % (FCS) en matraces 80 cm² se transfectan durante 4 horas usando lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (140 microlitros de lipofectamina por 10 microgramos de ADN por matraz) en medio libre de suero a 37 °C. Después de esta incubación, las células se lavan, se resuspenden en medio de cultivo rico y las células se cultivan durante 5 días. El sobrenadante se recoge para análisis de la proteína de fusión scFv-Fc segregada. Se usa un ELISA en sándwich cuantificando la cantidad de IgG producida, usando dos anticuerpos dirigidos a la región Fc. Las proteínas de fusión scFv-Fc se purifican usando cromatografía de afinidad a proteína A usando una columna HighTrap (Amersham Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para IgG 1) y el eluato concentrado por medio de concentrador Microcon-YM30 (Amicon) y su tampón intercambiado por PBS a pH 7,0. La aparición de diferentes mezclas de scFv-Fc, seis en total para las células transfectadas con los tres genes de scFv-Fc, se caracteriza adicionalmente como se describe anteriormente en ELISA y usando aislados víricos que se reconocen específicamente por los anticuerpos, incluyendo virus de murciélago europeo 2 por anticuerpo JB y virus de murciélago de Lagos y virus Mokoa por anticuerpo JA y cepas CVS-11, CVS-24, PM, SHBRV y COSRV (Champion y cols., J. Immunol. Methods (2000) 235: 81-90). La presencia de los sitios de unión M57 y JB se confirma usando un anticuerpo anti-Id (véanse también ejemplos 14 y 22). Tras esto, la actividad de neutralización vírica de la mezcla de 3 moléculas mono-específicas y de 3 moléculas bio-específicas (sin purificación) se somete a ensayo para la presencia de anticuerpos neutralizadores del virus de la rabia usando la prueba de inhibición de foco fluorescente rápida (RFFIT) como se describe por Hooper y cols., ASM Pres, WA, página 1997. La dilución en serie se hace esencialmente del sobrenadante conteniendo la mezcla de anticuerpos en placas de 96 pocillos (Nunc) y una dilución del virus de la rabia conocida por causar infección del 70-80 % de las células indicadoras añadidas a cada pocillo. Los controles son muestras control de sueros inmunes a la rabia positivas y se incluye también medio negativo. Después de 1 hora a cada pocillo se añaden 50.000 células de riñón de hámster bebé (BHK) y el cultivo se incuba durante toda una noche a 37 °C. Las placas se lavan después una vez con PBS enfriado en hielo y las células se fijan con acetona al 90 % enfriada en hielo durante 20 minutos a -20 °C. La acetona se retira y se añaden a las placas secadas al aire 50 microlitros de anticuerpo monoclonal de nucleoproteína antirrabia marcado con FITC (Ab 1002 del sitio abcam o anticuerpo de Centocor, Malvern). Después de incubación de 1 hora a 37 °C, las placas se lavaron 3 x con agua y se analizaron en un microscopio de fluorescencia. La actividad de cada uno de los componentes de scFv se estudia poniendo a prueba en este ensayo la neutralización de diversos aislados de rabia, incluyendo los mencionados en el Ejemplo 1. Los mismos plásmidos pscFv-Fc-JA, pscFv-Fc-JB y pscFv-Fc-M57 son también adecuados elaborando transfectantes adecuados. Por selección usando el gen de resistencia a neo y cultivando y rastreando procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica, se obtienen líneas celulares derivadas de PER.C6™ estables que expresan anticuerpos. Se transfectan esencialmente 5×10^6 células PER.C6™ usando lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante y 3 microgramos de ADN por plásmido. Las células se transfectan con los 3 microgramos de cada plásmido separadamente, o con 1,5 microgramos cada una de pscFv-Fc-JA y pscFv-Fc-JB, o con 1,5 microgramos cada una de pscFv-Fc-JB y pscFv-Fc-M57, o con 1 microgramo de cada uno de pscFv-Fc-JA, pscFv-Fc-JB y pscFv-Fc-M57, o con un vector de LacZ de control. Después de 5 horas las células se lavan y el medio se intercambia con medio no selectivo. El día siguiente se reemplaza el medio con medio recién preparado conteniendo G418 a 500 microgramos/ml (Sigma-Aldrich) y además cada 2-3 días siguientes el medio de cultivo se renueva hasta que aparecieron los clones (15-20 días después de sembrar). Los clones se recolectan y se clonan aparte a condiciones de dilución limitantes, de tal forma que 2-3 semanas más tarde empiezan a aparecer líneas celulares clonales. Estas se expanden a pocillos más grandes y a matraces y eventualmente el medio selectivo se omite. El sobrenadante de estas líneas celulares se recoge para análisis de la proteína de fusión de scFv-Fc segregada. Como antes, se usa un ELISA en sándwich (como se describe en el documento WO 00/63403) cuantificando la cantidad de IgG producida, usando dos anticuerpos dirigidos a la región Fc. Las proteínas de fusión se purifican usando cromatografía de afinidad de proteína A usando una columna HighTrap (Amersham Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para IgG 1. La scFv-Ig purificada a partir de diversos clones se aísla, se purifica y se pone a prueba en una serie de ensayos. Lo primero es analizar la presencia de los dos o tres genes scFv

diferentes de las líneas celulares creadas, amplificando el ADN genómico de estas líneas celulares con anticuerpo JA/JB o M57 scFv u oligonucleótidos específicos de genes V y confirmar la presencia por secuenciación del material amplificado. El número de copias de cada una de las construcciones de anticuerpos integrados se determina con procedimientos tales como prueba de bandas de Southern o Hibridación In Situ Fluorescente (FISH). En segundo lugar, la mezcla se caracteriza bioquímicamente usando SDS-PAGE y enfoque isoeléctrico. Como alternativa los anticuerpos anti-idiotipo o los mimótopos peptídicos se usan delineando las composiciones (véase Ejemplo 12). La estabilidad del nivel de expresión, de las proporciones entre los componentes scFv diferentes y de la composición de la mezcla de anticuerpos producida por líneas celulares que producen la mezcla de tres o seis proteínas se continúa a lo largo del tiempo por estos ensayos. Finalmente, se llevan a cabo los ensayos de unión y neutralización, incluyendo unión de antígenos en ELISA y en microscopía de fluorescencia con células infectadas y tejidos infectados y el ensayo de neutralización de virus RFFIT como se describe anteriormente. La actividad biológica de la mezcla se pone a prueba frente a un intervalo de aislados de rabia y se determina la actividad de acuerdo con las unidades internacionales de anticuerpos de la rabia y se hace referencia a inmunoglobulina de rabia de referencia de la OMS (WHO Technical Series Report (1994) vol. 848, página 8; y vol. 840). Poniendo a prueba la actividad biológica (neutralización vírica) de una serie de líneas celulares que producen cantidades variables de las tres fusiones scFv-Fc, se identifica la mezcla más óptima. Las mezclas se comparan con la actividad de rabia de ImmoGam®, la preparación de inmunoglobulina humana usada para inmunoterapia pasiva (véase también <http://www.aventispasteur.com/usa/product/pdf/iles/!LE3439I.PDF>). El efecto del componente biespecífico se prueba comparando la eficacia de neutralización de la mezcla de proteínas scFv-Fc con la actividad de cantidades comparables de los (1) anticuerpos recombinantes completos individuales JA (IgG1), JB (IgG 1) y M57 (IgG 1), (2) mezclas de dos o tres de estos anticuerpos. Debido a la discrepancia observada algunas veces entre los datos de neutralización *in vitro* e *in vivo*, además de ensayos de neutralización *in vitro*, puede ser necesario llevar a cabo algunas veces ensayos de neutralización *in vivo* usando experimentos de protección de ratón como se describen en Dietzschold y cols. (1992) PNAS 89: 7252.

Ejemplo 4. Selección de regiones variables emparejadas óptimamente por dos pares de regiones variables de anticuerpos optimizando la región variable de cadena ligera.

Se usan en este experimento anticuerpos M57 y JB. Ambos tienen una cadena ligera lambda, de clase I para JB de de clase II para M57, con homología entre las dos cadenas (Figura 16). Los genes de la región variable de estos dos anticuerpos se clonan en vector de presentación de pFab, que parece funcionalmente pCES1 (de Haard, H.J. y cols. (1999) J Biol Chem 274: 18218-18230) y es una presentación de fragmento Fab y un vector de expresión. En este sistema de vector, los genes de región de cadena pesada variable se clonan como fragmentos de genes VH; el vector suministra todos los Fab con un gen de CH1 de gamma-1 humano. El fragmento Fd se usa para dos etiquetas para purificación y detección: una cola de histidina para Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado (IMAC) y una etiqueta derivada de c-myc, seguida por un codón de parada ámbar y la proteína de revestimiento secundaria III de fago filamentoso fd. La cadena ligera de anticuerpos se clona como fragmento de VLCL completo, para secreción dirigida y ensamblaje con la VHCH1 en la partícula de fago. Los sitios de enzimas de restricción y la secuencia de la región de poliengarce está indicada en la Figura 17. La clonación de las regiones variables se lleva a cabo de forma similar a como se describe en el Ejemplo 2, con oligonucleótidos amplificando la región VH y que adjuntan sitios de enzimas de restricción apropiados. Los plásmidos resultantes se designan VH-M57 y pVH-JB, respectivamente.

Estos plásmidos se usan como receptores para una colección de cadenas lambda humanas derivadas de donantes humanos. Los linfocitos B se aíslan a partir de 2 l de sangre en un gradiente Ficoll-Paque. Para aislamiento de ARN, el sedimento celular se disuelve inmediatamente en 50 ml de tiocianato de guanidinio 8 M/2-mercaptoetanol 0,1 M. El ADN cromosómico se cizalla por completo haciéndolo pasar a través de una jeringuilla estrecha (calibre de 1,2/0,5 mm) y los desechos insolubles se retiran por centrifugación a velocidad lenta (15 minutos 2.934 x g a temperatura ambiente). El ARN se sedimenta por centrifugación a través de un gradiente de bloque de CsCl (12 ml de sobrenadante en una capa de 3,5 ml de CsCl 5,7 M/EDTA 0,1 M; en 4 tubos totales) durante 20 horas a 125.000 x g a 20 °C en un rotor SW41 (Beckman). El ARN se almacena a -20 °C en etanol. Se prepara ADNc cebado al azar con 250 mg de ARN de PBL. El ARN se desnaturaliza por calor durante 5 minutos a 65 °C en presencia de 20 mg de cebador al azar (Promega), subsiguientemente se añaden tampón y DTT de acuerdo con las instrucciones de los suministradores (Gibco-BRL), así como dNTP de 250 mM (Pharmacia), 800 U de ARNsin (40 U/ml; Promega) y 2.000 U de MMLV-RT (200 U/ml; Gibco-BRL) en un volumen total de 500 ml. Después de 2 h a 42 °C, la incubación se detiene por una extracción con fenol/cloroformo; se precipita y se disuelve ADNc en 85 ml de agua. A partir de este material, las reservas génicas de región variable de la familia lambda de cadenas ligeras se amplifican usando oligonucleótidos 4 VX-específicos que se emparejan preferencialmente con las familias lambda I y II (HuV11A/B/C-BACK y HuV12-BACK como en la Tabla a continuación) y con dos cebadores basados en las regiones constantes (HuCl2-FOR y HuCl7-FOR como en Tabla 1 más adelante, combinadas en cada reacción) y con PCR en un volumen de 50 ml, usando polimerasa AmpliTaq (Cetus) y 500 pM de cada cebador durante 28 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 2 minutos a 72 °C). Todos los productos se purifican a partir de gel de agarosa con el kit de extracción de QIAex-II (Qiagen). Como entrada para reamplificación introduciendo sitios de restricción, se usan 100-200 ng de fragmento de ADN purificado como plantilla en un volumen de reacción de 100 ml, usando los oligonucleótidos apropiadamente prolongados proporcionando los sitios para clonación, ApaI y Ascl (últimos seis cebadores de la siguiente Tabla). Este material amplificado se purifica, se digiere con Ascl y ApaI y se clonan dos muestras dentro de los los plásmidos diferentes pVH-M57 y pVH-JB.

	HuVI 1A-BACK	5'-CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC-3'
	HuVI1B-BACK	5'-CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CG-3'
	HuVI1GBACK	5'-CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC-3'
	HuVI2-BACK	5'-CAR TCT GCC CTG ACT CAG CCT-3'
5	HuCI2-FOR	5'-TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TG-3'
	HuCI7-FOR	5'-AGA GCA TTC TGC AGG GGC CAC TG-3'
	HuVI1A-BACK-APA	5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC-3'
	HuVI 1B-BACK-APA	5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC-3'
	HuVI 1C-BACK-APA	5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC-3'
10	HuVI2-BACK-APA	5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAR TCT GCC CTG ACT CAG CCT-3'
	HuCI2-FOR-ASC	5'-ACC GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTA TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TG
	HuCI7-FOR-ASC	5'-ACC GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTA AGA GCA TTC TGC AGG GGC CAC TG

Estos resultados de clonación dan como resultado dos bibliotecas designadas como Fab-VH-M57-VL_n y Fab-VH-JB-VL_n.

- 15 Las partículas de fagos se elaboran a partir de cultivos de estas dos bibliotecas. El rescate de partículas de fagémidos con fago ayudante M13-KO7 se lleva a cabo de acuerdo con (Marks y cols. (1991), J. Mol. Biol. 222: 581-597) en una escala de 1 l, usando números representativos de bacterias a partir de la biblioteca para inoculación, asegurando la presencia de al menos 10 bacterias a partir de cada clon en el inóculo de inicio. Para selecciones, se usaron 10¹³ u.f.c. (unidades formadoras de colonias) con 10 microgramos/ml de glucoproteína de rabia revestida en inmunotubos (Maxisorp tubes, Nunc) o con proteína G biotinilada soluble 250 nM. Se biotinila antígeno a una proporción de una a cinco moléculas de NHS-Biotina (Pierce) por molécula de antígeno de acuerdo con las recomendaciones de los suministradores. Se llevan a cabo tres rondas de selección con estas bibliotecas. Los protocolos cultivando y seleccionando bibliotecas de presentación de fagos se han descrito en otros puntos (como en Marks y cols. (1991), J. Mol. Biol. 222: 581-597) y se conocen bien por aquellos que trabajan en la técnica. Brevemente, la selección con el antígeno biotinilado se lleva a cabo como sigue. Las partículas de fago se incuban en una rueda rotadora durante 1 hora en M-PBST al 2 % (PBS suministrado con leche desnatada en polvo al 2% y Tween-20 al 0,1 %). Mientras tanto, se incuban 100 ml de perlas paramagnéticas conjugadas con estreptavidina (Dynal, Oslo, Noruega) en una rueda rotadora durante 2 horas en M-PBST al 2 %. Se añade antígeno biotinilado al fago preincubado y se incuba en una rueda rotadora durante 30 minutos. A continuación, se añaden perlas y la mezcla se deja en la rueda rotadora durante 15 minutos. Después de 14 lavados con M-PBST al 2 % y un lavado con PBS, la partículas de fago se eluyen con 950 ml de trietilamina 0,1 M durante 5 minutos. El eluato se neutraliza inmediatamente por la adición de 0,5 ml de Tris-HCl (pH 7,5) y se usa para infección de células TG1 de *E. coli* en fase logarítmica. Las células TG1 están infectadas durante 30 minutos a 37 °C y se plaquean en placas de agar TY 2x (16 g de bactotripton, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro), conteniendo glucosa al 2 % y 100 mg/ml de ampicilina. Después de incubación durante toda una noche a 30 °C, las colonias se recogen por raspado a partir de las placas y se usan rescatando fago según se describe (Marks y cols. (1991), J. Mol. Biol. 222: 581-597). Los sobrenadantes de cultivo de clones seleccionados individuales que albergan bien fago rescatado o bien fragmentos Fab solubles se ponen a prueba en ELISA con antígeno biotinilado revestido directamente o capturado indirectamente por medio de estreptavidina BSA biotinilada inmovilizada. Se describe aquí el procedimiento con antígeno biotinilado para la detección de fragmentos Fab solubles. Para captura de glucoproteína de rabia biotinilada, primero se reviste BSA biotinilada a 2 mg/ml en PBS durante 1 hora a 37 °C. Después de tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,1 % (v/v), las placas se incuban durante 1 hora con estreptavidina (10 mg/ml en PBS/gelatina al 0,5 %) (24). Tras lavar como anteriormente, el antígeno biotinilado se añade durante una incubación durante toda una noche a 4 °C a una concentración de 3 mg/ml. Las placas se bloquean durante 30 minutos a temperatura ambiente con leche en polvo semidesnatada al 2 % (w/v) (Marvel) en PBS. El sobrenadante de cultivo se transfiere a estos pocillos y se diluye 1 o 5 veces en Marvel al 2 % (p/v)/PBS y se incuba durante 2 horas; el Fab unido se detecta con anticuerpo anti-myc 9E10 (5 mg/ml) reconociendo la etiqueta myc-péptido en el extremo carboxiterminal de la cadena Fd pesada y conjugado antirratón-HRP de conejo (DAKO). Tras la última incubación, se lleva a cabo la tinción con tetrametilbenzidina (TMB) y H₂O₂ como sustrato y se detiene añadiendo la mitad de un volumen de H₂SO₄ 2 N; la densidad óptica se mide a 450 nm. Los clones que dan una señal positiva en ELISA (sobre 2x el fondo), se analizan adicionalmente por identificación genética con BstNI de los productos de PCR obtenidos por amplificación con los oligonucleótidos M13-reverso y gen III-directo (como en Marks y cols. (1991), J. Mol. Biol. 222: 581-597).

La inducción a gran escala de fragmentos Fab solubles se lleva a cabo en una escala de 50 ml en 2xTY conteniendo 100 mg/ml de ampicilina y glucosa al 2 %. Después de cultivar a 37 °C a una D.O.₆₀₀ de 0,9, las células se sedimentan

(10 minutos a 2.934 x g) y se resuspenden en 2xTY con ampicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias se recogen después de 3,5 horas a 30 °C por centrifugación (como anteriormente); las fracciones periplásmicas se preparan resuspendiendo el sedimento celular en 1 ml de PBS enfriado en hielo. Después de 2 a 16 horas rotando cabeza con cabeza a 4 °C, los esferoplastos se retiran por dos etapas de centrifugación: después de centrifugar durante 10 minutos a 3.400 x g, el sobrenadante se aclara por una etapa de centrifugación adicional durante 10 minutos a 13.000 x g en una centrifugadora de tubos eppendorf. La fracción periplásmica obtenida se usa directamente por determinación de la afinidad por resonancia de plasmón de superficie y de especificidad fina en prueba de bandas de Western o estudios de neutralización de virus.

Usando la citada prueba de ELISA, se identifican paneles de Fab reactivos para antígenos tanto para M57 como para JB. Los Fab se purifican y su afinidad relativa por el antígeno se compara con el anticuerpo nativo como determina Fab. Todos los clones que están en un alcance de 10 veces de la afinidad se secuencian. Secuenciando, se prepara ADN plasmídico a partir de cultivos de 50 ml cultivados a 30 °C en el medio, conteniendo 100 mg/ml de ampicilina y glucosa al 2 %, usando el midi-kit de QIAGEN (Qiagen). Se llevó a cabo secuenciación con el kit termociclador (Amersham) con cebadores marcados con CY5 CH1FOR (5'-GTC CTT GAC CAG GCA GCC CAG GGC-3') y M13REV (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'). El análisis se hizo como se describe anteriormente; las secuencias de aminoácidos de los dos grupos de VL de anticuerpos, para M57 y JB, se comparan entre sí. Muchas de las variantes seleccionadas se derivan de la familia lambda 1 y lambda 2 pero llevan mutaciones somáticas por toda la secuencia. En cada colección, se selecciona un grupo de 10 VL comunes que son candidatos "comunes" teóricos para emparejarse a ambas VH y estas se clonan por medio de los sitios de restricción comunes ApaLI y Ascl dentro del plásmido que lleva la otra VH. Así el VLCL de un clon candidato de biblioteca Fab-VH-M57-VL_n se aísla usando electroforesis de gel de la digestión con ApaLI-Ascl y se clona en pVH-JB. Esto se lleva a cabo para todas las VL candidatas; las nuevas combinaciones se prueban todas como anteriormente en ELISA para su compatibilidad de emparejamiento con el VH no análogo. El clon con la afinidad más alta en ambos anticuerpos se designa VL-M57=JB. Este procedimiento conduce a la identificación de región variable lambda de cadena ligera que el el formato Fab puede emparejarse óptimamente tanto con la VH de JB como con la de M57.

Ejemplo 5. Selección de regiones variables emparejadas óptimamente por dos pares de regiones variables de anticuerpos optimizando la región variable de cadena pesada.

Para las ocasiones donde las dos cadenas ligeras de dos anticuerpos dados sean muy diferentes entre sí, como es el caso entre anticuerpos de las familias kappa y lambda, es posible también seguir una estrategia alternativa que la descrita en el Ejemplo 4. En el presente documento describimos la selección de un VL emparejado óptimamente, que se emparejará en una manera compatible con dos regiones variables. En el experimento el bucle principal en la VH, el CDR3, que tanto es responsable de la unión a antígeno como contribuye a la interacción con la cadena ligera, se diversifica. Se pueden seguir otros esquemas, en los que otros residuos de VH conocidos por estar estructuralmente posicionados en la interfase VH-VL se mutan (ejemplificados en la Figura 18). Este procedimiento puede aplicarse también a múltiples genes de la región variable, usando un gen de región variable, preferentemente de línea germinal, elegido y múltiples regiones variables compañeras que se mutagenizan después y se seleccionan como en la siguiente descripción.

El objetivo del experimento es encontrar una variante de JA que tendrá de forma óptima comportamiento de emparejamiento a VL-M57=JB. El anticuerpo JA lleva una cadena kappa en lugar de una lambda (Figura 16) y el reemplazo de su cadena ligera análoga con VL-M57-JB conduce a una pérdida de afinidad sustancial. Por lo tanto ella es la VH de este anticuerpo que estará mutado, compensando por pérdida de afinidad con el antígeno y proporcionando también interacciones potenciales con la VL nueva. Primero la VL-M57=JB está clonada como fragmento VLCL ApaLI-Ascl dentro de presentación de pFab según se describe en el Ejemplo 4; esto proporciona plásmido pVL-M57=JB. La cadena pesada del anticuerpo JA está amplificada a partir de pVH-JA (Ejemplo 2) usando dos cebadores: 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCA GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GG-3' y el complemento inverso de la siguiente secuencia, que es un oligonucleótido mutágeno que se enriquece con mutaciones en los dos residuos que preceden la CDR3 y por toda la región CDR 3 (en la región destacada; véase también Figura 18): 5'-C ACG GCC GTA TAT TGT GCG AAA GAT CGA GAG GGT ACT ATG ATA GTT GTA CTT AAT GGA GGC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CGGG TCA CCG TCT CCT-3'. El enriquecimiento se lleva a cabo por la inclusión durante la síntesis de oligonucleótidos en los residuos subrayados, de mezclas del 90 % del residuo natural y del 10 % de una mezcla con proporciones equimolares de los cuatro residuos. El PCR se lleva a cabo como en el Ejemplo 1 proporcionando un fragmento de 350-400 pares de bases, que está purificado en gel, digerido con Sfil y BstEII y clonado en pVL-M57=JB, formando una biblioteca de variantes de JA, designada Fab-JA-VHmut.

Esta biblioteca se rescata ahora usando fagos coadyuvante y se llevan a cabo selecciones y rastreos en glucoproteína de rabia de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 4. Los clones de Fab resultantes que mantienen unión a antígeno contienen una variante de VH-JA que es compatible para emparejamiento con VL-M57=JB. Los Fab candidatos se producen y se purifican y su afinidad se determina como se describe en el Ejemplo 4. El mutante de cadena pesada variable de la afinidad más alta se designa VH-JA*.

Ejemplo 6. Aislamiento de anticuerpos contra glucoproteína de rabia a partir de una biblioteca de fagos

combinatoria al azar y de rastreo para VL compatible entre clones de unión.

Las bibliotecas de presentación de fagos son una fuente adecuada de anticuerpos para la presente invención. Las bibliotecas que son adecuadas para el ensamblaje de paneles de anticuerpos incluyen bibliotecas no inmunes (de Haard, H.J. y cols. (1999) *J Biol Chem* 274: 18218-18230), bibliotecas semi-sintéticas (de Kruif y cols. (1995) *J. Mol. Biol.* 248: 97 y Griffiths y cols. (1994) *EMBO J.* 13: 3245-3260) y también bibliotecas inmunes, que a menudo presentan un nivel más bajo de diversidad de cadenas variable. La primera aplicación presentada es seleccionar anticuerpos frente a un antígeno solamente, proporcionando una mezcla de anticuerpos dirigidos al mismo antígeno que puede rastrearse para regiones variables compatibles de emparejamiento y usarse produciendo una mezcla de anticuerpos. La segunda aplicación se refiere a la selección de anticuerpos para dos antígenos diferentes. Los procedimientos llevando a cabo selecciones y rastreos se conocen bien en la técnica y se describen también en los Ejemplos 4 y 5. Usando selección de antígenos, se obtienen paneles de fragmentos de anticuerpos específicos para un grupo dado de antígenos. Para cada uno de los paneles se determina la secuencia de VH y VL. Así cada antígeno tendrá un grupo de anticuerpos reactivos. Después es posible identificar por inspección visual en cada uno de los paneles aquellos anticuerpos que comparten una VL dada o que tienen VL altamente relacionadas entre los diferentes conjuntos. Los casos descritos en el Ejemplo 4 son también aplicables aquí. En el mejor caso cada conjunto tiene al menos un anticuerpo con una VL idéntica a al menos otro anticuerpo en los otros conjuntos. Cuando este no es el caso, se encuentra una VL adecuada que se combina con una VH adecuada por los procedimientos descritos en el Ejemplo 4: el VH se empareja con un repertorio de VL, del que se dirige la composición por la homología con una VL dada o con VL dadas. Como alternativa se elige una VL y la VH que no combina se mutageniza según se describe en el Ejemplo 5, proporcionando pares compatibles para todos los conjuntos. Las secuencias se inspeccionan adicionalmente para encontrar regiones variables que no tienen identidad u homología de secuencias. Se identifican cadenas pesadas variables con cadenas ligeras variables múltiples y viceversa. Tales emparejamientos "promiscuos" implican que la región variable involucrada une al mismo antígeno con cualquiera de las varias cadenas compañeras. Para identificar rápidamente tales regiones variables, es particularmente útil usar bibliotecas de anticuerpos semi-sintéticos que tienen un número limitado de posiciones que se diversificaron, como se ha descrito para la biblioteca de anticuerpos de fagos sintéticos humana en Griffiths y cols. (1994) *EMBO J.* 13: 3245-3260.

En la primera aplicación, se seleccionan anticuerpos contra un antígeno, la glucoproteína de rabia. La biblioteca descrita en Griffiths y cols. (1994) *EMBO J.* 13: 3245-3260, está seleccionada en base al antígeno de la glucoproteína de rabia como se describe anteriormente. Hay fuentes diferentes del antígeno, incluyendo el material purificado como en Dietzschold y cols. (1996) *Laboratory Techniques in Rabies*, Eds Meslin, Kaplan and Korpowski. Organización Mundial de la Salud, Génova, página 175. Como alternativa, se usa para el revestimiento una fuente de glucoproteína de rabia (G) recombinante del tipo apropiado. La secuencia de G de rabia está disponible para personas expertas en la técnica y así están las técnicas de clonación, expresión y purificación. Un formato adecuado es usar un tipo inmunoadhesina de moléculas, en el que la parte soluble de la glucoproteína está genéticamente condensada a una región Fc de inmunoglobulina y la proteína de condensación expresada en células eucariotas (véase también Chamow y Ashkenazi, *Antibody Fusion Proteins*, 1999, Wiley-Liss, NY). Para selección de fagos, la inmunoadhesina está biotinilada para usarse en una selección como se describe en el Ejemplo 4, o está inmovilizada por revestimiento. Como alternativa, se llevan a cabo selecciones en viriones de rabia inmovilizados (o biotinilados) y se llevan a cabo selecciones cada ronda sobre viriones derivados de diferentes cepas de rabia, obteniéndose un panel de anticuerpos que reconocen los epítomos más comunes presentes en las diferentes cepas. Estos procedimientos proporcionan un panel de anticuerpos dirigidos contra el antígeno de rabia, a pesar de eso se ha puesto a prueba la compatibilidad del emparejamiento de las regiones variables de los candidatos individuales.

Los autores de la presente invención revelan aquí el uso de anticuerpos a partir de la biblioteca de anticuerpos de fagos descrita en Griffiths y cols. (1994) *EMBO J.* 13: 3245-3260, pero para los clones a partir de otras bibliotecas se aplican los mismos principios. Se identifica un panel de Fab reactivos con la glucoproteína de rabia y se lleva a cabo el procedimiento para hallar combinaciones de VH y VL de emparejamiento óptimo como se describe anteriormente. Como una alternativa, independiente de secuenciación, para identificar pares de VH y VL emparejados óptimamente (que por ejemplo se pierden en análisis de secuenciación), sigue la siguiente aproximación empírica. Las cadenas variables de un panel de 30 anticuerpos humanos se reordenan y las nuevas combinaciones se ponen a prueba en un ensayo de unión. El reordenamiento se lleva a cabo reclonando las cadenas ligeras presentes en los clones de Fab reactivos frente a antígenos que se basan en el plásmido fd-DOG-21ox recombinado, según se corta el fragmento de ApaLI-Ascl dentro de los mismos genomas de fagos que contienen Fab cortados con las mismas (las únicas) enzimas. Este es un experimento que se hace en lote, con todos los 30 insertos de VL y 30 vectores que contienen VH mezclados; la secuenciación se usa delineando el emparejamiento de cada par VH-VL. ELISA se usa definiendo qué anticuerpos retienen unión a antígenos y esos clones se secuencian. Las composiciones resultantes proporcionan VH-VL que son de emparejamiento compatible, la primera clase de las cuales está formada por clones que comparten una VL o una composición relacionada con VL; en ese caso puede escogerse una más los diferentes genes de VH elaborando Oligoclonics™ (véase Ejemplo 10). La segunda clase contiene clones con emparejamiento "promiscuo" y los genes VH de estos están combinados con los pares de VH y VL de aquellos Fab que son compatibles con esta VH tolerante.

La segunda aplicación se refiere a la selección de anticuerpos de fagos en dos antígenos diferentes, como se indica en la Figura 2. Se siguen los mismos procedimientos como se acaban de describir para un antígeno, ahora ensamblando

dos conjuntos de anticuerpos, uno para cada antígeno. Se siguen los mismos procedimientos también identificando clones con una secuencia de región variable idéntica o similar, o empíricamente, demostrando la existencia de anticuerpos compatibles de emparejamiento entre los dos conjuntos de anticuerpos.

Ejemplo 7. Aislamiento de anticuerpos contra glucoproteína de rabia a partir de una biblioteca de fagos con diversidad limitada y anticuerpos de rastreo que son no competitivos.

Las bibliotecas de scFv o de Fab de anticuerpos de fagos que se forman enfocando la diversidad en una región variable y manteniendo la otra región invariable, preferentemente una secuencia de línea germinal, son particularmente relevantes para la invención. A partir de tales bibliotecas es factible aislar anticuerpos con una cadena pesada diferente pero con cadena ligera idéntica, o viceversa (Figura 3). Tales anticuerpos se reformatean adecuadamente en un formato de Oligoclonics™ de acuerdo con la invención. En la técnica, se ha descrito que anticuerpos que tienen el mismo gen de VL pero que tienen diferentes genes de VH y especificidades que varían pueden obtenerse a partir de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos (Nissim y cols., (1994) EMBO J. 13: 692-698).

Se usa una sub-biblioteca de la biblioteca de scFv semisintética (de Kruif y cols. (1995) J. Mol. Biol. 248: 97) en el ejemplo siguiente. Esta sub-biblioteca contiene anticuerpos con diversidad en la región de VH solamente. Las selecciones sobre antígeno se llevan a cabo según se describe en los ejemplos anteriores. Usando glucoproteína de rabia como el antígeno según se describe en el Ejemplo 6, se identifican 10 anticuerpos humanos con VH diferente pero VL idéntica. Estos son inmediatamente adecuados para inclusión en Oligoclonics™ (Ejemplo 10). En algunos casos será favorable identificar aquellos anticuerpos que reconocen epítomos diferentes a partir de los otros anticuerpos en la mezcla, y/o obtener anticuerpos que reconocen el mismo epítomo reconocido por un anticuerpo monoclonal y policlonal dado. La naturaleza competitiva de los 10 anticuerpos de scFv seleccionados con el anticuerpo monoclonal de rabia M57 se determina en ELISA, usando el diseño descrito en el Ejemplo 2 (esencialmente, con antígeno unido, añadiendo muestra y detectando usando un anticuerpo anti-c-myc marcado con HRP) en presencia o ausencia del anticuerpo M57. Los experimentos de competición entre clones se llevan a cabo fácilmente usando ELISA de competición similares con las partículas de fago-scFv y los fragmentos scFv solubles. Además de este procedimiento rastreando clones para un comportamiento de competición particular, también es posible influenciar el resultado de selección, bien usando un anticuerpo bloqueando un sitio del antígeno durante la selección (evitando que los anticuerpos se seleccionen o compitiendo con este epítomo en seleccionarse), o bien usando un anticuerpo eluyendo competitivamente la fracción de anticuerpos de fagos que se unen al mismo epítomo. Se conocen en la técnica ejemplos de ambos y son aplicables aquí procedimientos también definiendo combinaciones de anticuerpos adecuadas para inclusión en la composición de Oligoclonics™.

Ejemplo 8. Aislamiento de anticuerpos de dominio individual contra glucoproteína de rabia a partir de una biblioteca de fagos de VL y emparejamiento con una región variable adecuada.

Los anticuerpos elaborados en dos etapas son también adecuados para la inclusión en el formato de Oligoclonics™ y elaborando mezclas de anticuerpos. Se seleccionan fragmentos de anticuerpos VL de dominio individual específicos de rabia a partir de un repertorio presentado en fagos aislado de PBL humanos y diversificado por reordenamiento de ADN, como se describe en van den Beucken y cols. (2001), J. Mol. Biol. 591-601 (bibliotecas B y C). Se hacen experimentos de selección y de rastreo según se describe en los ejemplos anteriores. Después de la 3ª ronda de selección, se toma la reserva de VL para combinación con un segmento de VH (como se describe en la Figura 4e). Para esto la reserva de VL se reclona por PCR como un fragmento ApaLI-XhoI en presentación pFab (Figura 17) dentro de la que se clona una VH humana individual. La última es una región variable codificada en línea germinal DP-47 con CDR3 corta designada VH-N (SEC. ID. N.º: 14), que se obtiene proporcionando por medio de PCR clon de anticuerpo FITC-B11 a partir de la Tabla IV en Griffiths y cols. (1994) EMBO J. 13:3245-3260, con una CDR3 corta, de 5 residuos de secuencia de aminoácidos GGAVY y clonando esta como fragmento SfiI-BstEII en presentación de pFab. Esta CDR3 se encuentra en muchos anticuerpos diferentes y se elige una secuencia corta con cadenas laterales de longitud mínima (salvo para la tirosina) minimizando efectos sobre unión a antígenos y emparejamiento. La mini-biblioteca resultante se rastrea por aquellos fragmentos Fab de anticuerpos que mantienen unión a antígenos. Los tres genes de VL específicos de glucoproteína de rabia mejores se designan VL-G1, G2 y G3. De forma similar los principios de esta aproximación son aplicables construyendo fragmentos de cadenas pesadas específicas de antígenos basados en el dominio VH y proporcionando estos con una VL "neutra" o incluso con una VH compañera "neutra".

Ejemplo 9. Selección de anticuerpos con regiones de emparejamiento variables compatibles por competición intracelular y expresión de una composición de dos o tres fragmentos Fab con regiones variables compatibles de emparejamiento.

Se llevan a cabo selecciones con bibliotecas de fagos usando anticuerpos monoclonales como competidores durante la formación de partículas de fago nuevas. La selección influye la selección de las bibliotecas hacia pares de regiones variables con emparejamiento compatible en el contexto de múltiples regiones variables que se expresan en la misma célula huésped. El sistema depende de la expresión simultánea de dos o más fragmentos de Fab, la región variable de uno de los cuales está unida sobre una proteína de revestimiento de fagos (Figura 5).

Primero los genes de la región variable del anticuerpo M57 se clonan dentro de pFab-Sol-pbr, un derivado de presentación de pFab (Figura 17) con el mismo poliengarce, pero sin región intergénica gIII y en lugar de pUC119 el armazón pBR322 llevando el gen de resistencia a ampicilina. Los genes de región variable de anticuerpo JB están clonados en pFab-Sol-ACY-cat, similar en diseño a lo anterior pero llevando el gen de resistencia a cloranfenicol y basado en el armazón de pACYC. Ambos plásmidos median la expresión del fragmento Fab no etiquetado soluble sometido al control del promotor lacZ y son así compatibles entre sí y pueden mantenerse en la misma célula con selección de antibióticos. Se han descrito anteriormente procedimientos para la clonación; las secuencias de estos anticuerpos están incluidas también en los listados de secuencias más adelante, así será posible para cualquiera que trabaje en la técnica clonar estos Fab dentro de estos poliengarces de tal forma que tras inducción con IPTG, ambos anticuerpos se expresan en el periplasma del cultivo. Estos dos fragmentos Fab de anticuerpos forman los competidores en este procedimiento. Las células de *E. coli* TG1 que albergan ambos plásmidos están infectadas con fagos que albergan una biblioteca de fragmentos Fab humanos, en los que la cadena pesada está unida al revestimiento de fago y la cadena ligera se proporciona como una cadena soluble, no unida. La biblioteca basada en fd de Griffiths y cols. (1994) EMBO J. 13: 3245-3260 que contiene tanto diversidad de VH como diversidad de VL se usa para infección, la bacteria resultante comienza a producir nuevas partículas de fago e incorpora las cadenas L y Fd expresadas a partir de este genoma. Las células se cultivan a una D.O. de 1.0, las células se lavan retirando el fago producido y las células se incubaron durante 4 horas en IPTG 1 mM. Durante este tiempo tendrá lugar competición para emparejamiento entre las cadenas pesadas y ligeras variables y hay muchas oportunidades para emparejamiento erróneo. El fago producido durante este tiempo de inducción reconocerá solamente el antígeno nativo, si la VH es tolerante para emparejarse con cualquier VL uniendo antígeno todavía, o cuando ella se empareja exclusivamente con la VL que está también codificada en el genoma. El fago se recoge, se precipita con PEG, se disuelve en PBS ahora se selecciona para unión a glucoproteína de rabia. Los procedimientos para selección se han descrito anteriormente. En ambos casos el fago será capaz de unir antígeno y de enriquecerse en una ronda de sección con antígeno. El fago resultante de la selección se usa infectando células que albergan los dos plásmidos que contienen Fab y el ciclo de inducción, preparación de fagos y selección se repite. Después de cinco rondas de esta selección, las proteínas Fab resultantes se ponen a prueba para unión a antígeno en un ELISA de fago sólido y se reclonan dentro de los vectores de expresión soluble pFab-Sol-ACY-cata y pFab-Sol-pbr. *E. coli* se transfectan con uno de estos plásmidos y bien el vector que contiene M57 o bien el vector que contiene JB descrito anteriormente, o ningún vector adicional. Estos cultivos se inducen con IPTG (induciendo expresión de uno o dos fragmentos Fab) y los fragmentos Fab y las mezclas de Fab resultantes se analizan para unión a antígenos en ELISA. Para confirmar el emparejamiento exclusivo o tolerante, los fragmentos Fab se purifican usando IMAC y se prueban en un ensayo de captura con antígeno como se describe en el Ejemplo 2. El par de región variable seleccionado se puede usar adicionalmente construyendo una mezcla Oligoclonics™ bien con genes de región variable de M57 o bien con genes de región variable de JB (pero no conjuntamente), como en procedimiento 10.

Elaborando una mezcla de estos tres anticuerpos, el experimento se repite usando VL-M57=JB de Ejemplo 4 en lugar de las dos cadenas ligeras originales VL-M57 y VL-JB. El resultado de la selección es un número pequeño de pares VH-VL específicos de antígenos de rabia derivados de la biblioteca de fagos. El mejor candidato de acuerdo con afinidad, con regiones variables designadas VH-PO1 y VL-PO1, se pone a prueba adicionalmente como anteriormente confirmando que es compatible para emparejamiento con la VH-57, la VH-JB y la VL-M57=JB. A continuación, los siguientes casetes de expresión se introducen en la misma célula huésped *E. coli* usando los dos plásmidos descritos anteriormente produciendo el Fab competidor, usando procedimientos de clonación familiares para aquellos que trabajan en la técnica: en casete (1), en un plásmido: el VL-M57=JB-CL y VH-CH1 de M57; en casete (2): el VL-M57=JB y VH-CH1 de JB (se proporciona una segunda copia obteniéndose un exceso de cadena ligera para emparejamiento con las dos cadenas pesadas); y en casete (3), en el otro plásmido: el VL-PO1-CL y el VH-PO1-CH1. La inducción con IPTG conduce a la producción de una mezcla de fragmentos Fab con regiones variables emparejadas, que se recupera después usando purificación IMAC. Como alternativa se usa purificación de proteínas G. Usando la unión y otros ensayos descritos en los ejemplos anteriores para anticuerpos de glucoproteína de rabia, se caracteriza la mezcla. Los contenidos de la mezcla dependen de las condiciones de crecimiento e inducción de las bacterias y de las secuencias de aminoácidos primarios de los genes Fab.

Ejemplo 10. Procedimientos para producción de Oligoclonics™ en células eucariotas

Un procedimiento para producir una mezcla de anticuerpos en células eucariotas de acuerdo con la invención, usando expresión en una célula huésped recombinante de múltiples genes VH y VL da como resultado la producción de proteínas VH y VL capaces de emparejamiento formando anticuerpos bivalentes y biespecíficos funcionales, llamados Oligoclonics™, se ejemplifica en el presente documento. El formato general de un vector de expresión eucariótico para anticuerpos monoclonales humanos se muestra en la Figura 19.

Las regiones VH y VL de anticuerpos monoclonales humanos específicos para virus de la rabia por cualquiera de los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores, pueden insertarse dentro de un vector de expresión eucariota que contiene la secuencia líder HATV20 y todas las secuencias codificantes de las regiones constantes de cadenas pesadas (por ejemplo IgG 1) y ligeras (por ejemplo una cadena ligera kappa) esencialmente según se describe (Boel E. y cols. (2000). J. Immunol. Methods, 239: 153-166). En este ejemplo se usan los siguientes genes de región variable optimizados para emparejamiento: VH-M57, VH-JB (genes de región variable no modificados, a partir de Ejemplo 2), VH-JA* (la secuencia optimizada del la VH del anticuerpo JA, a partir de Ejemplo 5) y solamente una cadena ligera,

VL=M57=JB (a partir de Ejemplo 4). Los plásmidos resultantes que codifican cadenas pesada y ligera se transfectan en células eucariotas tales como la línea celular humana PER.C6™ y en ovario de hámster chino (CHO) generando líneas celulares estables que segregan anticuerpos. Para esto, se usan los procedimientos publicados y los procedimientos conocidos por personas expertas en la técnica (Boel E y cols. (2000). *J. Immunol. Methods*, 239: 153-166 y documento WO 00/63403). Para la generación de los anticuerpos que segregan células PER.C6™ estables, las células PER.C6™ se siembran en DMEM más FCS al 10 % y placas de cultivo de tejidos (10 cm de diámetro) o matraces T80 con aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa o matraz y se mantienen durante toda una noche en un incubador a 37 °C y CO₂ al 10 %. Al día siguiente, se llevan a cabo transfecciones en placas separadas a 37 °C usando lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar proporcionados por el fabricante. Los plásmidos que codifican los anticuerpos monoclonales se pueden mezclar en diversas proporciones y se pueden usar a una concentración de 1-10 mg/ml. Como controles, las células están sometidas al procedimiento de transfección en la ausencia de plásmidos.

Después de 4 a 5 horas, se lavan las células dos veces con DMEM y se alimentan con medio de cultivo recién preparado. El día siguiente, el medio de cultivo se retira y las células se alimentan con medio recién preparado conteniendo 500 mg/ml del antibiótico G418. Las células se suministran cada dos o tres días con medio de cultivo conteniendo 500 mg/ml de G418. Después de aproximadamente 20-22 días después de la iniciación del experimento, es visible un gran número de colonias y para cada transfección, se recolectan 300 clones y se cultivan individualmente en placas de 96 pocillos y se expanden adicionalmente en placas de 24 pocillos, 6 pocillos y matraces T25. En esta fase, las células se congelan en nitrógeno líquido y los niveles de producción de inmunoglobulinas recombinantes se determinan en un ELISA de acuerdo con procedimientos estándar (por ejemplo Boel E y cols. (2000). *J. Immunol. Methods*, 239: 153-166 y documento WO 00/63403). En esta fase del procedimiento de cultivo, G418 no se añade más al medio de cultivo.

Estableciendo la presencia de anticuerpos antirrabia en una mezcla, se lleva a cabo un ELISA antirrabia en fase sólida. Para el virus de la rabia ELISA, se purifica la glucoproteína del virus de la rabia de acuerdo con procedimientos estándar (Dietzschold y cols., en: Meslin, F.-X. y cols. eds. *Laboratory techniques in Rabies*. Organización Mundial de la Salud, Génova, página 175). Las placas (PolySorb™, Nunc) están revestidas con 5 mg/ml de glucoproteína diluida en PBS y 150 ml/pocillo. Las placas se bloquean después con leche en polvo al 5 % en PBS y se lavan en PBS conteniendo Tween 20 al 0,05 % (PBS-Tween) antes de la adición de muestras de sobrenadantes. Tras incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, las placas se lavan con PBS-Tween eliminando anticuerpo no ligado en las muestras de sobrenadante. Se añaden anticuerpos secundarios conjugados a enzimas o biotinilados específicos para diversos isotipos de cadena pesada humana durante 1 hora a temperatura ambiente y las placas se lavan subsiguientemente con PBS-Tween. La detección de anticuerpo secundario se lleva a cabo de acuerdo con procedimientos estándar (por ejemplo Champion J.M. y cols. (2000). *J. Immunol. Methods* 235: 81-90); véanse también ejemplos anteriores. Otros procedimientos de análisis se describen en Ejemplos 3, 4 y 12.

A continuación, se demuestra que una línea celular clonal da cuenta de la producción de cada una de la especificidades de unión codificadas por los plásmidos, es decir demostrando que una célula es capaz de producir una mezcla de anticuerpos antirrabia múltiples. Para un número limitado de colonias que segregan una mezcla de anticuerpos monoclonales, se seleccionaron 30 clones a partir del panel inicial de aproximadamente 300, la clonalidad se establece adicionalmente subclonando en condiciones limitantes conocidas por las personas expertas en la técnica. Se sembraron colonias cosechadas y expandidas en una placa de 96 pocillos a una concentración de 0,3 células/pocillo en DMEM con FCS al 10 % y se expandieron. Las colonias de células se procesan como se describe anteriormente y se refirieron como subclones. Los subclones se rastrearán por PCR en ADN genómico por la presencia o ausencia de tres construcciones. Se obtiene confirmación adicional de la presencia de las construcciones por análisis de secuencia de nucleótidos de los productos de PCR.

Para un número representativo de subclones, se cultivan volúmenes más grandes purificando la fracción de IgG 1 humana recombinante usando cromatografía de afinidad de proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG humana purificada a partir de los diversos subclones se analiza subsiguientemente por SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico de acuerdo con protocolos estándar (véanse también Ejemplos 3 y 12).

Los subclones que se muestra que albergan los plásmidos relevantes se llevan a cultivo durante un periodo de tiempo extensivo determinando si la presencia de los plásmidos es estable y si la expresión de la mezcla de anticuerpos sigue siendo la misma, no solamente en términos de niveles de expresión, sino en particular la proporción entre los diversos anticuerpos que se segregan desde la célula. Por lo tanto, el cultivo de subclones se mantiene durante al menos 25 tiempos en los que se dobla la población. A cada 4-6 veces que se dobla la población, se lleva a cabo una prueba de producción usando el ELISA específicos de Ig humanas y se cultivan volúmenes más grandes obteniéndose el sedimento celular y el sobrenadante. El sedimento celular se usa evaluando la presencia de las tres construcciones en el ADN genómico, bien por medio de PCR, bien por prueba de bandas de Southern y/o bien por FISH. El sobrenadante se usa purificando la fracción de Ig humana recombinante según se describe. La Ig humana purificada obtenida en las diversas veces que se dobla la población se analiza y describe subsiguientemente, es decir, por SDS-PAGE, enfocado isoeléctrico (IEF) y unión en el ELISA de inhibición.

Ejemplo 11. Procedimiento para seleccionar compuestos proteináceos específicos de antígeno usando

mezclas de codificar ADN.

Las bases para las mezclas de anticuerpos presentes en Oligoclonics™ son regiones variables de inmunoglobulinas que codifican anticuerpos monoclonales humanos que se han seleccionado por su especificidad, contienen genes de región variable con comportamiento de emparejamiento compatible y son así compatibles con el formato de Oligoclonics™. Por ejemplo, los anticuerpos que están codificados por genes VH diferentes y se unen a los diferentes epítopos pero comparten el mismo gen VL adecuado para el formato de Oligoclonics™. El Ejemplo 7 describe como se obtienen tales anticuerpos.

En este ejemplo, se describen los procedimientos que usan sistemas de expresión eucarióticos obteniendo anticuerpos monoclonales humanos con especificidades deseadas y que comparten el mismo gen VL. Tales repertorios de genes VH humanos se amplifican por PCR a partir de los linfocitos B de individuos humanos y normalmente 10^8 - 10^{10} miembros. El procedimiento lo conocen personas expertas en la técnica y se ha descrito muchas veces en la bibliografía; la amplificación de genes de anticuerpos se ejemplifica también por bibliotecas de V-lambda de seres humanos en Ejemplo 4. La fuente de linfocitos B puede ser un órgano linfóide incluyendo sangre, médula ósea, amígdalas, bazo, nódulo linfático etc. El individuo puede preseleccionarse debido a que se espera que los linfocitos B que producen los anticuerpos de interés están enriquecidos en aquellos individuos debido por ejemplo a una inmunización anterior con un microorganismo o debido a una inmunización anterior, o pueden cosecharse al azar. Los genes VH se pueden usar inalterados en su región codificante o pueden alterarse, particularmente en la región CDR3 introduciendo especificidades novedosas. Tales genes VH se conocen en la técnica como regiones VH sintéticas o semi-sintéticas. Preferentemente, se usan cebadores que amplifican selectivamente miembros de una pocas familias de genes de VH tales como las familias de genes VH3 y VH4 grandes. Los cebadores que amplifican miembros de más familias de genes VH pueden usarse también en procedimientos conocidos por personas expertas en la técnica.

Las regiones VH amplificadas se clonan en el vector de expresión eucariota para anticuerpos monoclonales humanos según se describe en el Ejemplo 10 y según se introduce subsiguientemente en células eucariotas tales como células CHO o células PER.C6. El plásmido de expresión mostrado en el Ejemplo 10 que alberga un gen VL se usa (Figura 7). Hay dos alternativas: (1) el gen VL se cotransfecta con los genes VH en un plásmido separado, o, (2) una aproximación particularmente adecuada cuando solamente una VL necesita expresarse las células eucariotas se transfectan ya con un gen VL humano que se expresa de forma estable. Las células eucariotas se transfectan con el repertorio de genes VH humanos clonado en el vector de expresión eucariota para anticuerpos humanos. Se usan concentraciones de ADN de plásmidos altas transfectando las células eucariotas con el fin de introducir múltiples copias de genes VH en una célula individual. Como un resultado una célula individual producirá anticuerpos múltiples, por ejemplo entre 10-1000 anticuerpos humanos diferentes. En la primera aproximación, las transfecciones son transitorias. En breve para células PER.C6, un matraz de cultivo de tejido de 80 cm² con células se transfectó por incubación durante 4 horas con 140 ml de lipofectamina + 10-1000 mg de ADN plasmídico en medio DMEM libre de suero. Después de 4 horas, el medio se reemplazó con DMEM + FCS al 10 % y las células se cultivan durante todas una noche a 37 °C. Las células se lavan después con PBS y el medio se reemplaza con medio Excell 525 (JRH Bioscience). Las células se siembran a una concentración que da como resultado el crecimiento de aproximadamente 100 células transfectadas/pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Después de 5-6 días, el sobrenadante de cultivo se recoge y se somete a ensayos para la presencia de anticuerpo específico por ELISA en fase sólida. Las células que corresponden a sobrenadantes que puntúan positivamente en ELISA se recogen y los genes de VH se amplifican por PCR. Subsiguientemente, los genes de VH amplificados se clonan en el vector de expresión eucariota para anticuerpos monoclonales humanos, descritos en el Ejemplo 10. Así se obtiene un repertorio restringido de genes VH humanos. En este ejemplo, 100 células que albergan cada una 100 genes de VH producen un máximo de 10^4 genes de VH. Este repertorio se transfecta transitoriamente en PER. Las células C6 que albergan el mismo gen VL usando concentraciones de ADN plasmídico bajas (0,1-1 mg/ml) de tal forma que en promedio una célula individual alberga un gen VH individual y las células transfectadas se plaquean aparte en condiciones tales que solamente dejarán crecer aproximadamente 10 células/pocillo. Después de 5-6 días, los sobrenadantes se rastrearán en ELISA para anticuerpos específicos y las células que corresponden a sobrenadantes positivos se recogen y se usan para amplificación de PCR de los genes VH. En este ejemplo, el número máximo de genes de VH obtenido es aproximadamente 10. Cada gen VH se transfecta por separado en células PER.C6 y el gen VH que codifica la especificidad de anticuerpos deseada se identifica rastreando los sobrenadantes de clones en ELISA.

En una segunda aproximación, la biblioteca inicial de 10^8 - 10^{10} genes VH clonados conjuntamente con un gen VL individual en el plásmido descrito en el Ejemplo 10, se transfecta dentro de células PER.C6 y se plaquean aparte en matraces de cultivo celular T80. Después de 4-6 días, las células se recogen y se mezclan con células sanguíneas rojas revestidas con el antígeno de interés y las células individuales se someten a seguimiento por la secreción de anticuerpos específicos contra el antígeno revestido por el ensayo de placa hemolítica reverso, bien conocido en la técnica (por ejemplo Dammacco F y cols., (1984) Clin Exp Immunol. 57: 743-51). Los linfocitos B que inducen placas se visualizan en un microscopio lumínico y se cosechan con un micromanipulador. La célula PER.C6 individual transfectada se transfiere a un tubo eppendorf, lisado y sometido a PCR de célula individual amplificando los genes de VH. La ventaja de esta aproximación es que se necesitan solamente unas pocas rondas de selección para identificar el gen VH de interés.

En una tercera aproximación, se usan transfectantes estándar. Después de la transfección según se describe anteriormente, grandes colecciones de clones se cultivan esencialmente según se describe en el Ejemplo 10, con la excepción de que los clones no se plaquean aparte sometidos a condiciones de dilución limitantes. En vez de eso, las células después de la transfección se plaquean en placas de microvaloración de tal forma que después de cultivar en el medio selectivo surgen múltiples clones por pocillo (por ejemplo 100 clones celulares por pocillo como se indican en la Figura 7). Cada clon expresa múltiples especies de cadenas pesadas y cada pocillo contiene múltiples clones. El sobrenadante de esos cultivos se pone a prueba para unión a antígenos y los genes VH se enriquecieron adicionalmente en ciclos de PCR, clonación, transfección y rastreo, como se describe anteriormente.

La expresión de anticuerpos múltiples por una célula eucariota transfectada individual se mejora en todas estas aproximaciones introduciendo elementos de ADN antirrepresores en las construcciones plasmídicas para la expresión de anticuerpos monoclonales humanos. Los elementos antirrepresores confieren expresión de alto nivel y estable de proteínas en células de mamífero en una manera dependiente del número de copias (Kwaks y cols. (2003) Nat. Biotechnol 21: 553-558). Los fragmentos de ADN responsables de este efecto se amplifican a partir de los clones descritos en esta citación y se introducen corriente arriba del cadete de expresión de cadena pesada. El elemento antirrepresor humano número 40 (SEC. ID. N.º: 15) se ejemplifica a partir del vector pSDH que contiene el elemento (descrito en Kwaks y cols.), usando oligonucleótidos flanqueantes que también incorporan sitios de restricción adecuados para clonación (5'-GTCCCTAGGAATTCGATCAAGAAA GCACTCCGGG-3' y el complemento inverso de 5'-CCTCATGAT-GTACATTAGAT CGAATTCGTAATACG-3'). En este ejemplo EcoRI (GAATTC) que no está presente en este segmento, se anexa en ambos extremos del segmento en una reacción de PCR y el fragmento digerido con EcoRI y clonado dentro de plásmido aceptor digerido con EcoRI. En este ejemplo el último es un plásmido quimérico de VHExpress y VExpress, que es una composición hecha clonando el plásmido VHExpress (Figura 15), cortado con KpnI y EcoRI e insertando el casete de expresión de VK que se digiere con las mismas enzimas (descritas en Persic y cols. (1997) 187: 9-18). El plásmido resultante, pABExpress40 contiene tanto casetes de cadena pesada como de cadena ligera con su orientación transcripcional respectiva en direcciones opuestas y el elemento antirrepresor posicionado en el medio de las dos unidades de transcripción. Un mapa esquemático del plásmido se muestra en la Figura 22. Este plásmido, pABExpress40 se usa primero en la clonación del gen único VL elegido (usando sitios de clonación ApaLI y PacI), dando como resultado pABExpress40-VL. Este plásmido se usa recibiendo el repertorio VH descrito anteriormente (como fragmento BssHII-BstEII) (todos estos 4 sitios son únicos en pABExpress40 y pABExpress40-VL). La clonación del repertorio se lleva a cabo según se describe por el repertorio de lambda en el Ejemplo 4, usando en la PCR de ADN cebado por IgM un grupo de 9 oligonucleótidos marcados "VH-traseros" y la mezcla de 4 oligonucleótidos "VH delanteros" descritos en la Tabla 1 de de Haard, H.J. y cols. (1999) J. Biol. Chem. 274: 18218-18230. El material se re-amplifica usando variantes de los 9 oligonucleótidos anexados con 5'-TATC CGC GCG CAC TCC-.. y con la misma mezcla de VH delanteros el producto se digiere con BssHII y BstEII y se clona en pABExpress40-VL. La biblioteca se usa subsiguientemente como se describe en los ejemplos anteriores aislando paneles de clones de unión a antígeno. De forma similar el vector se usa construyendo el plásmido de expresión para grupos dados de anticuerpos, tales como los descritos en el Ejemplo 10, confirmando adicionalmente que los genes de región variable flanqueantes facilitan por elementos antirrepresores la producción eficiente y estable de múltiples anticuerpos por una célula individual.

Ejemplo 12. Recuperación y análisis de mezclas de anticuerpos usando ELISA incluyendo el uso de los mimotopos de anti-idiotipos y péptidos.

Las mezclas de anticuerpos que contienen receptores Fc se recuperan como se indica en el Ejemplo 3 usando cromatografía de afinidad de la proteína A. Los fragmentos de anticuerpos con etiquetas de histidina se aíslan usando IMAC según se describe en el Ejemplo 2.

Las mezclas de proteínas resultantes se analizan como sigue. En el primer caso los autores de la presente invención consideran el caso de una mezcla de anticuerpos compuesta de diferentes sitios de unión dirigidos al mismo antígeno diana, con todos los anticuerpos siendo el mismo isotipo, llevando la misma cadena luminica y conteniendo la mezcla tanto anticuerpos de tipo IgG biespecíficos monovalentes como monoespecíficos bivalentes. Los siguientes procedimientos están disponibles para analizar la mezcla. Los genes de región variable de cadena pesada proporcionarán diferentes composiciones aminoácidas y permiten el siguiente análisis no dependiente de antígeno: (1) Análisis de gel enfocado isoelectrico: este análisis depende de un valor de pI diferente para las diversas formas de los anticuerpos. En una mezcla de dos IgG y una biespecífica, estas tres moléculas presentarán cada una un punto isoelectrico único. Las proteínas con un pI diferente se separan por medio de electroforesis en un gradiente de pH. El procedimiento es semicuantitativo. Si dos proteínas del complejo tienen solamente una diferencia mínima en su valor pI, será difícil separarlas usando esta prueba y se usan las otras pruebas citadas. (2) Análisis de espectrometría: este análisis depende de la composición diferencial de la región VH, que, después de la digestión con enzimas proteolíticas, proporciona un espectro único de péptidos en análisis de espectrometría de masas. Este procedimiento es predominantemente cualitativo. (3) Análisis de unión basada en anticuerpos anti-idiotípicos en peptidomiméticos: este análisis requiere la disponibilidad de reactivos que reconocen específicamente un sitio de unión de anticuerpos en presencia otros sitios de unión en la mezcla. Adecuados para este análisis son anticuerpos antiidiotípicos que reconocen únicamente el idiotipo del anticuerpo. En este ejemplo donde los anticuerpos presentan una cadena ligera común, las características únicas del idiotipo se forman principalmente por los determinantes de la cadena pesada. Los anticuerpos antiidiotípicos se seleccionan usando los anticuerpos monoclonales individuales como antígeno en

una selección de una biblioteca de anticuerpos presentada en fagos grandes usando procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Se usa normalmente una biblioteca de anticuerpos no inmune (de Haard, H.J. y cols. (1999) J Biol Chem 274: 18218-18230), que proporciona fragmentos Fab y una biblioteca de anticuerpos de fagos semisintéticos (de Kruif y cols. (1995) J. Mol. Biol. 248: 97). Los anticuerpos antiidiotípicos se seleccionan de anticuerpos M57 y anticuerpos JB a partir de la biblioteca de anticuerpos no inmunitaria citada. Usando rastreo de ELISA de los anticuerpos de fagos seleccionados de estos dos anticuerpos monoclonales usados para la selección, se identifican anticuerpos anti-idiotípicos que son los únicos que reconocen uno de los dos sitios de unión. Los reactivos Fab y scFv respectivos seleccionados a partir de esta biblioteca, se expresan como fragmentos de anticuerpos y se purifican usando procedimientos estándar, por ejemplo descritos en estas citas y en "Antibody Engineering (2001), Eds. Kontermann and Dubel, Springer Lab Manual) y se describen en el Ejemplo 2 para los anticuerpos scFv. Los fragmentos se usan en ELISA determinando que idiotipo está presente en la mezcla, lo que se lleva a cabo en un ensayo cuantitativo. Los anticuerpos anti-idiotípicos específicos para los sitios de unión de M57 y JB se usan también en experimentos de competición de virus con la preparación de Oligoclonics™ hecha en el Ejemplo 10, delineando la contribución de un sitio de unión individual a la actividad biológica de la mezcla de anticuerpos. Como alternativa, los anticuerpos monoclonales se usan derivando péptidos asociados con idiotipos, péptidos lineales o conformaciones derivados de la secuencia del antígeno y aún reactivos con el anticuerpo, por ejemplo por medio de análisis PepScan, según se demostró para el anticuerpo neutralizador del virus de la rabia MAb 6-15C4 (van der Heijden y cols. (1993), J. Gen. Virol. 74: 1539-45. Una alternativa es aislar mimotopos peptídicos, con secuencias no relacionadas con el antígeno original pero con unión específica a las regiones variables del anticuerpo. Dado que la reacción es específica para un anticuerpo dado en el contexto de los otros anticuerpos en la mezcla, tales péptidos son también adecuados para un análisis específico de la mezcla de anticuerpos. Los péptidos con tal reactividad única para un anticuerpo dado se seleccionan a partir de las bibliotecas peptídicas de presentación de fagos usando procedimientos esencialmente similares a aquellos para bibliotecas de anticuerpos de fagos. El ensayo de unión con los anticuerpos antiidiotípicos y mimotopos peptídicos es cualitativamente o cuantitativamente y una gran serie de ensayos de unión es factible, incluyendo ELISA, RIA, análisis de citometría de flujo, BIAcore etc.

Los autores de la presente invención también describen el análisis de una mezcla Oligoclonics™ que comprende anticuerpos múltiples, en la que cada uno de los anticuerpos originales se une a un antígeno diferente. Esto se parece a la situación en la que los anticuerpos reconocen el mismo antígeno o diana y los reactivos anti-idiotípicos o peptidomiméticos están disponibles. El análisis de especificidades múltiples en una mezcla se lleva a cabo como sigue, manteniendo en mente que antígeno es sinónimo de anti-idiotipo. La reactividad a antígenos individuales se pone a prueba en ELISA en todos los antígenos por separado, con ensayos estandarizados usando los anticuerpos monoclonales y el ensayo de ELISA de IgG cuantitativo. El antígeno está recubierto directa o indirectamente, la placas se incuban con la mezcla de anticuerpos y el anticuerpo unido se detecta con un reactivo anti-IgG. Esto conduce a una actividad "específica" de la preparación, que es una reactividad en unidades relativas de actividad por cantidad de anticuerpo. La cantidad de anticuerpo específico en la mezcla se determina usando un ensayo en sándwich con un antígeno revestido y un segundo antígeno, preferentemente marcado con HRP, fosfatasa alcalina o biotina, o detectable usando otro anticuerpo específico para este antígeno, proporcionado a la placa después de que la mezcla de anticuerpos se incubó con el primer antígeno.

Si los anticuerpos presentes en la mezcla Oligoclonics™ están uniendo diferentes dianas o diferentes epítopos en la misma diana de tal forma que son no competitivos, esta característica se puede usar en un ELISA de inhibición determinando la presencia de los diferentes anticuerpos en las mezclas producidas por las líneas de células clonales transfectadas. Considerar una Oligoclonics™ elaborada de acuerdo con los procedimientos de los ejemplos anteriores usando los anticuerpos específicos para la glucoproteína de rabia aislada en el Ejemplo 7 (que son no competitivos). Para el ELISA de inhibición, se usan los mismos procedimientos según se describen para el ELISA antirrabia estándar según se describe anteriormente con algunas modificaciones. La mezcla Oligoclonics™ producida por una línea celular clonal se caracteriza como sigue. Antes de la adición a los pocillos revestidos con glucoproteína de rabia, los sobrenadantes de la línea celular clonal transfectada se diluyen con un volumen igual de un anticuerpo monoclonal de rabia biotinilada usada elaborando la mezcla. El anticuerpo monoclonal de la rabia biotinilada se añade en diversas concentraciones, variando desde 0,1 hasta 10 mg/ml. La unión del anticuerpo monoclonal biotinilado a la glucoproteína de rabia revestida se inhibe cuando el mismo anticuerpo no biotinilado está presente en la mezcla producida por la línea células clonal. La unión del anticuerpo biotinilado se visualiza con estreptavidina, conjugada a una enzima. Como un control para unión y grado de inhibición, se usan en el ELISA de inhibición diversas concentraciones de los anticuerpos monoclonales biotinilados diluidos con un volumen igual de medio de cultivo sin la mezcla de anticuerpos o usando el anticuerpo no biotinilado. Este procedimiento también es adecuado rastreando la mezcla de anticuerpos en una fase muy temprana después de transfección (como en los Ejemplos 10 y 11): así, para cada sobrenadante que contiene mezclas de anticuerpos, se puede determinar la presencia de especificidades de anticuerpos individuales.

Ejemplo 13. Expresión de tres fragmentos Fab en la misma célula eucariota.

Haciendo una mezcla de estos tres anticuerpos, el experimento de expresión descrito en el Ejemplo 10 se repite usando los siguientes genes de anticuerpos, del anticuerpo M57, JB y PO1 (el último está formado por los genes VH-PO1 y VL-PO1 de Ejemplo 9). Los reactivos antiidiotípicos están seleccionados por separado en los anticuerpos completos M57 y JB usando una biblioteca de anticuerpos no inmunes (véase también Ejemplo 12). Esto proporciona anticuerpos anti-idiotípicos que reaccionan bien con M57 o bien con JB; estos anticuerpos se ponen a prueba también

en el PO1 confirmando especificidad bien para idiotipos M57 o bien para idiotipos JB. De forma similar, el anticuerpo PO1 se usa en selecciones similares obteniéndose un reactivo anti-Id para el sitio de unión a PO1. A continuación, las cadenas pesadas de estos tres anticuerpos M57, JB y PO1, se clonan como fragmentos VHCH1 en VExpress mientras que eliminan el gen gamma-1 (codificando así una cadena de Fd solamente), proporcionando pEU-VH-M57, pEU-VH-JB y pEU-VH-PO1. Las cadenas ligeras VL-M57=JB-CL y VL-PO1-CL se clonan en Vexpress (Persic y cols. (1997) 187: 9-18), eliminando mientras el gen CK de la casete. Primero los plásmidos de cadena ligera se introducen en células PER.C6 y se selecciona un clon que produce de forma estable por encima de 2 microgramos/ml de ambas cadenas ligeras (usando procedimientos descritos en el Ejemplo 10). Esta línea celular, designada PL2-2, se transfecta subsiguientemente con los plásmidos que contienen las tres cadenas pesadas y se obtiene una gran colección de líneas celulares que producen diversos niveles de cadenas L y Fd de anticuerpos. Las mezclas candidatas mejores se purifican en cromatografía de afinidad de proteínas G y se ponen a prueba para unión y composición como se describe en los ejemplos anteriores y también usando los reactivos anti-Id como se describen en el Ejemplo 12. Los experimentos proporcionan confirmación de que fragmentos Fab múltiples, con genes de regiones variables apropiadamente emparejados, se expresan como mezclas altamente funcionales.

Ejemplo 14. Clonación y expresión de tres anticuerpos dirigidos a diferentes antígenos como una mezcla Oligoclonics™.

Usando los procedimientos de los ejemplos anteriores, los anticuerpos con la misma cadena ligera se aíslan frente a tres antígenos diferentes, TNF-alfa, interleucina-1beta (IL-1beta) e interleucina-6 (IL-6), usando una biblioteca semisintética de scFv del Ejemplo 7 y descrita en (de Kruif y cols. (1995) J. Mol. Biol. 248: 97). En la selección, las citocinas recombinantes biotiniladas (adquiridas de R&D systems), se usan, a concentraciones decrecientes durante la selección (250 nM, 100 nM y 50 nM). A partir de los paneles de anticuerpos generados contra cada una de las dianas después de tres rondas de selección, se identifican aquellos anticuerpos scFv que neutralizan la actividad de la citocina. Para esto los fragmentos de anticuerpos se reclonan en pSCFV y se purifican usando IMAC como en el Ejemplo 2. Los ensayos biológicos usados se conocen bien por aquellos expertos en la técnica e incluyen un ensayo de neutralización L929 para TNF-alfa. Los clones neutralizantes se identifican contra TNF-alfa, IL-1beta o IL-6. La potencia de neutralización puede mejorarse por técnicas de maduración de afinidad adicionales. Por ejemplo las CDR1 y CDR2 de la VH pueden mutagenizarse y las variantes pueden seleccionarse usando presentación de fagos y ponerse a prueba para actividad de neutralización mejorada. Estos tres anticuerpos tienen una cadena ligera idéntica y tienen regiones variables de cadena pesada que son distintas entre sí, con la mayoría de los cambios localizados en la CDR3.

Las regiones variables de anticuerpos se clonan en la expresión eucariótica descrita en el Ejemplo 10 y siguiendo esencialmente el mismo procedimiento, se identifican líneas de células CHO que expresan mezcla de una cadena ligera y tres cadenas pesadas. El análisis de las mezclas se lleva a cabo usando ELISA demostrando unión a tres antígenos en un subgrupo de las líneas celulares identificadas. Un clon que produce establemente todos los tres anticuerpos en una proporción aproximada de cadenas pesadas de 2:1:1 se identifica usando las técnicas descritas en Ejemplos 10 y 12. Las líneas celulares se expanden y la mezcla se purifica en la Proteína A y se pone a prueba extensamente determinando su composición. Usando ensayos de ELISA en diversos formatos, con antígeno biotinilado revestido indirectamente, con antígeno 1 revestido directamente, añadiendo muestra, seguido por antígeno 2 biotinilado y por detección con Strep-HRP y usando muestras de la mezcla que se han deplecionado en perlas revestidas con TNF, IL-1beta o IL-6, se muestra que la mezcla contiene tres anticuerpos monoespecíficos y tres anticuerpos biespecíficos. La proporción exacta entre estos seis componentes se establece usando pruebas de ELISA cuantitativas y por análisis IEF de la mezcla, como se muestra en el Ejemplo 12. La eficacia de neutralización de la mezcla para las citocinas individuales se confirma por los ensayos según se pusieron a prueba anteriormente. La neutralización de estas citocinas en sistemas más complejos, por ejemplo usando poblaciones de células mezcladas, puede establecer un efecto sinérgico sobre la neutralización de estos componentes por la mezcla Oligoclonics™.

Ejemplo 15. Emparejamiento in vitro de cadenas de anticuerpos producidas en células diferentes para formar mezclas de anticuerpos definidas.

Como alternativa a la expresión en una célula huésped, la mezcla de anticuerpos se puede ensamblar ex vivo. Las cadenas se pueden expresar separadamente y se pueden combinar con un conjunto de regiones variables compañeras potenciales emparejando un ensamblado de la molécula.

En este ejemplo profético, se puede hacer una mezcla de fragmentos Fab con regiones variables compatibles de emparejamiento como sigue. Las regiones variables de cadena pesada de M57, JB y PO1 (Ejemplo 9) se clonarán primero por separado dentro de un plásmido de expresión apropiada pET, de tal forma que esto mediará la expresión de la cadena Fd etiquetada con 6 histidinas dentro de la E. coli, como cuerpos de inclusión. Se puede encontrar un vector adecuado en la Tabla de pET de Novagen, tal como pET21d+ (véase también <http://www.novagen.com/Includes/wrapper.asp?href=/SharedImages/Novagen/pETtable.htm§ion=TechResources&subsection=TechLit&strsubsection=techresources>). La clonación se llevará a cabo después por PCR de las plantillas que contienen VHCR1 (de Ejemplo 9) usando oligonucleótidos proporcionando sitios de clonación apropiados y también la etiqueta de histidina C-terminal. Estos tres plásmidos se introducirán en células huésped de E. coli aparte. La expresión de los fármacos Fd se puede inducir después y la proteína demuestra estar presente en

cuerpos de inclusión. Las dos regiones variables de cadena ligera, VL-M57=JB y VL-PO1 puede clonarse adecuadamente también en un vector pET adecuado (aunque como alternativa podría obtenerse por secreción a partir de un vector de secreción como pFab-sol-pbr). Después de expresión de las cadenas ligeras separadas, deberían ser también recuperables a partir de la fracción intracelular. Ensamblando la mezcla de tres fragmentos Fab funcionales, se puede seguir el siguiente procedimiento. Primero las cantidades aproximadas y relativas de las cadenas L o Fd individuales se estiman por electroforesis de gel y prueba de bandas de Western. Después se cultivan cinco cultivos de 50 ml de E. coli que llevan una de cinco regiones variables de anticuerpos y se inducen como se describe en el manual pET de Novagen. Después de inducción y crecimiento, las células sedimentadas de cada una de las cadenas se pueden resuspender en 8 ml de urea 8 M (en PBS). Después de sonicación, las cinco suspensiones se mezclarían en una proporción de aproximadamente 1:1:1:4:2 para VH-M57, VH-JB, VH-PO1, VL-M57=JB, VL-PO1 (así con un exceso de 2 veces la cadena ligera por encima de la cadena pesada y más de las VL necesitadas dos veces). Después de esta mezcla de las regiones variables de cadena pesada y ligera desnaturalizadas, la mezcla se rotará cabeza con cabeza durante 2 horas. El material insoluble puede retirarse después por centrifugación durante 30 minutos a 13.000 x g. El sobrenadante se dializa contra PBS con cuatro cambios de tampón y la proteína insoluble se retira adicionalmente por centrifugación. El flujo a lo largo de la fracción, obtenido por filtración a través de una membrana 0,2 mm, debería contener la mezcla de anticuerpo replegado con cadenas optimizadoras de emparejamiento. La mezcla se puede concentrar y purificar adicionalmente, usando primero IMAC, que debería recuperar todas las cadenas pesadas y sus cadenas ligeras emparejadas, seguidas por filtración en gel semipreparativa en una columna Superdex 75HR (Pharmacia). El rendimiento se puede determinar midiendo la densidad óptica a 280 nm (usando un coeficiente de extinción molar de 13 para Fab). La mezcla puede estar caracterizada adicionalmente analizando la unión del antígeno de la rabia. Dado que todos los Fab funcionales deberían unir este antígeno, se puede llevar a cabo un ensayo de captura sencillo con antígeno que se puede llevar a cabo determinando el nivel de sitios de unión funcionales. Hay muchos protocolos alternativos a este procedimiento, incluyendo el uso de otros procedimientos de extracción, otros agentes de desnaturalización y tampones, etc. Como alternativa a este procedimiento, se pueden segregar también ambas cadenas y reensamblarse usando las condiciones descritas por Figini y cols. (1994) J. Mol Biol. 239: 68-78.

Ejemplo 16. Mezclas de anticuerpos de rastreo que tienen como diana factor de crecimiento endotelial.

Los anticuerpos usados en este ejemplo se describen en el documento WO 03102157A2 (autores de la invención Fuh y Sidhu). Los anticuerpos se derivaron por selección in vitro de una biblioteca de presentación en la que solamente se diversificó la cadena pesada. El repertorio con una cadena ligera fija y con cadena pesada variable se seleccionó sobre factor de crecimiento endotelial vascular murino (mVEGF) y un panel grande de unión a anticuerpos mVEGF identificado (Sidhu y cols., J Mol Biol 2004, 338: 299-310). La fuente de genes de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpos usados en el repertorio fue el anticuerpo humanizado 4D5. El anticuerpo 4D5 es un anticuerpo humanizado específico para un antígeno asociada a cáncer conocido como Her-2 (erbB2). El anticuerpo incluye dominios variables que tienen regiones estructurales consenso; unas pocas posiciones se revirtieron a la secuencia de ratón durante el procedimiento de incremento de afinidad del anticuerpo humanizado. La secuencia y la estructura cristalina de anticuerpo humanizado 4D5 se ha descrito en el documento de los EE.UU. 6.054.297, Carter y cols., PNAS 54: 4285 (1992); las secuencias de región variable de las cadenas pesadas y ligeras se dan también en la Figura 14 y en la SEC. ID N.º: 23 del documento WO 03102157A2; finalmente la estructura cristalina de 4D5 se muestra en J Mol. Biol. 229: 969 (1993) y en Internet en www.ncbi.nih.gov/structure, estructura 1FVE.

Una mezcla Oligoclonics™ constituida por 4 sitios de unión a anticuerpos que unen mVEGF se obtiene como sigue. Anticuerpos con números de clones 4, 69, 73 y 74 como en Tabla 6, página 306 de (Sidhu y cols., J Mol Biol 2004, 338: 299-310), se seleccionaron sobre la base de unión de mVEGF como scFv en fagos y como proteína Fab (misma Tabla 6). Los anticuerpos comparten una cadena ligera idéntica (del anticuerpo herceptina, 4D5; como se describe en el documento WO 03102157A2), pero tienen diferencias en su secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se representa en la Tabla 6 de esta publicación.

El anticuerpo h4D5 es un anticuerpo humanizado que reconoce específicamente un antígeno asociado a cáncer tal como HER-2 (ErbB2) desarrollado como se describe anteriormente. El gen de VL de h4d5 se obtiene por reacción en cadena de la polimerasa usando el la secuencia humAb4D5 versión 8 ("humAMD5-8"; Carter y cols., (1 992) PNAS 89: 4285-4289) y cebadores manipulados dando lugar a un sitio 5' ApaI y a un sitio 3' PacI en el producto de PCR. El producto de PCR se escindió con ApaI y PacI y se ligó en el vector pABExpress (el vector descrito en el Ejemplo 11 y en la Figura 23 pero sin la secuencia STAR40 clonada en el sitio EcoRI). Esto proporciona plásmido pAb-4D5-VL, que codifica la expresión de una cadena ligera 4D5 funcional (con región Ckappa constante humana) y contiene una región de poliengarce adecuada clonando regiones VH. Las regiones VH de clones 4, 69, 73 y 74 se clonan después en este vector, usando sitios de restricción BssHII y BstEII y siguiendo la ruta de clonación descrita en los ejemplos anteriores (proporcionando los nucleótidos que codifican estos sitios de restricción dentro de los cebadores de PCR de tal manera que la clonación proporcionará una inserción en fase que codifica un dominio variable de anticuerpo totalmente funcional). Esto proporciona plásmidos pAb-IgG-04, pAb-IgG-69, pAb-IgG-73 y pAb-IgG-74.

Estos plásmidos que codifican cadenas pesadas y ligeras se transfectan en la línea celular humana PER.C6™ generando líneas celulares estables que segregan múltiples de los anticuerpos de unión a mVEGF. Para esto, se usan los procedimientos publicados y los procedimientos conocidos por personas expertas en la técnica (Boel E y cols.

(2000). J. Immunol. Methods, 239: 153-166 y documento WO 00/63403). Para la generación de los anticuerpos que segregan células PER.C6™ estables, las células PER.C6™ se siembran en DMEM más FCS al 10 % y placas de cultivo de tejidos (10 cm de diámetro) o matraces T80 con aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa o matraz y se mantienen durante toda una noche en un incubador a 37 °C y CO₂ al 10 %. Al día siguiente, se llevan a cabo transfecciones en placas separadas a 37 °C usando lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar proporcionados por el fabricante. Los plásmidos pAb-IgG-04, pAb-IgG-69, pAb-IgG-73 y pAb-IgG-74 se mezclan en proporciones 1:1:1:1 y se usan a una concentración de 2,5 mg/ml cada uno. Como controles, las células se someten a procedimiento de transfección en ausencia de plásmidos, o con justo un plásmido individual. Después de 4 a 5 horas, se lavan las células dos veces con DMEM y se alimentan con medio de cultivo recién preparado. El día siguiente, el medio de cultivo se retira y las células se alimentan con medio recién preparado conteniendo 500 mg/ml del antibiótico G418. Las células se suministran cada dos o tres días con medio de cultivo conteniendo 500 mg/ml de G418. Después de aproximadamente 20-22 días después de la iniciación del experimento, es visible un gran número de colonias y para cada transfección, se recolectan 400 clones y se cultivan individualmente en placas de 96 pocillos y se expanden adicionalmente en placas de 24 pocillos, 6 pocillos y matraces T25. En esta fase, las células se congelan en nitrógeno líquido y los niveles de producción de inmunoglobulinas recombinantes se determinan en un ELISA de acuerdo con procedimientos estándar (por ejemplo Boel E y cols. (2000). J. Immunol. Methods, 239: 153-166 y documento WO 00/63403). En esta fase del procedimiento de cultivo, G418 no se añade más al medio de cultivo.

Para establecer la presencia de al menos un anticuerpo funcional anti-mVEGF en un sobrenadante de cultivo de clon, se lleva a cabo un ELISA en fase sólida. Las placas (PolySorb™, Nunc) están revestidas con 2,5 mg/ml de mVEGF (R&D Systems, ratón recombinante VEGF120 y VEGF164, ambos libres de vehículos) diluido en PBS y 100 ml/pocillo durante toda una noche a 4 °C. Las placas se bloquean con BSA al 2 % en PBS durante 2 horas y se lavaron en PBS conteniendo Tween20 al 0,05 % (PBS-Tween) antes de la adición de muestras de sobrenadantes celulares conteniendo anticuerpos. Tras incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, las placas se lavan con PBS-Tween eliminando anticuerpo no ligado en las muestras de sobrenadante. Se añade después IgG antihumana conjugada con peroxidasa de rábano picante en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y las placas se lavan subsiguientemente con PBS-Tween (2x) y PBS (2x). Se lleva a cabo detección de anticuerpo secundario de acuerdo con procedimientos estándar y la absorbancia se determina espectrofotométricamente (véanse también ejemplos anteriores). Se encuentra que de los 400 clones rastreados, una fracción sustancial produce una cantidad de IgG mínima.

Dado que solamente un número limitado de colonias segregan una mezcla de los 4 anticuerpos mVEGF, 50 clones seleccionados a partir del panel inicial de aproximadamente 400, que son fuertemente reactivos en el ELISA de IgG, la clonalidad se establece adicionalmente subclonando en dilución limitante. Se siembran colonias cosechadas y expandidas en una placa de 96 pocillos a una concentración de 0,3 células/pocillo en DMEM con FCS al 10 % y se expandieron. Las colonias de células se procesan como se describe anteriormente y se refirieron como subclones. Mientras que el experimento de transfección inicial usada usó una proporción de ADN para los 4 plásmidos pAb-IgG-04, pAb-IgG-69, pAb-IgG-73 y pAb-IgG-74 de 1:1:1:1, los subclones celulares aún presentan una diversidad en los niveles de expresión de cada uno de los anticuerpos. Esto se debe a su regulación de expresión independiente y a su integración al azar en el genoma. Adicionalmente, dado que el mismo marcador de selección se usa en todos los plásmidos, los subclones expresan como máximo 4 sitios de unión a anticuerpos, pero no necesariamente todos los 4 de ellos. El número preciso depende del experimento de transfección; aproximadamente el 20-30 % de los clones reactivos expresan cadenas pesadas de anticuerpos múltiples y de estos, aproximadamente el 20 % expresan más de 2 cadenas pesadas de anticuerpos. Se ha descrito un procedimiento para incrementar estas frecuencias anteriormente en el presente documento.

El rastreo para encontrar la mezcla más íntima de estos 4 anticuerpos de unión a mVEGF, como mezcla Oligoclonics™ con componentes bivalentes y biespecíficos, se hace como sigue. Mezcla óptima aquí significa mezcla con respecto a la que los 4 sitios de unión de anticuerpos están óptimamente presentes en la mezcla y en la proporción en la que deberían estar presentes. Para los 50 subclones así como para un clon reactivo a IgG a partir de los transfectantes de control hechos justo con un plásmido que codifica un anticuerpo, se cultivan volúmenes mayores purificando la fracción IgG 1 recombinante del sobrenadante condicionado. Esto se hace usando cromatografía en columna de afinidad de proteína A de acuerdo con los procedimientos estándar (Ed Harlow y David Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, 1999, ISBN: 0879695447). Estas mezclas y los controles de anticuerpos monoclonales se prueban para su actividad de neutralización en mVEGF en un ensayo de incorporación de ³H-timidina usando células endoteliales de venas umbilicales humanas (Conn y cols., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 1323-1327). La afinidad inhibidora de cada una de las mezclas se compara con la capacidad inhibidora de los 4 anticuerpos monoclonales individuales. Las mezclas que presentan un actividad inhibidora más alta sobre una base molar comparada con la actividad de los controles de anticuerpos monoclonales contienen teóricamente anticuerpos múltiples que en combinación median un efecto sinérgico sobre la actividad de VEGF. Se usan los siguientes ensayos que indican la unión de mVEGF, la afinidad de la interacción de la mezcla, la competición en unión con receptor (Flt-1 y KDR-1). Se describe anteriormente un ensayo de unión (ELISA en fase sólida). Los ensayos para determinar la afinidad relativa de las mezclas se describen en Sidhu y cols., J Mol Biol 2004, 338:299-310, página 308 (medidas de afinidad por ELISA competitivo), con Fab y anticuerpos presentados en fagos reemplazados con las mezclas de anticuerpos o con los anticuerpos monoclonales como controles. Un incremento en afinidad relativa indica una

actividad sinérgica fuerte entre los anticuerpos en la mezcla, como se describe en Marks, *Movelent Disorders*, vol. 19, supl. 8, 2004, páginas S101-S108, para unión de mezclas de anticuerpos a epítopos no solapantes de neurotoxinas botulínicas. Otros ensayos para demostrar la actividad de la mezcla de los anticuerpos en VEGF bien *in vivo* o bien *in vitro*, están bien establecidos en el campo y se describen por ejemplo en los documentos WO 03102157A2, EP 0666868B1 y WO0044777A1.

Dado que VEGF presenta actividades en muchos procesos, incluyendo mutagénesis, angiogénesis, supervivencia de células endoteliales, inducción de metaloproteasas y factores de crecimiento, regulación de permeabilidad/flujo, reclutamiento de células progenitoras endoteliales etc., cualesquiera otros ensayos individuales o combinaciones de ensayos se pueden usar determinando el efecto de las mezclas de anticuerpos sobre la actividad de VEGF. Las mezclas de anticuerpos se pueden rastrear en cualquiera de estos ensayos, encontrando aquellas composiciones que tienen un efecto en un conjunto de ensayos definido, o que tienen un efecto en uno pero no en otro ensayo. Adicionalmente o en lugar de los ensayos *in vitro*, se pueden usar ensayos *in vivo* midiendo el efecto general de la mezcla de anticuerpos en las propiedades farmacocinéticas de los antígenos y demostrar eliminación mejorada como mecanismo de la actividad sinérgica de los anticuerpos múltiples en la mezcla Oligoclonics™.

Las mezclas se caracterizan adicionalmente bioquímicamente encontrando qué anticuerpos están presentes y en qué proporción, como se describe en el Ejemplo 12.

Ejemplo 17: Emparejar anticuerpos compatibles para produciendo una mezcla de moléculas que tienen como diana HER2/ErbB2

Trastuzumab (herceptina, o h4D5, o hu4D5, véase Ejemplo 16) y pertuzumab (Omnitarg, 2C4 humanizado) son ambos anticuerpos monoclonales recombinantes que tienen como diana diferentes regiones extracelulares del receptor de tirosina cinasa HER-2. Recientemente se muestra que estos anticuerpos inhiben sinérgicamente la supervivencia de las células del cáncer de mama *in vitro* (Nahta y cols., *Cancer Research* 64, 2343-2346, 2004). La herceptina es activa frente a HER-2 que sobreexpresa cánceres de mama metastáticos, conduciendo a su aprobación en 1998 por la FDA de los EE.UU. En contraste con herceptina, pertuzumab bloquea estéricamente dimerización de HER-2 con otros receptores de HER y bloquea señalización activada por ligando a partir de heterodímeros HER-2/EGFR y HER-2/HER-3. Por otro lado, trastuzumab bloquea liberación de ErbB2 mientras que pertuzumab no lo hace. Las mezclas de anticuerpos dirigidos al mismo antígeno diana pero que presentan mecanismos diferentes o no solapantes de acción serán muy valiosos en el arsenal terapéutico y la producción de tales anticuerpos múltiples en una manera comercial llegará a ser muy importante. En este ejemplo los autores de la presente invención describen como se aíslan versiones compatibles de emparejamiento de estos dos anticuerpos y se usan construyendo una Oligoclonics™ con un incremento esperado en potencia y eficacia en matanza de células tumorales comparados con los anticuerpos monoclonales originales.

Los anticuerpos anti-HER2 4D5 y 2C4 se describen en el documento WO0100245A2 y en Fendly y cols., *Cancer Research* 50: 1550-1558 (1990). La estructura molecular y la secuencia molecular de la versión humanizada de anticuerpo 2C4 se describe en Vajdos y cols., *J Mol Biol* 2002, 320, 415-428, en referencia de bases de datos de PDB 1L7I y en el documento WO0100245A2 (versión 574 en Tabla 2 en página 54, o rhuMAb2C4 en continuación de este documento). Para simplicidad aquí "2C4" se usa indicando la versión humanizada 574 del anticuerpo 2C4 murino. Su estructura en complejo con los primeros tres dominios de ErbB2 se publicó recientemente (Franklin y cols., *Cancer Cell*, 5, 2004, 317-328). La estructura y secuencia de h4D5 o herceptina se describió por Cho y cols., *Nature* 2003, 421, 756-760 y se deposita como 1N8Z en la base de datos PDB. Fuera de las regiones de determinación de complementariedad (CDR), pertuzumab es idéntico en secuencia a trastuzumab (Carter y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89, 4285-4289, 1992); consecuentemente, la estructura local del Fab de pertuzumab en el complejo ErbB2-pertuzumab se espera que sea en gran medida la misma que aquella del Fab de trastuzumab. Se sigue la siguiente vía construyendo una cadena ligera individual compatible de emparejamiento que restaurará un sitio de unión funcional cuando se empareje con la h4D5 VH pero también cuando se empareje con la 2C4 VH.

Diseñar cadenas ligeras compatibles de emparejamiento

Las diferencias aminoacídicas entre cadenas ligera de hu4D5v8 (la variante de humanización descrita por Kelly y cols., 1992, supra, indicada por hu4D5 o h4D5 en la sección siguiente) y 2C4 se han mapeado siendo 11 residuos como se destaca en la Figura 23. En las regiones de CDR de las cadenas ligeras, hay 4 diferencias en CDR1, 3 en CDR2 y 4 en CDR3. Lo más sencillo siguiendo en la ausencia de datos estructurales de los anticuerpos y su interacción con antígeno, es construir una biblioteca de cadena ligera que se ha diversificado en estas posiciones y rastrear o seleccionar para cadena ligera variante que mantiene comportamiento de unión a antígenos cuando se empareja con las cadenas pesadas de ambos anticuerpos, h4D5 y 2C4. La diversificación puede elegirse conteniendo todos los 20 aminoácidos posibles o un subgrupo de ellos, por ejemplo todos los residuos menos cisteína (que no se da normalmente en estas 11 posiciones), o un conjunto seleccionado de aminoácidos que se da frecuentemente en anticuerpos en estas posiciones. El diseño de un repertorio de cadenas ligeras basado en todas las diferencias de 11 aminoácidos entre h4D5 y 2C4 se da en la Figura 23, en la línea HYB1.

Una segunda aproximación construyendo una región de cadena ligera híbrida variable compatible de emparejamiento para dos anticuerpos, es emplear adicionalmente información estructural de la interacción de los anticuerpos con sus

respectivos antígeno o antígenos. En el ejemplo de h4D5 y 2C5, una abundancia de información de estructura función está disponible para guiar el diseño de una biblioteca de cadena ligera híbrida. En este diseño, HYB2 en Figura 23, todas las cadenas ligeras en el repertorio diseñado retienen todos los residuos comunes entre las dos cadenas ligeras originales de hu4D5 y 2C4 y una selección de residuos en las posiciones donde las dos cadenas ligeras originales difieren en composición, en la que la selección se basa en información estructural de la interacción anticuerpo-antígeno. Mientras que algo del diseño puede estar basado en esta información, se destaca también que las mutaciones puntuales de h4D5 han estado mostrando efectuar de formar espectacular el comportamiento biológico del anticuerpo: las actividades antiproliferativas de las variantes humanizadas de 4D5, que difieren solamente en 7 residuos aminoacídicos como máximo, se encontró que no están fuertemente correlacionadas con la afinidad a antígeno (Kelley y cols., 1992, supra). Así ello se requerirá para tomar muestras de versiones múltiples de cadenas ligeras compatibles de emparejamiento y para poner a prueba la actividad biológica de las combinaciones después de la selección de antígenos y la caracterización de unión asegurando el mantenimiento de la actividad biológica.

Se hizo el siguiente diseño de bibliotecas HYB2, en base a las siguientes observaciones:

CDR1. La plasticidad de secuencia del sitio de unión a antígenos de herceptina se analizó en un estudio por Gerstner y cols. (J Mol Biol 2002, 321: 851-862). A partir de estos estudios aparece que para los residuos de trastuzumab N30 se pueden reemplazar por serina (Tabla 1, mutación VL30 de clase 1, de Gerstner y cols., supra). Serina es el residuo usado en esta posición por 2C4. Así la cadena ligera híbrida compatible de emparejamiento se diseña conteniendo Ser en la posición 30. El resto de la CDR1 se toma a partir de la cadena ligera de herceptina ya que esta región parece ser irrelevante para unión de antígeno en 2C4 (Franklin y cols., supra).

CDR2. Por exploración de alanina y por exploración homóloga del anticuerpo Fab2C4 se reveló que la mayoría de las cadenas laterales que contribuyen a la unión de antígenos, están localizadas en la cadena pesada (Vajdos y cols., supra). Esto se confirmó recientemente por la estructura cristalina del anticuerpo en complejo con antígeno: la cadena ligera de Fab de pertuzumab hace solamente unos pocos contactos con ErbB2, mayoritariamente por medio de CDR L2 (posiblemente por medio de residuo 55) y algunos por medio de L3 (Franklin y cols., supra). Algunos de los residuos de 2C4 en esta región se pueden convertir a residuos de h4D5 sin pérdida de afinidad, según se sugiere por experimentos con versiones humanizadas de 2C4 descritas en el documento WO0100245A2 (página 54), en particular lo que puede ser posible es escoger residuos de VL de h4D5 en posiciones 54 y 56. El Phe en posición 53 en herceptina parece estar relativamente conservado, con alguna presencia de Trp, mientras que las otras posiciones en estas regiones de CDR no se ponen a prueba. Dado que algunos de estos residuos basados en CDR2 pueden ser también importantes posicionando residuos basados en cadenas pesadas vecinas para unión a antígeno, en el diseño de cadena ligera híbrida, los tres residuos que son diferentes h4D5 y 2C4 se diversifican totalmente, de tal forma que el procedimiento de selección puede identificar cual de las 8000 combinaciones proporcionarán una cadena ligera compatible para emparejamiento.

CDR3. Se dice que tirosina 91 de 2C4 es importante para unión a antígenos (Franklin y cols., supra) pero su sustitución con fenilalanina (F) es aceptable (Vajdos y cols., supra). Herceptina en esta posición en la cadena ligera además tolera varias otra cadenas laterales aromáticas incluyendo Phe, Tyr y Trp (Tabla 1, página 854 en Gerstner y cols., supra). Así la cadena ligera híbrida se diseña conteniendo Phe en la posición 91 (Figura 23). Para unión a antígeno 2C4 de los otros residuos del bucle H3 es relativamente resistente a mutagénesis como en Gerstner y cols., con la excepción de la Pro en la posición 95. Pero este residuo está compartido entre la herceptina y cadenas ligeras de anticuerpos 2C4. En la interacción de herceptina con antígeno hay interacciones más probables de las regiones CDR3 con antígeno, así en la cadena ligera híbrida, todos los residuos menos el 91 se toman de VL de herceptina (Figura 23).

En el diseño de HYB2 final, se toman aminoácidos para 6 de cada 11 posiciones de la h4D5 VL, 1 de cada 11 de la 2C4 VL (posición 30), 1 es un residuo no encontrado en cada VL (posición 91) y el 3 esta eligiéndose al azar (en CDR2).

Construcción de biblioteca HYB1 y selección de VL compatibles de emparejamiento

Las dos bibliotecas de cadenas ligeras se construyen como sigue. En la biblioteca de VL diseñada de HYB1, se situaron al azar 11 residuos, lo que implica que la diversidad de aminoácidos totales (20^{11}) es mucho mayor de la que se puede rastrear fácilmente. Muestreando la diversidad en esta biblioteca, se usa por lo tanto un procedimiento de selección poderoso. Las cadenas pesadas (VH) de h4D5 y 2C4 están clonadas en los sitios de clonación SfiI-BstEII de pCES1 (de Haard y cols., 1999, J Biol Chem 274, 18218-30) usando PCR y oligonucleótidos que se unen al extremo 5' y 3' de las secuencias nucleotídicas de los genes VH y que introducen sitios Sfi I y BstEII en sitios apropiados para clonación en fase (como se describe para genes VH de anticuerpos en de Haard y cols., supra; el sitio BstEII está ya presente en la región JH tanto de h4D5-VH como de 2C4-VH). La plantilla para el PCR de la VH de h4D5 es pAK19 de plásmido que lleva la variante 4D5 humanizada número 8, descrita en Kelly y cols., 1992, Biochemistry 31: 5435-5441, Tabla 1. La secuencia de nucleótidos de este clon se describe esencialmente en Carter y cols. 1992, P.N.A.S. 89: 4285-4289, en Figura 1, como huMAb4D5-5, con dos alteraciones (V102Y en CDR3 del VH y E55Y en CDR2 de VL, según se describe en Kelly y cols., 1992, supra). La secuencia de VH se puede extraer también como fragmento SfiI-BstEII 11 de SEC ID N.º: 17 como se describe más adelante. La plantilla para la reacción PCR de la VH de 2C4 es plásmido pC2C4, descrito en la página 425 de Vajdos y cols., supra. La secuencia VH puede extraerse de la inserción NcoI-BstEII dentro del fragmento más grande BssHII-NotI de la SEC. ID. N.º: 17. La clonación de los productos de PCR

dentro de pCES1 se lleva a cabo como se describe para reservas de VH de cadena pesada humana y usando procedimientos de clonación estándar. pCES1 es un vector fagémido que es adecuado para la expresión de fragmentos Fab en *E. coli* y para la presentación de los fragmentos Fab en la superficie del fago filamentoso (de Haard y cols., 1999, *supra*). Se identifican dos plásmidos con inserto correcto secuenciando la región de inserción y unión y los plásmidos resultantes llamados pCES-VH-h4D5 y pCES-VH-2C4. Estos son los plásmidos aceptores para el repertorio de la cadena ligera, HYB1. La región codificante VLCL de hu4D5v8 se amplifica usando oligonucleótidos específicos cebando en su región 5' y en su región 3' e introduciendo sitios de restricción de ApaI y Ascl según se describe en de Haard y cols., *supra*, para cadenas VLCL humanas. Como plantilla se usa pAK19 llevando la variante humanizada de 4D5 número 8 (hu4D5-8, descrita en Kelly y cols., 1992 *Biochemistry* 31: 5435-5441, Tabla 1). El producto de PCR se clona como fragmento ApaI-Ascl en pCES-VH-h4D5, proporcionando pCES-Fab-h4D5. Esto codifica un fragmento de h4D5 Fab funcional. HYB1 se produce usando procedimientos descritos con versiones de plantilla de "parada" de este plásmido. La versión de plantilla de parada se hace reemplazando un codón en cada una de CDR1, CDR2 y CDR3 de la hu4D5-v8-VL con codones de parada TAA. Se han descrito extensamente procedimientos diversificando la plantilla de VL en la bibliografía incluyendo en el documento WO 03102157A2, en "Directed Mutagenesis, a Practical Approach", Ed. M.J. McPerson, IRL Press 1991. El procedimiento usado aquí es el procedimiento Kunkel; esto proporciona el codón de parada del VL en plásmido pCES-Fab-h4D5-3ST. La versión de plantilla de parada de h4D5-VL se usa como una plantilla para el procedimiento de mutagénesis de Kunkel (Kunkel y cols. 1987, *Methods in Enzymol* 154: 367-382), usando oligonucleótidos mutagénicos diseñados reparando simultáneamente los codones de parada e introduciendo mutaciones en los sitios diseñados. Las mutaciones en todas las 3 CDR de la VL se introducen simultáneamente en una reacción de mutagénesis individual. Esto se describe extensamente en Sidhu y cols. 2000, *Methods Enzymol* 328: 333-363. La reacción de mutagénesis se somete a electroporación en *E. coli* SS320 (Sidhu y cols., *supra*) y las células transformadas se cultivan durante toda una noche en presencia de fago coadyuvante M13-VCS produciendo partículas de fago que están encapsulando el ADN del fagémido y están presentando fragmentos Fab en sus superficies. Se han descrito procedimientos para manipulación de biblioteca de presentación de fagos, selección y rastreo de clones, por ejemplo véanse de Haard y cols., *supra*; Vajdos y cols., *supra* y también los otros ejemplos). La biblioteca de 4D5-HYB1 resultante contiene más de 1×10^8 miembros únicos. Esta biblioteca 4D5-HYB1 se selecciona dos veces sobre antígeno HER2 como se describe en Vajdos y cols., *supra*, proporcionando una población de más del 65 % de anticuerpos con actividad de unión a antígenos. Estos anticuerpos muestran su región VH, pero la mayoría llevan diferentes cadena ligeras. Las cadenas ligeras de esta población se obtienen como fragmento ApaI-Ascl (VLCL) y se clonan como una reserva en pCES-VH-2C4. Esta nueva biblioteca contiene ahora un subconjunto de cadenas ligeras de HYB1 que es probable que sean compatibles con unión a antígeno en el contexto de h4D5. La biblioteca se selecciona una vez en antígeno y se identifican los clones que median la unión de antígenos. Las cadenas ligeras con secuencia de aminoácidos idéntica y que median unión a antígenos cuando se emparejan con h4D5-VH y con la 2C4-VH se identifican secuenciando un panel de clones reactivos con Ag a partir de la biblioteca de h4D5-HYB1 seleccionada y de clones reactivos con Ag a partir de la sub-biblioteca de 2C4 seleccionada y comparando las secuencias. Además usando la reactividad frente a antígeno en ELISA de fagos como lectura, la reactividad de los fragmentos Fab se pone a prueba en ELISA (como se describe en de Haard y cols., *supra*). Esto conduce a la identificación de un panel de VL que presentan que se emparejan funcionalmente tanto con VH-h4D5 así como con VH-2C4. Dentro del panel la VL mejor se identifica determinando la afinidad de la interacción y la actividad biológica de los dos fragmentos Fab respectivos. Se describen procedimientos para determinación de afinidad y de actividad biológica de Fab anti-HER2 en Kelley y cols., 1992, *supra* y en Gerstner y cols., 2002, *supra* y se describen más adelante adicionalmente.

Construcción de biblioteca HYB2 y rastreo de VL compatibles de emparejamiento

La biblioteca de VL diseñada de HYB2 contiene solamente 8.000 variantes. Aquí se sigue una vía diferente permitiendo expresión simultánea y detección de variantes de unión a antígeno, de anticuerpos que contienen VH de h4D5 y de 2C4. Primero la VL en pCES-Fab-h4D5 se muta por mutagénesis dirigida a sitio de Kunkel (Kunkle y cols., *supra*) con asparagina 30 cambiada a serina (N30S) e histidina 91 cambiada a fenilalanina (H91F), de acuerdo con el diseño representado en la Figura 23. Del clon resultante, se producen p4D5-VLmut, fago y Fab y se ponen a prueba para unión en diluciones seriadas a ELISA de fagos de placa revestida de Her-2 (dominio extracelular), confirmando que h4D5 mantiene una reactividad a antígenos mínima. A continuación se hace una versión de plantilla de parada a partir de este plásmido, reemplazando un codón en la CDR2 de la VL con un codón de parada TAA (residuo 55, la tirosina se muta de "tat" a "taa"; este residuo se dice que se requiere con el fin de obtener la afinidad de antígeno del anticuerpo de h4D5 humanizado, Kelley y cols., 1992, *supra*, así se necesitará fijarse a "Y" restaurando la fase de lectura y de unión a antígeno). Esta versión de plantilla de parada de la cadena ligera de h4D5v8 se clona en pSCFV-3 (ejemplo 2 y Figura 14B), por amplificación de la región VLCL de la plantilla de parada de CDR2. El diseño de los oligonucleótidos usados en esta amplificación es tal que el segmento de VLCL entero se amplifica y que después de digestión el segmento puede clonarse direccionalmente para expresión en fase de la cadena ligera sometido al control del promotor de arabinosa de pSCFV-3 y sin cualesquiera etiquetas C-terminales. Brevemente la VLCL se amplifica con cebadores de unión al extremo 5' y al extremo 3' de la casete y proporcionando en el 5' un saliente largo en 2 reacciones de PCR codificando una región de aproximadamente 90 nucleótidos que codifican sitios de unión a ribosomas, codón de inicio y secuencia líder bacteriana, produciendo un fragmento EcoRV-EcoRI que se clona dentro de los sitios PacI-EcoRI que rodean el casete de expresión en pSCFV-3. Este plásmido, pVLmutST, se usa como aceptor para las dos cadenas pesadas, después de que se retire un sitio BstEII interno en posición 143 del inserto. La

secuencia del inserto final PacI-EcoRI se da en la SEC. ID. N.º: 16. Las cadenas pesadas 2C4 y h4D5v8 se clonan en 2 etapas como fragmentos VH-CH1 en pSCFV-3 (Figura 14B) proporcionando plásmido p2Fab-HER2 según se indica en la Figura 24. Primero la región h4D5 VHCH1 se amplifica a partir de pCES-VH-h4D5 y se clona como fragmento SfiI-BssHII en pVLMutST. El diseño de los cebadores es tal que después de clonación disponen fases de lectura apropiadas con líderes y etiquetas en pSCFV3, proporcionando las secuencias de unión finales como se representa en la SEC. ID. N.º: 17. En segundo lugar la cadena pesada de 2C4 VHCH1 se amplifica a partir de pCES-VH-2C4 y se clona como fragmento BssHII-NotI dentro de este plásmido. De forma similar el diseño de los cebadores es tal que después de clonación disponen fases de lectura apropiadas con líderes y etiquetas en pSCFV3, proporcionando las secuencias de unión finales como se representa en la SEC. ID. N.º: 17. Este plásmido final, p2Fab-Her2, proporciona la expresión de ambos dominios variables de cadena pesada como cadenas Fd (unidos a gamma-1 humana) y la expresión también de una cadena ligera conteniendo codón de parada. La secuencia de los insertos HindIII-NotI y PacI-EcoRI de p2Fab-HER2 se da en las SEC ID N.º: 17 y 16, respectivamente. Las cadenas pesadas de los dos anticuerpos humanizados, h4D5-versión 8 y 2C4-versión 574 se proporcionan como fusiones al dominio CH1, a la etiqueta Myc y a la etiqueta VSV respectivamente y a una etiqueta HIS para purificación de IMAC. La cadena ligera en formato VLCL se deriva esencialmente de h4D5 pero lleva dos mutaciones de VL diseñadas en posiciones 30 y 91, un codón de parada en la CDR2 y un sitio de BstEII interno eliminado sin cambio aminoacídico.

El plásmido p2Fab-HER2 se usa como una plantilla para el procedimiento de mutagénesis de Kunkel (Kunkel y cols. 1987, *Methods in Enzymol* 154: 367-382), usando oligonucleótidos mutagénicos diseñados reparando simultáneamente el codón de parada en el VL-CDR2 e introduciendo mutaciones en los 3 sitios diseñados en CDR2, como se indica en la Figura 23. Después de electroporación y del plaqueo (como anteriormente), una biblioteca de 50.000 clones se rastrea para versiones VL compatibles de emparejamiento como sigue. En el plásmido p2Fab-HER2, todos los tres genes de región variable están unidos a una etiqueta de epítopos única que proporciona una ruta para su detección específica. Los clones individuales se cosechan en placas de 96 pocillos (Nunc) y se induce que expresen ambas cadenas pesadas y una cadena ligera, usando condiciones como se describen en el Ejemplo 4, con la excepción de que arabinosa se añade también como inductor al mismo tiempo que el IPTG. El día siguiente el sobrenadante de los cultivos se pone a prueba para la presencia de Fab reactivos de HER2, en un ELISA esencialmente como en Ejemplo 4. Los ensayos múltiples se llevan a cabo con la misma muestra, usando bien reactivos secundarios anti-myc o anti-VSV detectando la presencia del h4D5-Fab o del 2C4-Fab, respectivamente.

Un clon reactivo dual designado 3-8E3, que une HER-2 en ELISA tanto con los reactivos anti-etiqueta VSV como con los reactivos anti-etiqueta Myc, se elige para análisis adicional. La mezcla de Fab de este clon se expresa a nivel de escala de 10 l y se purifica a partir de sobrenadantes de *E. coli* de acuerdo con Kelley y cols., 1992, *supra*, páginas 5435-5436. Brevemente, el sobrenadante de cultivo se microfiltra por filtración de flujo tangencial, concentrado por ultrafiltración y filtrado sobre DEAE-Sefarosa-FF. La mezcla de anticuerpos en la fracción de rendimiento se somete a cromatografía de afinidad en Proteína-G-Sefarosa-FF. La mezcla de Fab se eluye con glicina 0,1 M, pH 3,0. La concentración de la proteína total se determina por medidas de A280 usando una A280 de $67 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La constante de unión de Fab individuales o la constante de unión aparente de mezcla de Fab se mide por ELISA esencialmente como se describe por Vajdos y cols., 2002, *supra*, en la página 426. Brevemente, inmunoplaacas maxisorb NUNC de 96 pocillos se revisten durante toda una noche a 4 °C con HER2-ECD (1 microgramo · ml en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6) y las placas se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 0,5 % en PBS-Tween 20 al 0,05 %. Las diluciones seriadas de proteína Fab se incuban en las placas revestidas de HER2-ECD durante 2 horas a temperatura ambiente y las placas se lavaron. Se detecta Fab unido con anticuerpo de cadena kappa anti-humano de ratón biotinilado seguido por conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Sigma), usando 3',3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como sustrato (Kirsgaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La constante de unión real de un Fab en la mezcla de dos Fab se mide reemplazando el anticuerpo de cadena kappa anti-humano de ratón biotinilado de la prueba anterior con anticuerpos anti-etiqueta MYC biotinilado (para h4D5) o con anti-etiqueta VSV biotinilado (para 2C4) (anticuerpos similares a aquellos descritos en el Ejemplo 2). Las curvas de valoración se ajustan con un programa de ajuste de curvas de regresión lineal de cuatro parámetros (KaledaGraph, Synergy Software) determinando los valores de CE_{50} , las concentraciones de Fab que corresponden a las señales de unión de la mitad de las máximas. Se dan ejemplos para h4D5, 2C4 y la mezcla 3-8E3 en la Figura 25. Se confirma que la mezcla 3-8E3 contiene dos fragmentos de anticuerpo Fab funcionales, h4D5* y 2C4*, en los que el * indica que la región de cadena variable es diferente de las cadenas ligeras humanizadas de h4D5 y 2C4 (en la Figura 24). La proporción de los dos anticuerpos Fab que están presentes en la mezcla 3-8E3 se analiza por espectrometría de ionización de masas por electropulverización esencialmente como se describe en Kelley y cols., 1992, *supra*. Hay una diferencia en los pesos moleculares de los Fab sobre la base de que las cadenas pesadas de 2C4 y h4D5 difieren en aproximadamente 68 daltons, bien por encima de la desviación estándar del ensayo (en el intervalo de 3-7 daltons).

La actividad biológica de las mezclas de Fab se compara con aquella de los fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales. Las características inhibitorias de crecimiento se evalúan usando la línea celular de cáncer de mama, SK-BR-3 (véase Hudziak y cols., 1989, *Mol Cell Biol*. 9: 1165-1172), usando las condiciones de ensayo descritas en la página 50 del documento WO0100245A2. Una gráfica a modo de ejemplo en la Figura 25 muestra las curvas de inhibición de crecimiento para Fab de h4D5 y mezclas de 4D5* y 2C4* (véase ejemplo 17) que usan cadenas ligeras compatibles de emparejamiento diferentes, indicadas con VL1 a VL7. Los Fab se evalúan adicionalmente por su capacidad inhibiendo fosforilación de tirosina estimulada por HRG de proteínas en el rango de peso molecular 180.000

a partir de lisados de células MCR7 completas, que se sabe que expresan todos los receptores de ErbB conocidos (como en el documento WO0100245A2, páginas 50-51). Como un control, se usa 2C4 como Fab; este anticuerpo es muy efectivo en romper la formación del sitio de unión de alta afinidad HER2/HER3 en células MCF7.

Una vez la actividad de los Fab en la mezcla confirmada, la VL seleccionada, compatible de emparejamiento de 3-8E3, se usa construyendo una Oligoclonics™ del formato IgG, esencialmente como se describe en el Ejemplo 10 anterior. Esto da como resultado en la producción de clones de 30 células produciendo cada una una mezcla de los anticuerpos h4D5* y 2C4* y la combinación biespecífica; las IgG se purifican a partir de los sobrenadantes celulares por cromatografía en columna de proteína A como se describe anteriormente y la concentración del IgG total presente en las mezclas determinadas. La actividad biológica de las mezclas IgG resultantes se ensaya como en Nahta y cols., Cancer Research 64: 2343-2346 (2004), usando un ensayo de inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama según se describen en la página 2343 de esta publicación. Brevemente las células BT474 se tratan por triplicado con diluciones de dos veces en serie de las mezclas de IgG en el intervalo de 0,1-25 ng/ml. Después de 5 días las células se tripsinizan y se cuentan por exclusión de azul de tripano. La inhibición del crecimiento se calcula como la fracción de células viables comparada con cultivos no tratados. Como controles se usan los anticuerpos originales hu4D5-v8 (trastuzumab) y 2C4 (pertuzumab), así como una mezcla 1:1 de estos anticuerpos monoclonales. La mezcla con la actividad más sinérgica entre los dos sitios de unión se identifica en base a dos trazados de dosis-efecto como se describe en la leyenda de la Figura 1 en la página 2344 en Nahta y cols., 2004, supra. Otra prueba confirmando la actividad sinérgica se describe en esta publicación (pruebas in vitro: inducción de apoptosis, señalización de Akt), en el documento WO0100245A2 (pruebas in vitro y pruebas in vivo, tales como modelos de xenotransplante tumorales humanos descritos en los ejemplos 5-7 y en las Figuras 10-13) y en Franklin y cols., 2004, supra (heterodimerización in vitro HER2/HER3 usando células transfectadas COS7).

Otros ejemplos de anticuerpos que pueden combinarse con uno o ambos de estos anticuerpos anti-ErbB2 con cadenas compatibles de emparejamiento que funcionan como un agente antiangiogénico (por ejemplo un anticuerpo anti-VEGF); tienen como diana el receptor de EGF (o ErbB1; por ejemplo C225 o ZD1839); o que son anticuerpo anti-ErbB2 que induce fuertemente apoptosis, tal como 7C2 o 7F3 (documento WO0100245A2). Las cadenas ligaras compatibles se identifican usando los procedimientos descritos en esta invención.

Ejemplo 18: Anticuerpos compatibles de emparejamiento para producir una mezcla de factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF) que tienen como diana anticuerpos que bloquean múltiples actividades biológicas.

HGF/SF es un ligando que se une al receptor tirosina cinasa Met. HGF/SF está compuesto de una cadena que contiene el dominio N-terminal y cuatro dominios kringle unidos por puentes disulfuro covalentemente a la cadena p. La unión de HGF/SF al receptor tirosina cinasa Met induce actividades biológicas múltiples, incluyendo proliferación celular e invasión celular y crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis). Además, la unión de HGF/SF a Met evita la muerte celular programada (revisado en Birchmeier, C. y cols. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 915-925 (2004). El receptor Met se expresa en muchos tumores sólidos y la señalización de Met ha estado mostrando estar implicada en desarrollo de tumores, invasión y metástasis (Cherrington, J.M. y cols., Adv. Cancer. Res. 79: 1-38 (2000); Stec y cols. Mol. Cell Biol. 12, 5152-5158 (1992).

Se han producidos anticuerpos monoclonales contra HGF/SF estudiando su capacidad bloqueando las diversas actividades biológicas de HGF/SC (Cao, B. y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98, 7443-7448, 2001). Los anticuerpos se produjeron inmunizando ratones con HGF/SF humano y generando hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales. El suero policlonal de ratones inmunizados con HGF/SC mostró actividad neutralizadora potente de todas las actividades biológicas de HGF/SF. En contraste un panel grande de anticuerpos monoclonales que se unen al HGF/SCF humano se mostró que carece de la capacidad para bloquear completamente todas las actividades biológicas de HGF/SC (Cao, B. y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98, 7443-7448, 2001). Combinaciones de dos anticuerpos monoclonales anti-HGF/SF carecieron aún de actividad de bloqueo plena mientras que varias mezclas de tres anticuerpos monoclonales neutralizaron potentemente toda la actividad de HGF/SF en ensayos in vitro. Se concluyó que el bloqueo de las actividades biológicas de HGF/SF requiere la unión simultánea de múltiples anticuerpos monoclonales contra diferentes epítomos del ligando HGF/SF (Cao, B. y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 98, 7443-7448, 2001).

Mezclas de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la misma molécula diana que bloquean el espectro completo de actividades biológicas de la molécula son contribuciones muy valiosas al arsenal terapéutico, especialmente cuando tales actividades bloqueantes no se logran con anticuerpos monoclonales. La producción de tales anticuerpos múltiples en una manera farmacéutica y en una forma comercialmente viable llegará a ser muy importante. En este Ejemplo, los autores de la presente invención describen como mezclas de anticuerpos monoclonales contra el ligando HGF/SF se aíslan y se usan construyendo Oligoclonics™ que bloquean eficientemente todas las actividades biológicas de este ligando.

Las bibliotecas de scFv o de Fab de anticuerpos de fagos que se forman enfocando la diversidad en una región variable y manteniendo la otra región invariable, preferentemente una secuencia de línea germinal, son particularmente relevantes para la invención. A partir de tales bibliotecas es factible aislar anticuerpos con una cadena

pesada diferente pero con cadena ligera idéntica, o viceversa (Figura 3). Tales anticuerpos se reformatean adecuadamente en un formato de Oligoclonics™ de acuerdo con la invención. En la técnica, se ha descrito que anticuerpos que tienen el mismo gen de VL pero que tienen diferentes genes de VH y especificidades que varían pueden obtenerse a partir de bibliotecas de presentación de fagos de anticuerpos (Nissim y cols., (1994) EMBO J. 13: 692-698). Se usa una sub-biblioteca de la biblioteca de scFv semisintética (de Kruif y cols. (1995) J. Mol. Biol. 248: 97) descrita en el Ejemplo 7 seleccionando anticuerpos contra HGF/SF humano recombinante.

El ligando HGF/SF se produce y purifica a partir de células S-114 (células NIH 3T3 transformadas con HGF/SF humano y Met) según se describe (Rong, S. y cols. (1993) Cell Growth Differ. 4, 563-569). Para selecciones de fagos, se revistieron placas de 96 pocillos con 2,5 mg/ml de HGF/SF en tampón de revestimiento (Na_2CO_3 0,2 M / NaHCO_3 , pH 9,6; 50 ml por pocillo) durante toda una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon después con PBS conteniendo BSA al 1 % (200 ml/pocillo) durante toda una noche a 4 °C. Se llevaron a cabo selecciones de unión de fagos a HGF/SF humanos como se describe en los ejemplos anteriores. La unión de fagos seleccionados a partir de la biblioteca se somete a seguimiento por una ELISA de HGF/SF ELISA usando placas de 96 pocillos revestidas con 2,5 mg/ml de HGF/SF en tampón de revestimiento (Na_2CO_3 0,2 M / NaHCO_3 , pH 9,6; 50 ml por pocillos) durante toda una noche a 4 °C. Las placas se bloquean después con PBS conteniendo BSA al 1 % (200 ml/ pocillo) durante toda una noche a 4 °C.

Las regiones de VH de anticuerpos monoclonales individuales y la región VL individual se clonan en el vector de expresión eucariótica para anticuerpos monoclonales humanos como se describe en el Ejemplo 10 y se introducen subsiguientemente en células eucariotas CHO por transfección. Para cada transfección, los plásmidos que codifican 2 o más regiones VH diferentes se mezclan en diversas proporciones y se usan a una concentración de 1-10 mg/ml. Los clones que segregan anticuerpos humanos se generan esencialmente como se describe en el Ejemplo 10 y los sobrenadantes se someten a seguimiento por anticuerpos específicos de HGF/SF con un ELISA en placas de 96 pocillos revestidas con HGF/SF como se describe en el párrafo anterior. Los sobrenadantes de clones que segregan anticuerpos anti-HGF/SF se usan determinando la capacidad de mezclas bloqueando las actividades biológicas de HGF/SF.

Los sobrenadantes de transfectantes se rastrean para capacidad neutralizante de HGF/SF en el ensayo de dispersión de hígado canino de Madin-Darby (MDCK) como se describe (Cao, B. y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98, 7443-7448, 2001). Las células MDCK se plaquearon a $7,5 \times 10^4$ células por 100 ml por pocillo con o sin HGF (5 ng/pocillo) en DMEM con FBS al 5 %. Se añaden después tres mil microlitros de sobrenadantes a diluciones seriadas 2 veces a placas de 96 pocillos. Un antisuero neutralizante policlonal de conejo (1 ml/pocillo; ref. Koochekpour, S. y cols. (1997) Cancer Res. 57, 5391-5398) se incluye como control. Tras incubación durante toda una noche a 37 °C, las células se tiñeron después con cristal violeta al 0,5 % en etanol al 50 % (vol./vol.) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se contempla la dispersión usando un microscopio óptico.

Los sobrenadantes a partir de transfectantes se rastrean también neutralizando la capacidad de HGF/SF en el ensayo de morfogénesis ramificado como se describe. El ensayo de morfogénesis ramificado usando células SK-LMS-1 se llevó a cabo como se describe (Jeffers, M. y cols. (1996) Mol. Cell. Biol. 16, 1115-1125). Brevemente, se mezclan las suspensiones celulares en un volumen igual de GFR-Matrigel (Becton Dickinson), se plaquean a 5×10^4 células por 125 ml por pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos y se incuban durante 30 minutos a 37 °C. HGF/SF, con o sin mAb neutralizantes, se añaden junto con DMEM conteniendo FBS al 10 % en la parte superior del gel. Después de 72-96 horas de incubación a 37 °C, los pocillos representativos se fotografían a un aumento de x400.

Ejemplo 19. Anticuerpos compatibles de emparejamiento para producir una mezcla de anticuerpos que bloquea receptor de células vasculares endoteliales 1 (VEGF-R1) y VEGF-R2.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un regulador clave de procesos angiogénicos durante la vida adulta tales como curación de heridas, retinopatía diabética, artritis reumatoide, soriasis, trastornos inflamatorios y crecimiento tumoral y metástasis (Ferrara, N. y cols. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 237-1-30 (1999), Klagsbrun, M. y cols. Cytokine Rev. 7, 259-270 (1996), Neufeld, G. y cols. FASEB J. 13, 9-22 (1999)). VEGF se une a y media su actividad principalmente a través de dos receptores tirosina cinasa, VEGF-R1 (también llamado Flt-1) y VEGF-R2 (también llamado KDR). Numerosos estudios han mostrado que la sobreexpresión de VEGF y sus receptores desempeñan un papel en angiogénesis asociada a crecimiento tumoral y así en crecimiento tumoral y metástasis (Folkman, J., Nat. Med. 1, 27-31 (1995), Zhu, Z. y cols. Invest. New Drugs 17, 195-212 (1999)).

Un anticuerpo monoclonal anti-VEGF que se une a VEGF y bloquea su unión se ha aprobado recientemente por la FDA para el tratamiento de pacientes con cáncer metastático colorrectal (<http://www.fda.gov/cder/foi/appletter/2004/1250851tr.pdf>). Esto muestra que los anticuerpos monoclonales que bloquean angiogénesis proporcionan una importante herramienta en el tratamiento de tumores sólidos.

En el documento WO/04003211A1, Zhu describe anticuerpos biespecíficos con una parte de la molécula bloqueando la unión de VEGF a VEGF-R1 y la otra parte de la molécula bloqueando la unión de VEGF a VEGF-R2. Además, el anticuerpo biespecífico evita la homodimerización de los receptores de VEGF y así bloquean la señalización celular mediada por VEGF-R. Comparada con unión a un VEGF-R individual, la unión dual da como resultado una inhibición más potente de funciones celulares estimuladas por VEGF tales como, por ejemplo, proliferación de células

endoteliales. Los anticuerpos biespecíficos descritos por Zhu comprenden fragmentos Fv de cadena individual condensados a las regiones constantes de cadenas pesadas y ligeras en una molécula de IgG. Debido a la naturaleza de las moléculas biespecíficas, se espera que sean inmunógenas tras inyección en seres humanos, impidiendo su efectividad clínica. Las mezclas de anticuerpos humanos como se representan en formato Oligoclónicos™ que bloquean tanto el VEGF-R1 como el VEGF-R2 mientras que mantienen eficacia clínica óptima pueden ser una adición importante al arsenal de fármacos sólidos antitumorales. Una Oligoclónicos™ tal se obtiene como sigue:

La proteína de fusión soluble VEGF-R2 fusionada a fosfatasa alcalina (VEGF-R2-AP) se expresa en células NIH 3T3 transfectadas de forma estable y se purifica a partir de sobrenadante de células de cultivo por cromatografía de afinidad como se describe (Lu, D. y cols. J. Biol. Chem. 275: 14321-14330 (2000)). La proteína de condensación VEGF-R1-Fc se adquiere de R&D Systems (Mineápolis, MN). VEGF-R2-AP se reviste en tubos Maxisorp Star a una concentración de 10 mg/ml y subsiguientemente, los tubos se bloquean con leche al 3 %/PBS según se describe en el documento WO 003211 y Lu, D. y cols. Cancer Res. 61: 7002-7008 (2001). La biblioteca de fagos usada por selección de fragmentos de anticuerpos scFv específicos para VEGF-R2 contiene una cadena ligera individual y se diversifica en la cadena pesada como se describe en el Ejemplo 7 anterior. La selección de fagos se lleva a cabo según se describe en los ejemplos anteriores. La especificidad de los fragmentos de anticuerpos de scFv seleccionados se determina en ELISA con 10 mg/ml de VEGF-R2-AP revistiendo placas de 96 pocillos Maxisorp y las etapas de unión de scFv, lavado y detección son según se describen en los ejemplos anteriores. Como un control para unión del resto AP, se somete a ensayo scFv para unión a proteínas de fusión de AP control tales como ELF2-AP (GenHunter Corp, Nashville, Tn). La selección de unión de fagos al VEGF-R1 se lleva a cabo revistiendo tubos Maxisorp Star con 10 mg/ml de VEGF-R1-Fc y llevando a cabo rondas de selección anteriores según se describen en los ejemplos anteriores. La especificidad de los scFv seleccionados se analiza en ELISA con 10 mg/ml de VEGF-R1-Fc revestidos a placas de 96 pocillos. Como un control uniendo a la parte Fc VEGF-R1-Fc, las placas se revisten con la proteína de fusión de Fc rhThy-1:Fc (número de producto ALX-203-004, Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza).

Las regiones de VH de anticuerpos monoclonales individuales y la región VL individual se clonan en el vector de expresión eucariótica para fragmentos de anticuerpos monoclonales humanos como se describe en el Ejemplo 10 y se introducen subsiguientemente en células eucariotas CHO por transfección. Para cada transfección, los plásmidos que codifican 2 o más regiones VH diferentes se mezclan en diversas proporciones y se usan a una concentración de 1-10 mg/ml. Los clones que segregan anticuerpos humanos se generan esencialmente como se describe en el Ejemplo 10 y los sobrenadantes se someten a seguimiento por anticuerpos específicos de VEGF-R1 y VEGF-R2 con un ELISA en placas de 96 pocillos revestidas con VEGF-R1-Fc y VEGF-R2-AP como se describe en el párrafo anterior y usando anticuerpos secundarios que se unen específicamente a los anticuerpos humanos. Los sobrenadantes de anticuerpos que segregan clones para ambos receptores se usan determinando la actividad biológica de las mezclas en ensayos de bloqueo de VEGF-R1 y VEGF-R2 y en ensayos de migración antimitótica y de leucemia.

Se llevan a cabo ensayos de bloqueo de VEGF-R1 y de VEGF-R2 como se describe (Zhu, Z. y cols. Cancer Res. 58: 3209-14 (1998), Lu, D. y cols. J Immunol Methods, 230: 159-71 (1999)). Los ensayos antimitótico y de migración de leucemia se llevan a cabo como se describe en el documento WO 04003211A1. Midiendo si estas mezclas de anticuerpo compiten con VEGF para unión a estos receptores, se llevan a cabo ensayos que miden el nivel de inhibición inducida por anticuerpos de efectos asociados con VEGF. Por ejemplo el efecto del cóctel de anticuerpos en células endoteliales inducidas por VEGF se mide usando un ensayo de incorporación de timidina. Se han descrito numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* midiendo el efecto de los ligandos que interfieren con la interacción VEGF-receptor de VEGF. Algunos ensayos adecuados se describen en Gerbert y cols., J Biol. Chem. 1998, 273: 30336 (ensayo de supervivencia celular, apoptosis celular endotelial, ensayo de fosforilación de Akt, como en página 30337); en Mendel y cols., Clin. Cancer Res. 2000, 6: 4848-4858 (modelos de xenotransplante subcutáneo en ratones atímicos, expresión de superficie de KDR, ensayo de unión de ¹²⁵I-VEGF y ensayo de cinasa receptora de Flk-1, como en páginas 4849-4850). Estos y otros ensayos adecuados se revisan en Auerbach y cols., 2003, Clin. Chemistry 49 (1): 32-40.

Listados de secuencias:

SEC. ID. N.º: 1: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA DEL HIBRIDOMA JA.

```

1 ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GCTTTTCTT GTGGCTATTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAG
61 GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC
121 TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTAGCAAC TATGCCATGA GCTGGGTCCG CCAGGCTCCA
181 GGAAGGGGC TGGAGTGGGT CTCAGCTATT AGTGCTAGTG GTCATAGCAC ATATTTGGCA
241 GACTCCGTGA AGGGCCGGT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCCGTATATT ACTGTGCGAA AGATCGAGAG
361 GTTACTATGA TAGTTGTACT TAATGGAGGC TTTGACTACT GGGGCCAGGG AACCCGGGTC
421 ACCGTCTCCT CCGCCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCTCCAAG
481 AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGG TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCGAACCG
541 GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC
601 CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG
661 GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG
721 AGAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAACT CACACATGCC CACCGTGCC AGCACCTGAA
781 CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
841 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC
901 AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
961 GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG
1021 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCAGC CCCATCGAG
1081 AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CTGCCCCCA
1141 TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
1201 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
1261 ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTCTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
1321 AAGAGCAGGT GGCAGCAGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
1381 AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCCGGTA AATGA

```

SEC. ID. N.º: 2: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA DEL HIBRIDOMA JA.

```

1 ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA
61 GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC
121 CTCGCCTGCA GGGCCAGTCA GACTGCTAGC AGGTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT
181 GGCCAGGCTC CCAGACTCCT CATCTATGAT ACATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC
241 AGGTTCAAGT GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCT CCATCAGCAG CCTGGAGCCT
301 GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTTTCAACT GGCCGTGGAC GTTCGGCCAA
361 GGGACCAAGG TGGAATTCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CTTCCCGCCA
421 TCTGATGAGC AGTTGAAATC TGGAATGCC TCTGTTGTGT GCCTGCTGAA TAACTTCTAT
481 CCCAGAGAGG CCAAAGTACA GTGGAAGGTG GATAACGCC TCCAATCGGG TAACTCCAG
541 GAGAGTGTCA CAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG CACCTGACG
601 CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCCT GCGAAGTCAC CCATCAGGGC
661 CTGAGCTCGC CCGTCACAAA GAGCTTCAAC AGGGGAGAGT GTTAG

```

5

SEC. ID. N.º: 3: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA DEL HIBRIDOMA JB.1.

```

1 ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTTATGGGT CTTGTCCCAA
61 ATTACCTTGA AGGAGACTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCT CACGCTGACC
121 TGCACCTTCT CGGGGTTCCT ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG
181 CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGGGTACA CTCATTTATT GGGATGATGA TAAGCGTTAC
241 AGTCCATCTC TGGAGAACAG GGTCACCATC AGGAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGCT
301 CTTACAATGA CGAACATGGA CCCTTTGGAC ACAGGCACAT ACTACTGTGC GCACAGACAA
361 CATATCAGCA GCTTCCCGTG GTTCGATTCC TGGGGCCAGG GAACCTGGT CACCGTCTCC
421 TCAGCTTCCA CCAAGGGCCC ATCGGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG GAGCACCTCT
481 GGGGGCACAG CGGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAGCC GGTGACGGTG
541 TCGTGGAACT CAGGCGCCCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGTGT CCTACAGTCC
601 TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGCCCT CCAGCAGCTT GGGCACCCAG
661 ACCTACACCT GCAACGTGAA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GAGAGTTGAG

721 CTCAAAACCC CACTTGGTGA CACAACCTAC ACATGCCCAC GGTGCCCAGA GCCCAAATCT
781 TGTGACACAC CTCCCCCGTG CCCACGGTGC CCAGAGCCCA AATCTTGTGA CACACCTCCC
841 CCGTGCCAC GGTGCCCAGA GCCCAAATCT TGTGACACAC CTCCCCCATG CCCACGGTGC
901 CCAGCACCTG AACTCCTGGG AGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAT
961 ACCCTTATGA TTTCCCGGAC CCTGAGGTG ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
1021 GACCCCGAGG TCCAGTTCAA GTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
1081 AAGCCGCGGG AGGAGCAGTT CAACAGCAGC TTCCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTTG
1141 CACCAGGACT GGCTGAACGG TAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
1201 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGACAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC
1261 ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
1321 AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAGCGGGCA GCCGGAGAAC
1381 AACTACAACA CCACGCCTCC CATGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT CTACAGCAAG
1441 CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACATCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1501 GAGGCTCTGC ACAACCGCTT CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

```

SEC. ID. N.º: 4: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA DEL HIBRIDOMA JB.1.

```

1 ATGGCCTGGA CCGTTCTCCT CCTCGGCCTC CTCTCTCACT GCACAGGGTC TGTGACGTCC
61 TATGTGCTGA CTCAGCCACC CTCGGTGTCA GTGGCCCCAG GAAAGACGGC CAGGATTAAC
121 TGTGGGGGAA ACAACATTGA ATATAGAAGT GTGCACTGGT ACCAGCAGAA GTCAGGCCAG
181 GCCCCTGTAG CGGTCACTTA TGATAATAGT GACCGGCCCT CAGGGATCCC TGAGCGATTC
241 TCTGGTTCCA AATCTGGGAA CACGGCCACC CTGACCATCA GCAGGGTCGA AGCCGGGGAT
301 GAGGCCGACT ATTACTGTCA GGTGTGGGAT ATTAGTAGTG ATGTGGTCTT CGGCGGAGGG
361 ACCAAGCTGA CCGTCTTAGG TCAGCCCAAG GCTGCCCCCT CGGTCACTCT GTTCCGCCCC
421 TCCTCTGAGG AGCTTCAAGC CAACAAGGCC AACTGCTGTG GTCTCATAAG TGAATTCTAC
481 CCGGGAGCCG TGACAGTGGC CTGGAAGGCA GATAGCAGCC CCGTCAAGGC GGGAGTGGAG
541 ACCACCACAC CCTCCAAACA AAGCAACAAC AAGTACGCGG CCAGCAGCTA TCTGAGCCTG
601 ACGCCTGAGC AGTGAAGTGC CCACAGAAGC TACAGCTGCC AGGTCACGCA TGAAGGGAGC
661 ACCGTGGAGA AGACAGTGGC CCCTACAGAA TGTTTCATAG

```

5

SEC. ID. N.º: 5: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA DEL HIBRIDOMA M57.

1 ATGGACTGGA CCTGGAGGTT CCTCTTTGTG GTGGCAGCAG CTACAGGTGT CCAGTCCCAG
 61 GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GGTCCCTCGGT GAAGGTCTCC
 121 TGCAAGGCTT CTGGAGGCAC CTTCAACAGG TATACTGTCA ACTGGGTGCG ACAGGCCCCCT
 181 GGACAAGGGC TTGAGTGGAT GGGAGGCATC ATCCCTATCT TTGGTACAGC AAACCTACGCA
 241 CAGAGGTTCC AGGGCAGACT CACCATTACC GCGGACGAAT CCACGAGCAC AGCCTACATG
 301 GAGCTGAGCA GCCTGAGATC TGATGACACG GCCGTGTATT TCTGTGCGAG AGAGAATCTC
 361 GATAATTTCG GGACTTATTA TTATTTCTCA GGCTGGTTCG ACCCCTGGGG CCAGGGAACC
 421 CTGGTCACCG TCTCCTCAGC CTCCACCAAG GGCCCATCGG TCTTCCCCCT GGCACCCCTC
 481 TCCAAGAGCA CCTCTGGGGG CACAGCGGCC CTGGGCTGCC TGGTCAAGGA CTACTTCCCC
 541 GAACCGGTGA CGGTGTCTG GAACCTCAGG GCCCTGACCA GCGGCGTGCA CACCTTCCCC
 601 GCTGTCCTAC AGTCTCAGG ACTCTACTCC CTCAGCAGCG TGGTGACCGT GCCCTCCAGC
 661 AGCTTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC GTGAATCACA AGCCCAGCAA CACCAAGGTG
 721 GACAAGAGAG TTGAGCCCAA ATCTTGTGAC AAAACTCACA CATGCCCACC GTGCCCAGCA
 781 CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCACTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC
 841 ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGCG GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
 901 GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
 961 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCA
 1021 GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC
 1081 ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG
 1141 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
 1201 TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
 1261 AAGACCACGC CTCCCCTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC
 1321 GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT
 1381 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG A

SEC. ID. N.º: 6: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA DEL HIBRIDOMA M57.

1 ATGAGTGTCC CCACCATGGC CTGGGCTCTG CTCCTCCTCA GCCTCCTCAC TCAGGGCACA
 61 GGATCCTGGG CTCAGTCTGC CCTGACTCAG CCTCGCTCAG TGTCCGGGTC TCCTGGACAG
 121 TCAGTACCA TCTCCTGCAC TGGAACCAGC AGTGATATTG GTGGTTATAA CTTTGTCTCC
 181 TGGTACCAAC AACACCCAGG CAAAGCCCC AAACCTCATGA TTTATGATGC CACTAAGCGG
 241 CCCTCAGGGG TCCCTGATCG CTTCTCTGGC TCCAAGTCTG GCAACACGGC CTCCCTGACC
 301 ATCTCTGGGC TCCAGGCTGA GGATGAGGCT GATTATTACT GCTGCTCATA TGCAGGCGAC
 361 TACACCCCGG GCGTGGTTTT CGGCGGAGGG ACCAAGCTGA CCGTCCTAGG TCAGCCCAAG
 421 GCTGCCCCCT CGGTCACTCT GTTCCCGCCC TCCTCTGAGG AGCTTCAAGC CAACAAGGCC
 481 AACTGAGTGT GTCTCATAAG TGACTTCTAC CCGGGAGCCG TGACAGTGCC CTGGAAGGCA
 541 GATAGCAGCC CCGTCAAGGC GGGAGTGGAG ACCACCACAC CCTCCAAACA AAGCAACAC
 601 AAGTACGCGG CCAGCAGCTA CCTGAGCCTG ACGCCTGAGC AGTGGAGTGC CCACAGAAGC
 661 TACAGCTGCC AGGTACGCA TGAAGGGAGC ACCGTGGAGA AGACAGTGCC CCCTACAGAA
 721 TGTTCATAG

5

SEC. ID. N.º: 7: SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL HIBRIDOMA JA.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISASGHSTYL
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDREVTMIVVLNNGGF DYWGQGR
 VTVSS

10

SEC. ID. N.º: 8: SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL HIBRIDOMA JA.

EIVLTQSPATLSLSPGERATLACRASQTASRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDTSNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLSSISLEPEDFAVYYCQQRFNWPWTFGQGTKVEFKRT

SEC. ID. N.º: 9: SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL
HIBRIDOMA JB.1.

5

QITLKETGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWVTLIYWDDDKR
YSPSLENRV TIRKDT SKNQVALTMTNMDPLDTGTYYCAHRQHISFPWFDSWGQGT LVTV
SS

SEC. ID. N.º: 10: SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL
HIBRIDOMA JB.1.

10

SYVLTQPPSVSVAPGKTARINCGGNNIEYRSVHWYQQKSGQAPVAVIYDNSDRPSGIPER
FSGSKSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDISSDVVFEGGGTKLTVL

SEC. ID. N.º: 11: SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL
HIBRIDOMA M57.

15

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFNRYTVNWRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANY
AQRFGRLTITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYFCARENLDNSGTYYYFSGWFDPWGQG
TLVTVSS

SEC. ID. N.º: 12: SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL
HIBRIDOMA M57.

20

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDIGGYNFVSWYQQHPGKAPKLMIYDATKRPSGV
PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYCCSYAGDYTPGVVFEGGGTKLTVL

SEC. ID. N.º: 13: VHEXPRESS CON EL PROMOTOR CMV.

GTGGCCACCA	TGGGATGGAG	CTGTATCATC	CTCTTCTTGG	TAGCAACAGC	TACAGGTAAG
GGGTTAACAG	TAGCAGGCTT	GAGGTCTGGA	CATATATATG	GGTGACAATG	ACATCCACTT
TGCCTTTCTC	TCCACAGGCG	CGCACTCCCA	GGTCCAACTG	CAGGAGAGCG	GGGTCAACCGT
CTCCTCAGGT	GAGTCCTGTC	GACGGATCCA	CCCAATGCCC	ATGAGCCCAG	AACTGGACG
CTGAACCTCG	CGGACAGTTA	AGAACCAGG	GGCCTCTGCG	CCCTGGGCCC	AGCTCTGTCC
CACACCGCG	TCACATGGCA	CCACCTCTCT	TGCAGCCTCC	ACCAAGGGCC	CATCGGTCTT
CCCCCTGGCA	CCCTCCTCCA	AGAGCACCTC	TGGGGGCACA	GCGGCCCTGG	GCTGCCTGGT
CAAGGACTAC	TTCCCCGAAC	CGGTGACGGT	GTCGTGGAAC	TCAGGCGCCC	TGACCAGCGG
CGTCCACACC	TTCCCCGGCTG	TCCTACAGTC	CTCAGGACTC	TACTCCCTCA	GCAGCGTAGT
GACCGTGCCC	TCCAGCAGCT	TGGGCACCCA	GACCTACATC	TGCAACGTGA	ATCACAAGCC
CAGCAACACC	AAGGTGGACA	AGAAAGTTGG	TGAGAGGCCA	GCACAGGGAG	GCAGGGTGTG
TGCTGGAAGC	CAGGCTCAGC	GCTCCTGCCT	GGACGCATCC	CGGCTATGCA	GCCCCAGTCC
AGGGCAGCAA	GGCAGGCCCC	GTCTGCCTCT	TCACCCGGAG	GCCTCTGCCC	GCCCCACTCA
TGCTCAGGGA	GAGGGTCTTC	TGGCTTTTTC	CCCAGGCTCT	GGGCAGGCAC	AGGCTAGGTG
CCCCTAACCC	AGGCCCTGCA	CACAAAGGGG	CAGGTGCTGG	GCTCAGACCT	GCCAAGAGCC
ATATCCGGGA	GGACCTGCCC	CCTGACCTAA	GCCCACCCCA	AAGGCCAAAC	TCTCCACTCC
CTCAGCTCGG	ACACCTTCTC	TCCTCCAGAG	TTCCAGTAAC	TCCCAATCTT	CTCTCTCCAG
AGCCCAAATC	TTGTGACAAA	ACTCACACAT	GCCCACCGTG	CCCAGGTAAG	CCAGCCCAGG
CCTCGCCCTC	CAGCTCAAGG	CGGGACAGGT	GCCCTAGGGT	AGCCTGCATC	CAGGGACAGG
CCCCAGCCGG	GTGCTGACAC	GTCCACCTCC	ATCTCTTCTT	CAGCACCTGA	ACTCCTGGGG
GGACGCTGGA	TCTTCTCTTT	CCCCCAAAA	CCCAAGGACA	CCCTCATGAT	CTCCGGGACC
CCTGAGGTCA	CATGCGTGGT	GGTGGACGTG	AGCCACGAAG	ACCCTGAGGT	CAAGTTC AAC
TGGTACGTGG	ACGGCGTGGA	GGTGCATAAT	GCCAAGACAA	AGCCGCGGGA	GGAGCAGTAC
AACAGCACGT	ACCGTGTGGT	CAGCGTCCTC	ACCGTCTGTC	ACCAGGACTG	GCTGAATGGC
AAGGAGTACA	AGTGCAAGGT	CTCCAACAAA	GCCCTCCAG	CCCCATCGA	GAAAACCATC
TCCAAAGCCA	AAGGTGGGAC	CCGTGGGGTG	CGAGGGCCAC	ATGGACAGAG	GCCGGTCTCG
CCCACCTCT	GCCCTGAGAG	TGACCGCTGT	ACCAACCTCT	GTCCCTACAG	GGCAGCCCCG
AGAACCACAG	GTGTACACCC	TGCCCCCATC	CCGGGATGAG	CTGACCAAGA	ACCAGGT CAG
CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG	GCTTCTATCC	CAGCGACATC	GCCGTGGAGT	GGGAGAGCAA
TGGGACGCG	GAGAACAAC	ACAAGACCAC	GCCCTCCCGT	CTGGACTCCG	ACGGCTCCTT
CTTCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG	CAGCAGGGGA	ACGTCTTCTC
ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA	CCACTACACG	CAGAAGAGCC	TCTCCTTAAG
TCCGGGAAAA	TAATCTAGAA	GCTCGCTGAT	CAGCCTCGAC	TGTGCCTTCT	AGTTGCCAGC
CATCTGTTGT	TTGCCCCCTC	CCCGTGCCCT	CCTTGACCC	GGAAGGTGCC	ACTCCCCTG
TCTTTCTCTA	ATAAAATGAG	GAAATTGCAT	CGCATTGTCT	GAGTAGGTGT	CATTCTATT
TGGGGGGTGG	GGTGGGGCAG	GACAGCAAGG	GGGAGGATTG	GGAAGACAAT	GCAAGCAGGT
CTGGGGATGG	CCCGGGCTCT	ATGGCTTCTG	AGGCGGAAAG	AACCAGCTGG	GGCTCTAGGG
GGTATCCCCA	CGCGCCCTGT	AGCGCGCAT	TAAGCGCGGC	GGGTGTGGTG	GTTACGCGCA
GCGTGACCGC	TACACTTGCC	AGCGCCCTAG	CGCCCGCTCC	TTTCGCTTTC	TTCCCTTCTC
TTCTCGCCAC	GTTCCGCCGC	TTTCCCGCTG	AAGCTCTAAA	TGCGGGCATC	CCTTTAGGGT
TCCGATTTAG	TGCTTTACGG	CACCTCGACC	CCAAAAA	TGATTAGGGT	GATGGTTTAC
GTAGTGGGCC	ATCGCCCTGA	TAGACGGTTT	TTCCGCCCTT	GACGTTGGAG	TCCACGTTCT
TTAATAGTGG	ACTCTTGTTT	CAAACTGGAA	CAAACTCAA	CCCTATCTCG	GTCTATTCTT
TTGATTTATA	AGGGATTTTG	GGGATTTCCG	CCTATTGGTT	AAAAATGAG	CTGATTTAAC
AAAAATTTAA	CGCGAATTAA	TTCTGTGGAA	TGTGTGTCAG	TTAGGGTGTG	GAAAGTCCCC
AGGCTCCCCA	GGCAGGCAGA	AGTATGCAAA	GCATGCATCT	CAATTAGTCA	GCAACCAGGT
GTGGAAAGTC	CCCAGGCTCC	CCAGCAGGCA	GAAGTATGCA	AAGCATGCAT	CTCAATTAGT
CAGCAACCAT	AGTCCCGCCC	CTAACTCCGC	CCATCCCGCC	CCTAACTCCG	CCCAGTTCCG
CCCATTCTCC	GCCCTTAGGC	TGACTAATTT	TTTTTATTTA	TGCAGAGGCC	GAGGCCGCCT
CTGCCTCTGA	GCTATTCCAG	AAGTAGTGAG	GAGGCTTTTT	TGGAGGCCA	GGCTTTTGCA
AAAAGCTCCC	GGGAGGTCCA	CAATGATTGA	ACAAGATGGA	TTGCACGCAG	GTTCTCCGGC
CGCTTGGGTG	GAGAGGCTAT	TCGGCTATGA	CTGGGCACAA	CAGACAATCG	GCTGCTCTGA
TGCCGCGGTG	TTCCGGCTGT	CAGCGCAGGG	GCGCCCGGTT	CTTTTTGTCA	AGACCGACCT
GTCCGGTGCC	CTGAATGAAC	TCCAGGACGA	GGCAGCGCGG	CTATCGTGSC	TGGCCACGAC
GGGCGTTCTT	TGCGCAGCTG	TGCTCGACGT	TGTCACTGAA	GCGGGAAGGG	ACTGGCTGCT
ATTGGGCGAA	GTGCCGGGGC	AGGATCTCCT	GTCATCTCAC	CTTGCTCTCT	CCGAGAAAGT
ATCCATCATG	GCTGATGCAA	TGCGGCGGCT	GCATACGCTT	GATCCGGCTA	CCTGCCCCAT
CGACCACCAA	GCGAAACATC	GCATCGAGCG	AGCACGTACT	CGGATGGAAG	CCGGTCTTGT
CGATCAGGAT	GATCTGGACG	AAGAGCATCA	GGGGCTCGCG	CCAGCCGAAC	TGTTCCGCCAG
GCTCAAGGCG	CGTATGCCCG	ACGGCGAGGA	TCTCGTCGTG	ACTCATGGCG	ATGCGCTGCT
CGCGAATATC	ATGGTGGAAA	ATGGCCGCTT	TTCTGGATTG	ATCGACTGTG	GCGGCGTGGG
TGTGGCGGAC	CGCTATCAGG	ACATAGCGTT	GGCTACCCGT	GATATTGCTG	AAGAGCTTGG

```

CGGCGAATGG GCTGACCGCT TCCTCGTGCT TTACGGTATC GCCGCTCCCG ATTTCGAGCG
CATCGCCTTC TATCGCCTTC TTGACGAGTT CTTCTGAGCG GGACTCTGGG GTTCGAAATG
ACCGACCAAG CGACGCCAA CCTGCCATCA CGAGATTTTCG ATTCCACCGC CGCCTTCTAT
GAAAGGTTGG GCTTCGGAAT CGTTTTCGG GACGCCGGCT GGATGATCCT CCAGCGCGGG
GATCTCATGC TGGAGTTCTT CGCCACCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC
AAATAAAGCA ATAGCATCAC AAATTTACA AATAAAGCAT TTTTTCCTACT GCATTCTAGT
TGTGGTTTGT CCAAACCTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GTATACCGGA TCTTTCGGCT
TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC
TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA
GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAAGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT
AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC
CCGACAGGAG TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT
GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCTTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG
CTTTCTCAAT GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTTCG CTCCAAGCTG
GGCTGTGTGC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTTATCCGG TAACTATCGT
CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGAACAGG
ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC
GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA
AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT
GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT
TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCAAGAGA
TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT TTAATTAATA AATGAAGTTT TAAATCAATC
TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT
ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA
ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA
CGCTCACCGG CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA
AGTAGGTCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA
TAAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATGCTAC AGGCCTCGTG
GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA
GTTACATGAT CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT
GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT
CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA
TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGSCGTCAAT ACGGGATAAT
ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TCCGGGGCGA
AAACTCTCAA GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC
AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG
CAAAATGCCG CAAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAT GTTGAATACT CATACTCTTC
CTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTATATCAG GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT
GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA
CCTGACGTCA GATCGACGGA TCGGGAGATC AGGTACCGAA TTCACATTGA TTATTGAGTA
GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT TAGTTCATAG CCCATATATG GAGTTCGCGC
TTACATAACT TACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCC CGCCCATGTA
CGTCAATAAT GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG GACTTTCCAT TGACGTCAAT
GGGTGGACTA TTTACGGTAA ACTGCCACT TGGCAGTACA TCAAGTGTAT CATATGCCAA
GTACGCCCCC TATTGACGTC AATGACGGTA AATGGCCCGC CTGGCATTAT GCCCAGTACA
TGACCTTATG GGACTTTCCT ACTTGGCAGT ACATCTACGT GTTAGTCATC GCTATTACCA
TAGTGATGCG GTTTTGGCAG TACATCAATG GCGGTGGATA GCGGTTTGAC TCACGGGGAT
TTCCAAGTCT CCACCCCATT GACGTCAATG GGAGTTTGT TTGGCACCAA AATCAACGGG
ACTTTCACAA ATGTCGTAAC AACTCCGCC CATTGACGCA AATGGGCGGT AGGCGTGTAC
GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTTTCT GGCTAACTAG AGAACCCACT GCTTACTGGC

```

SEC. ID. N.º: 14: VH-N, SECUENCIA CODIFICANTE BASADA EN DP-47.

```

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGGCGGT
CGAGTCTACT GGGGCCAGGG AACCCTGGTC ACCGTCTCCT

```

SEC. ID. N.º: 15: ELEMENTO ANTI-REPRESOR 40 (NÚMERO DE ACCESO AY190756).

GATCAAGAAA GCACTCCGGG CTCCAGAAGG AGCCTTCCAG GCCAGCTTTG AGCATAAGCT
GCTGATGAGC AGTGAGTGTC TTGAGTAGTG TTCAGGGCAG CATGTTACCA TTCATGCTTG
ACTTCTAGCC AGTG TGACGA GAGGCTGGAG TCAGGTCTCT AGAGAGTTGA GCAGCTCCAG
CCTTAGATCT CCCAGTCTTA TGC GGTGTGC CCATTGCTT TGTGTCTGCA GTCCCCTGGC

CACACCCAGT AACAGTTCTG GGATCTATGG GAGTAGCTTC CTTAGTGAGC TTTCCCTTCA
AATACTTTGC AACCAGGTAG AGAAGTTTGG AGTGAAGGTT TTGTTCTTCG TTTCTTCACA
ATATGGATAT GCATCTTCTT TTGAAAATGT TAAAGTAAAT TACCTCTCTT TTCAGATACT
GTCTTCATGC GAACTTGGA TCCTGTTTCC ATCCCAGCCT TCTATAACCC AGTAACATCT
TTTTTGAAAC CAGTGGGTGA GAAAGACACC TGGTCAGGAA CGCGGACCAC AGGACAACCTC
AGGCTCACCC ACGGCATCAG ACTAAAGGCA AACAAGGACT CTGTATAAAG TACCGGTGGC
ATGTGTATTA GTGGAGATGC AGCCTGTGCT CTGCAGACAG GGAGTCACAC AGACACTTTT
CTATAATTTT TTAAGTGCTT TGAATGTTCA AGTAGAAAGT CTAACATTAA ATTTGATTGA
ACAATTGTAT ATTCATGGAA TATTTTGGAA CGGAATACCA AAAAATGGCA ATAGTGGTTC
TTTCTGGATG GAAGACAAAC TTTTCTTCTT TAAAATAAAT TTTATTTTAT ATATTTGAGG
TTGACCACAT GACCTTAAGG ATACATATAG ACAGTAAACT GGTTACTACA GTGAAGCAAA
TTAACATATC TACCATCGTA CATAGTTACA TTTTTTTGTG TGACAGGAAC AGCTAAAATC
TACGTATTTA ACAAACTCC TAAAGACAAT ACATTTTAT TAACTATAGC CCTCATGATG
TACATTAGAT C

5 SEC. ID. N.º: 16: INSERTO PACI-ECORI QUE CONTENIE VLCL EN P2 FAB-HER2.

TTAATTAAAA TTCTATTTCA AGGAGACAGT CATAATGAAA AAATTATTAT TCGCAATTCC
TTTAGTTGTT CCTTTCTATT CTCACAGTGC AGATATCCAG ATGACCCAGT CCCCAGCTC
CCTGTCCGCC TCTGTGGGCG ATAGGGTCAC TATCACCTGC CGTGCCAGTC AGGATGTGAG
TACTGCTGTA GCCTGGTATC AACAGAAACC AGGAAAAGCT CCGAAACTAC TGATTTACTC
GGCATCCTTC CTCTAATCTG GAGTCCCTTC TCGCTTCTCT GGATCCAGAT CTGGGACGGA
TTTCACTCTG ACCATCAGCA GTCTGCAGCC GGAAGACTTC GCAACTTATT ACTGTCAGCA
ATTCTATACT ACTCCTCCCA CGTTCGGACA GGGTACCAAG GTGGAGATCA AACGTGGAAC
TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC GCCATCTGAT GAGCAGTTGA AATCTGGAAC
TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC TGAATAACTT CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA
GGTGGATAAC GCCCTCCAAT CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA
GGACAGCACC TACAGCCTCA GCAGCACCTT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA
CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGT TCACCGGTGA CAAAGAGCTT
CAACAGGGGA GAGTGTTAAT AAGAATTC

SEC. ID. N.º: 17: INSERTO HINDIII-NOTI QUE CONTIENE DOS VHCH1 EN P2FAB-HER2.

AAGCTTTGGA GCCTTTTTTT TGGAGATTTT CAACATGAAA TACCTATTGC CTACGGCAGC
 CGCTGGATTG TTATTACTCG CGGCCAGGCC GGCCATGGCC GAGGTTGAGC TGGTGGAGTC
 TGGCGGTGGC CTGGTGCAGC CAGGGGGCTC ACTCCGTTTG TCCTGTGCAG CTTCTGGCTT
 CAACATTAAA GACACCTATA TACACTGGGT GCGTCAGGCC CCGGTAAGG GCCTGGAATG
 GGTGCAAGG ATTTATCCTA CGAATGGTTA TACTAGATAT GCCGATAGCG TCAAGGGCCG
 TTTCACTATA AGCGCAGACA CATCCAAAAA CACAGCCTAC CTGCAGATGA ACAGCCTGCG
 TGCTGAGGAC ACTGCCGTCT ATTATTGTTT TAGATGGGGA GGGGACGGCT TCTATGCTAT
 GGACGTGTGG GGTCAAGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCAAGC GCCTCCACCA AGGGCCCATC
 GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCT TGGAACTCAG GCGCCCTGAC
 CAGCGGCGTC CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCTCAGCAG
 CGTAGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA
 CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGTTGAGCCC AAATCTTGTT CGGCAGCAGA
 ACAAAAATC ATCTCAGAAG AGGATCTGAA TGACGCCGCA CACCATCATC ATCACCATTA
 ATAAGGCGCG CCAATTCTAT TTCAAGGAGA CAGTCATAAT GAAAAAATTA TTATTGCGAA
 TTCTTTTAGT TGTTCTTTT TATTCTCACA GTGCAGAGGT TCAGCTGGTG GAGTCTGGCG
 GTGGCCTGGT GCAGCCAGGG GGCTCACTCC GTTGTCCTG TGCAGCTTCT GGCTTCACCT
 TCACAGACTA TACCATGGAC TGGGTGCGTC AGGCCCCGGG TAAGGGCCTG GAATGGGTTG
 CAGACGTGAA CCCAAACTCT GGGGGCTCTA TCTACAACCA GCGCTTCAAG GGTCGTTTCA
 CTCTGAGCGT AGACAGATCC AAAAACACAC TGTACCTGCA GATGAACAGC CTGCGTGCTG
 AGGACACTGC CGTCTATTAT TGTGCTAGAA ACCTGGGACC CTCTTTCTAC TTCGATTACT
 GGGGTCAAGG AACCCTGGTC ACCGTCTCAA GCGCCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC
 CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA
 AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG
 TCCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTAGTGA

 CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA
 GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGCGGCCGC

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una mezcla que comprende al menos dos anticuerpos diferentes y/o dos fragmentos de anticuerpos diferentes, en el que al menos dos anticuerpos y/o fragmentos comprenden regiones variables emparejadas y diferentes especificidades de unión, comprendiendo dicho procedimiento
- 5 (a) poner en contacto al menos tres regiones variables diferentes derivadas de cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas dentro de una célula en condiciones que permiten el emparejamiento de regiones variables;
- (i) en el que al menos una de dichas regiones variables es una región variable de cadena ligera compatible de emparejamiento; y
- 10 (ii) en el que se influye sobre la composición de la mezcla manipulando uno cualquiera de los parámetros que afectan el nivel de expresión de las regiones variables logrado en la célula; y
- (b) cosechar todos los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos que tienen especificidades de unión resultantes del citado emparejamiento.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los niveles de expresión están afectados por elementos de control tales como promotores, potenciadores, aisladores y antirrepresores.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que todas las regiones variables las producen una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican estas regiones variables.
4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la composición de la mezcla está influenciada por la expresión controlada de dichas regiones variables.
- 20 5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla comprende una mezcla de diferentes anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos y/o fragmentos de anticuerpos en una proporción dada particular.
6. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha región variable de cadena ligera de emparejamiento no contribuye significativamente a la especificidad de unión resultante del anticuerpo resultante y/o del fragmento de anticuerpo resultante.
- 25 7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para producir una composición que comprende al menos tres anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpo que tienen diferentes especificidades de unión.
8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos dos regiones variables diferentes se expresan a partir de uno o más ácidos nucleicos que codifican estas regiones variables, en donde la expresión de dichas regiones variables diferentes está sometida a la dirección de diferentes elementos de control.
- 30 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dichos elementos de control diferentes conducen a una expresión diferencial.
- 35 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha expresión diferencial es diferente en niveles de expresión y/o tiempo de expresión.
11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las regiones variables compatibles de emparejamiento que comprenden una región variable de cadena ligera compatible de emparejamiento están seleccionadas a partir de bibliotecas de anticuerpos con diversidad de síntesis en una región variable, bibliotecas con diversidad natural o bibliotecas con una combinación de diversidad natural y de síntesis.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las bibliotecas de anticuerpos son bibliotecas de presentación de fagos.
13. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las regiones variables compatibles de emparejamiento que comprenden una región variable de cadena ligera de emparejamiento están seleccionadas a partir de animales transgénicos.
- 45 14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un scFV fusionado a una región Fc.
15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los anticuerpos son anticuerpos IgM, IgE o IgG.

- 5 **16.** Una célula recombinante para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo ácidos nucleicos que codifican regiones variables conjuntamente con todos los elementos requeridos para la expresión génica y el emparejamiento, en donde dicha célula comprende medios para influir en la composición de la mezcla manipulando uno cualquiera de los parámetros que afectan al nivel de expresión de las regiones variables logrado en la célula.
- 17.** La célula de acuerdo con la reivindicación 16, que es una célula eucariota.
- 18.** Una colección de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-17.
- 10 **19.** Un procedimiento para seleccionar combinaciones de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos que tienen afinidad específica por al menos un epítipo diana, que comprende poner en contacto una colección de acuerdo con la reivindicación 18 con dicho epítipo diana y seleccionar combinaciones que muestran dicha afinidad específica.
- 20.** Un procedimiento para seleccionar combinaciones de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos que tienen afinidad específica por al menos dos epítopos diana, que comprende poner en contacto una colección de acuerdo con la reivindicación 18 con dichos dos epítopos diana y seleccionar combinaciones que muestran dicha afinidad específica.
- 15 **21.** Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dichos dos epítopos diana están asociados con una enfermedad o un trastorno.
- 22.** Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende además someter una combinación seleccionada de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a un ensayo biológico indicador de un efecto de la combinación sobre la enfermedad y/o el trastorno.
- 20 **23.** Un procedimiento para producir una mezcla que comprende al menos dos anticuerpos diferentes y/o fragmentos de anticuerpo, en los que dichos al menos dos anticuerpos y/o fragmentos comprenden regiones variables emparejadas y tienen diferentes especificidades de unión, comprendiendo dicho procedimiento
- poner en contacto al menos tres regiones variables diferentes derivadas de cadenas pesadas y cadenas ligeras de inmunoglobulinas dentro de una célula en condiciones que permiten el emparejamiento de regiones variables,
- 25 en donde al menos una de dichas regiones variables es una región variable de cadena ligera compatible de emparejamiento;
- cosechar todos los anticuerpos y/o fragmentos de los mismos que tienen especificidades de unión que resultan de dicho emparejamiento,
- 30 en donde las regiones variables se expresan a partir de uno o más ácidos nucleicos que codifican estas regiones variables,
- en donde la expresión de dichas regiones variables está sometida a la dirección de diferentes elementos de control.

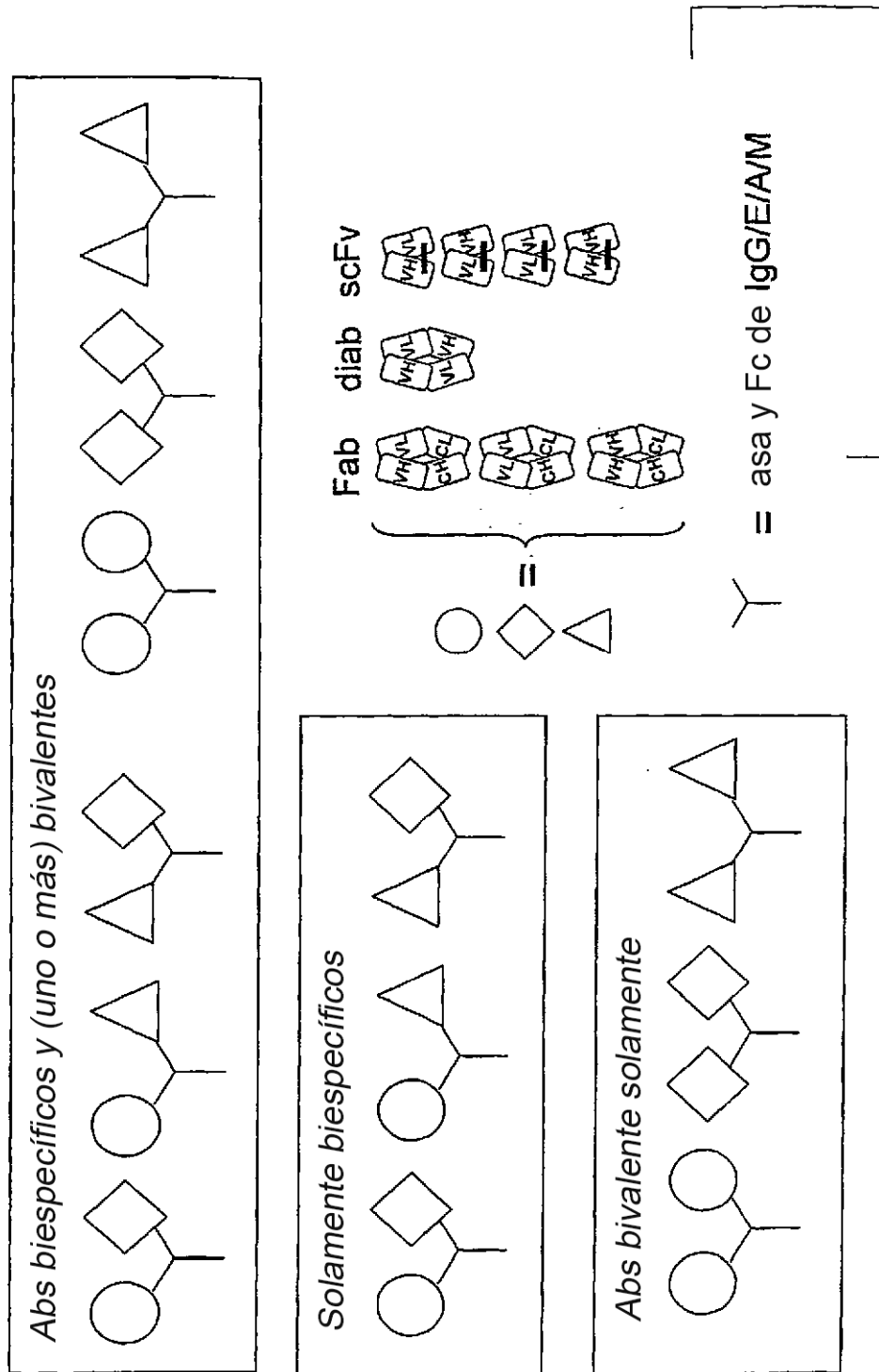


Figura 1

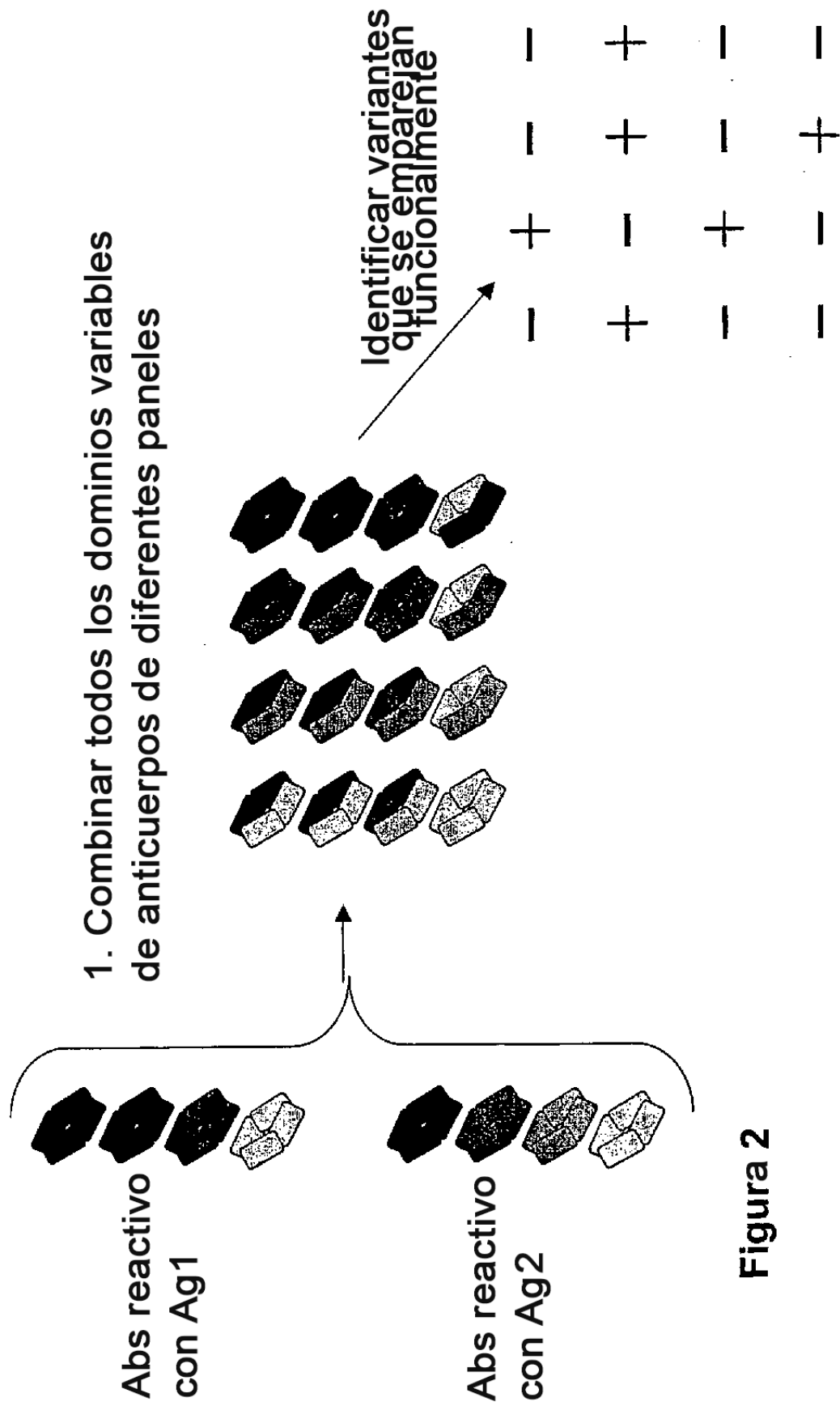


Figura 2

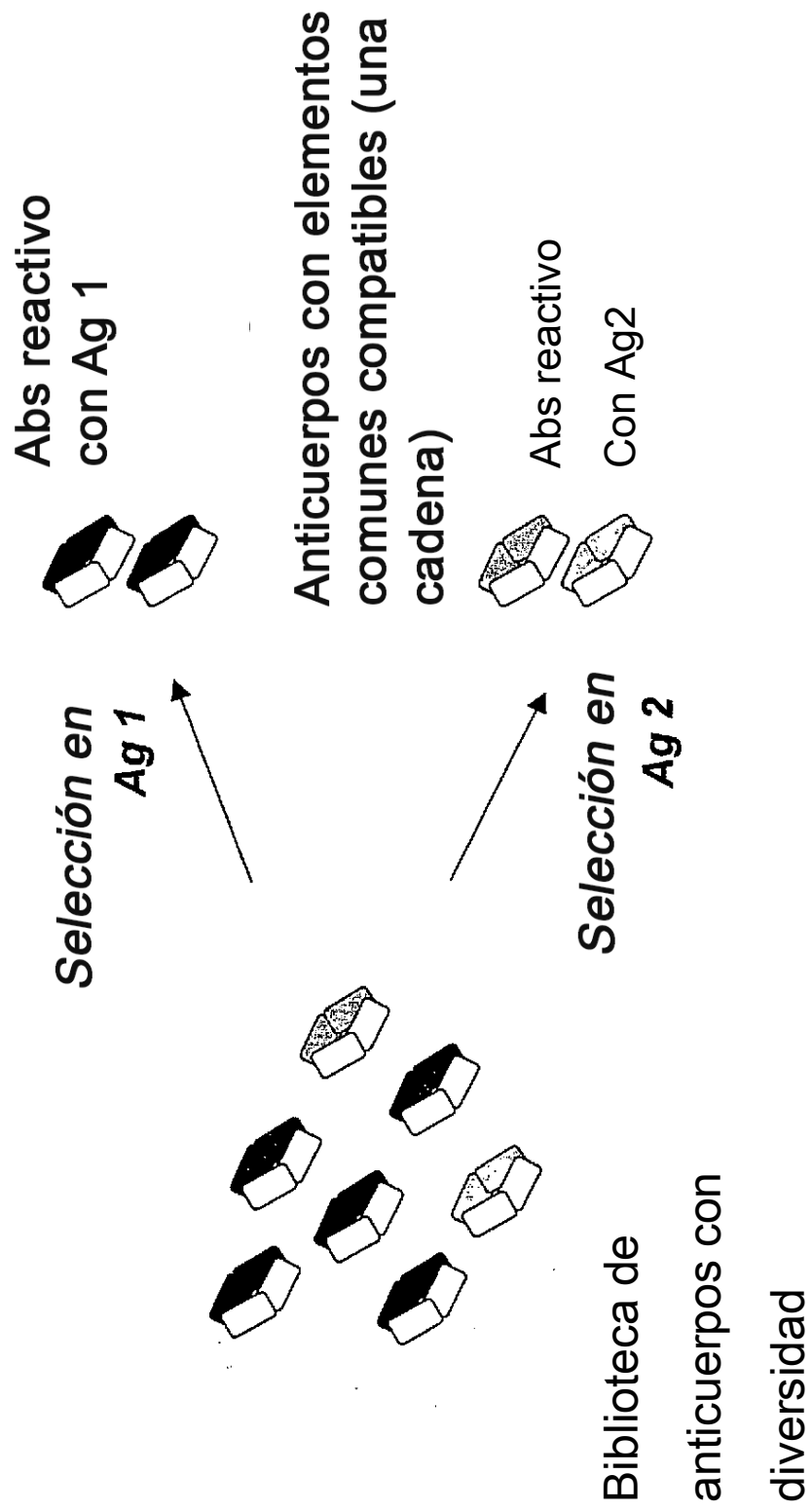


Figura 3

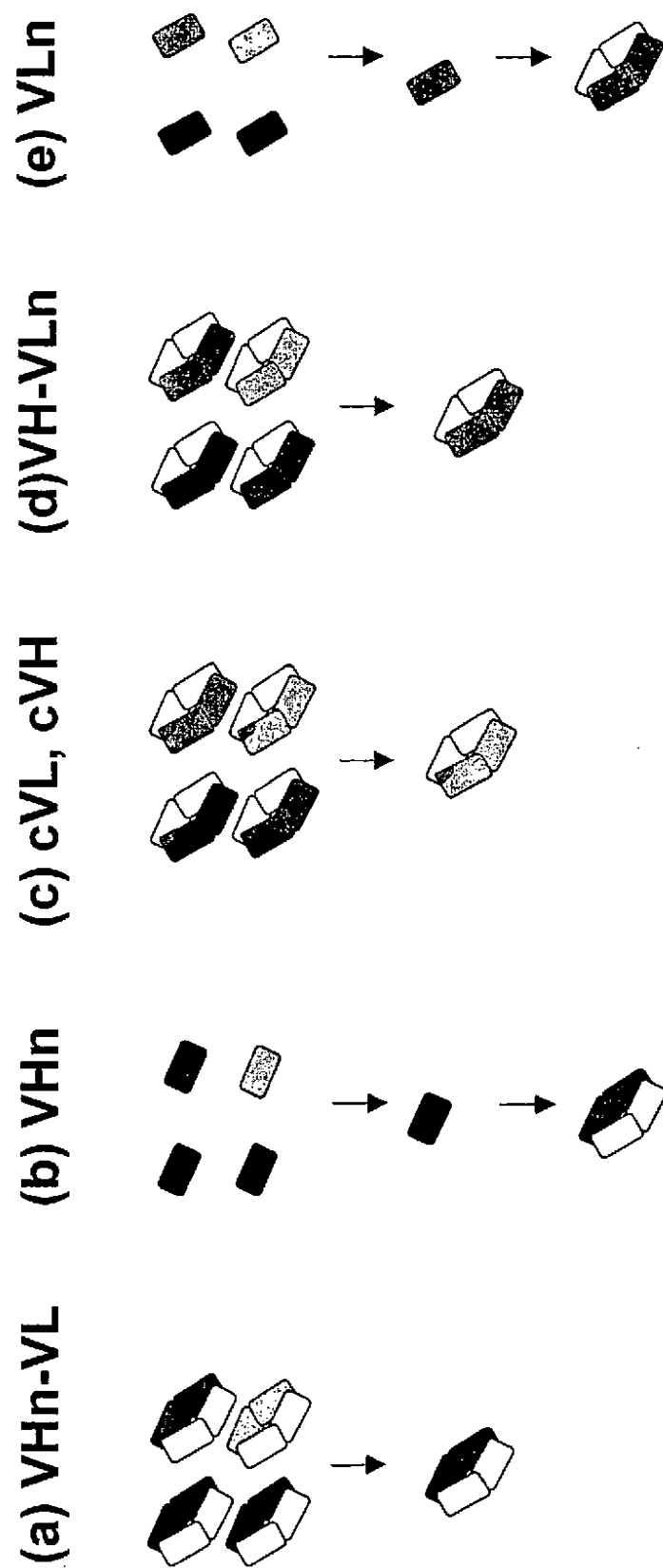


Figura 4

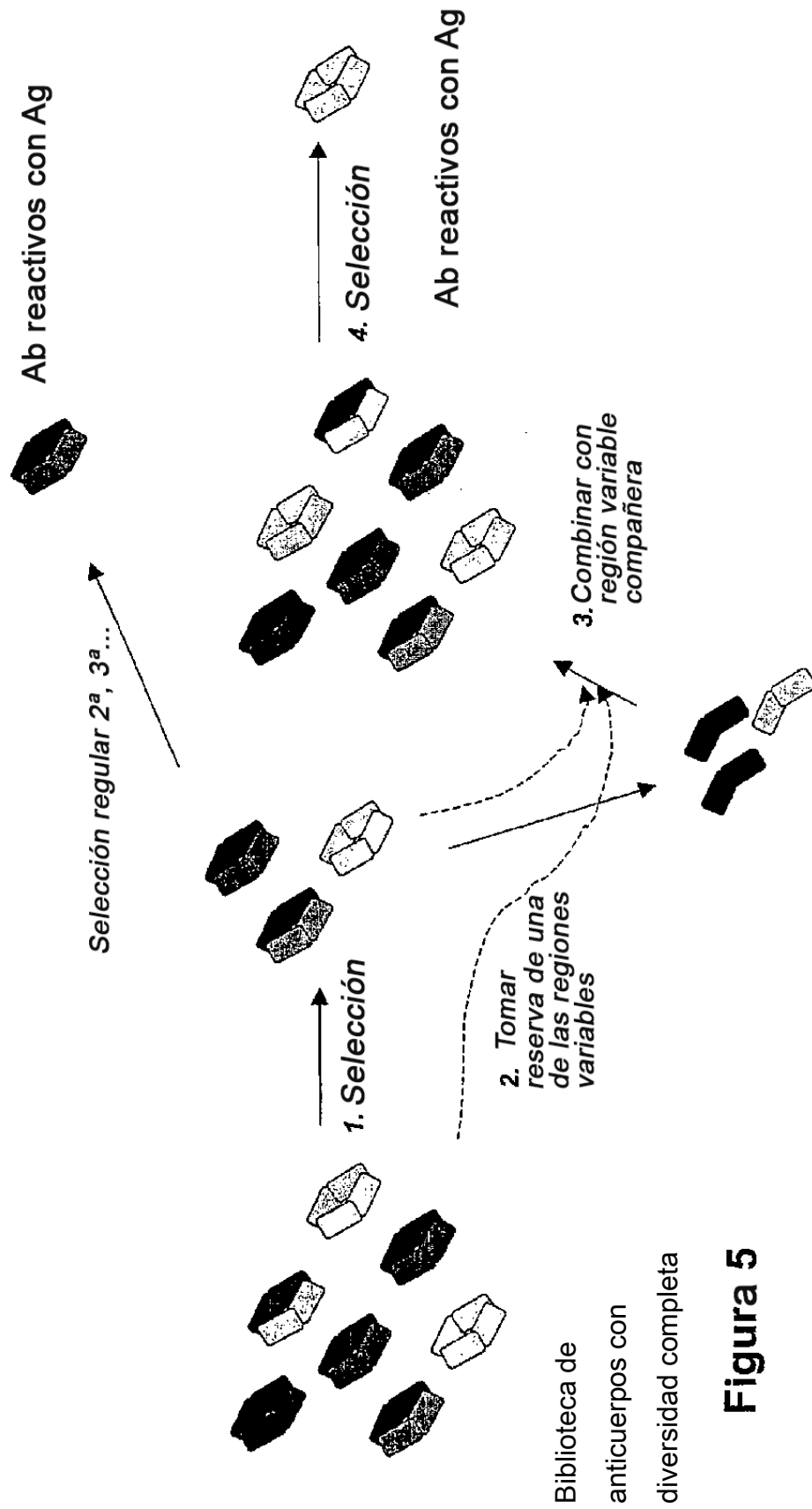
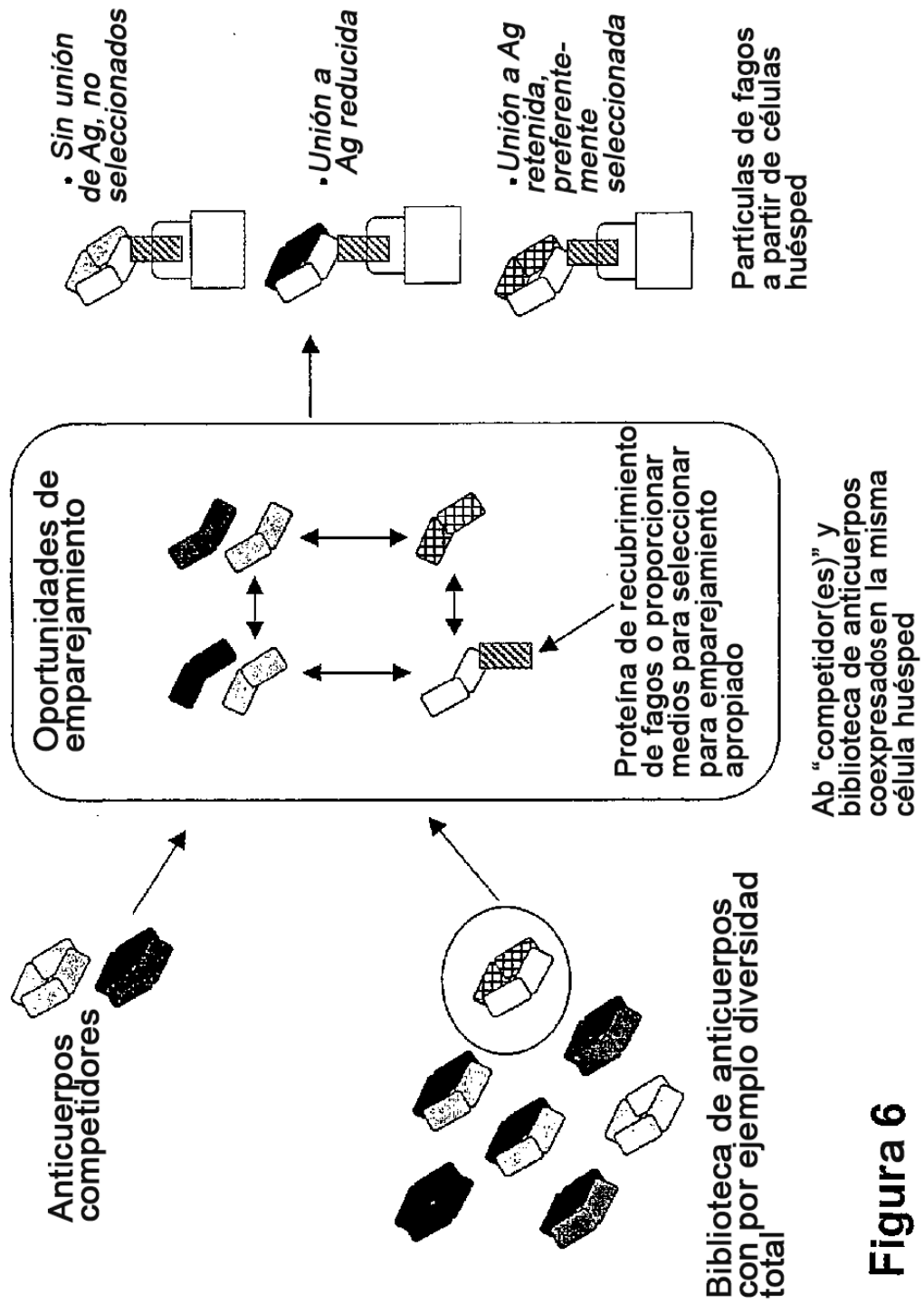


Figura 5



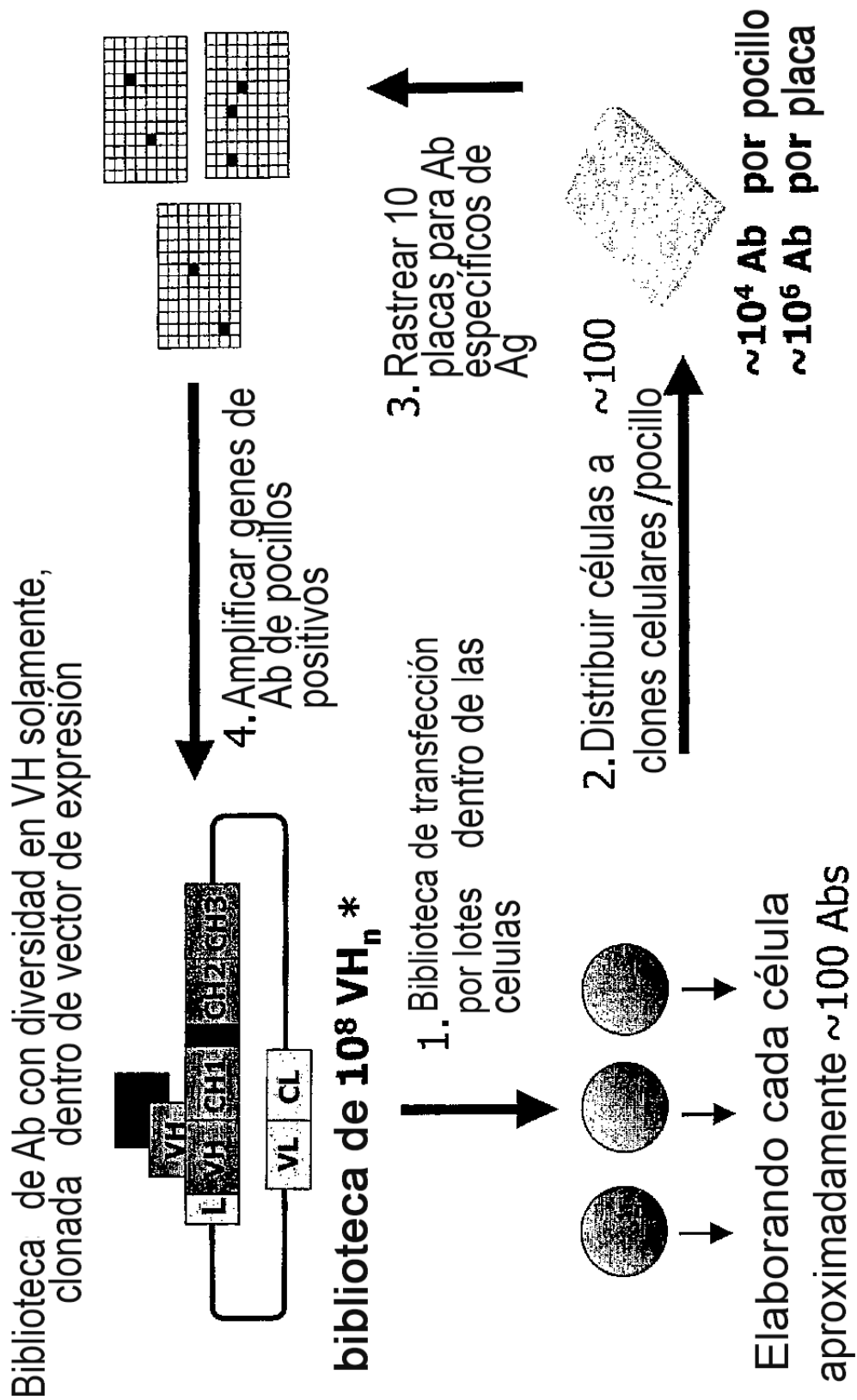


Figura 7

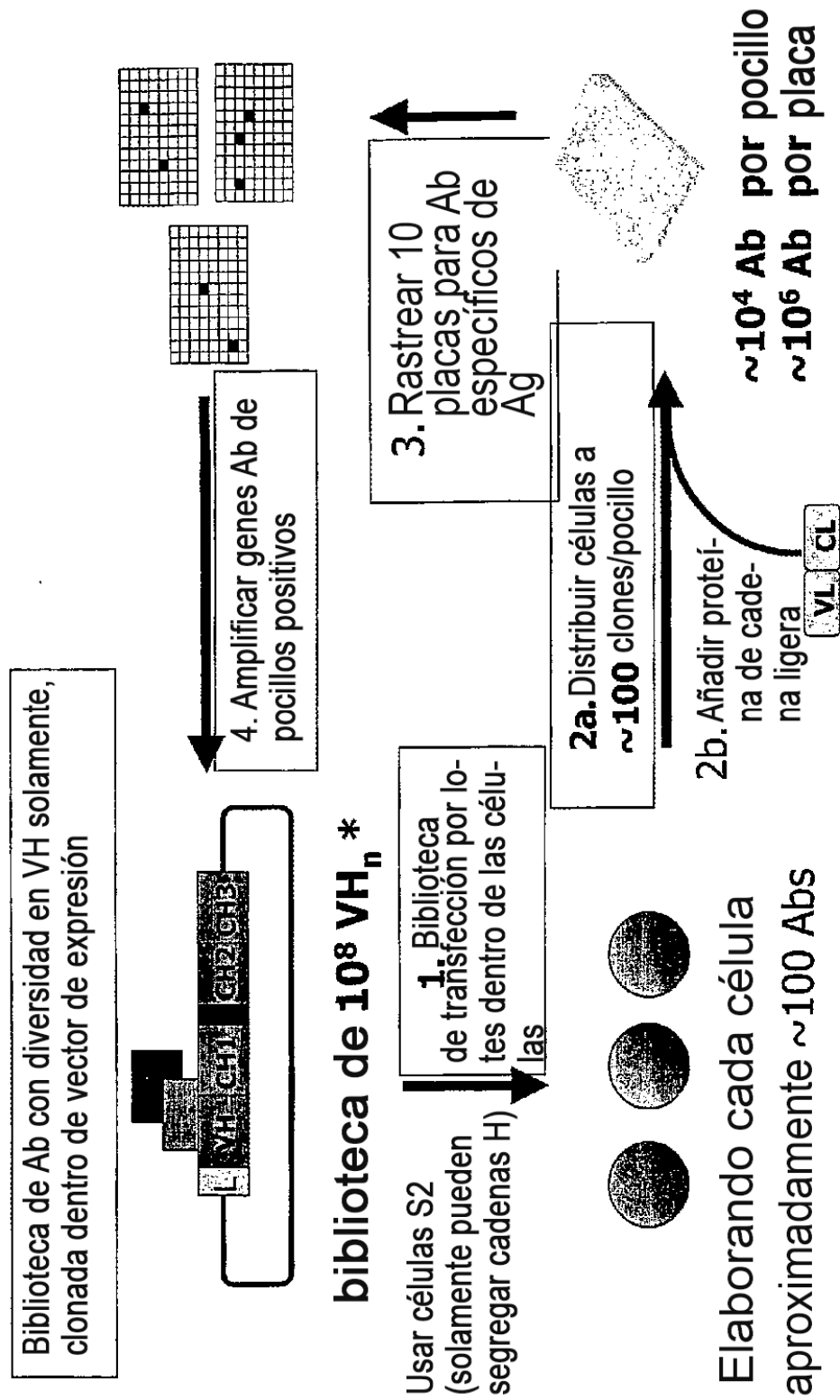


Figura 8

Punto de partida: panel de 10 Ab específicos de Ag con diversidad en VH solamente, clonados en vector de expresión eucariótica

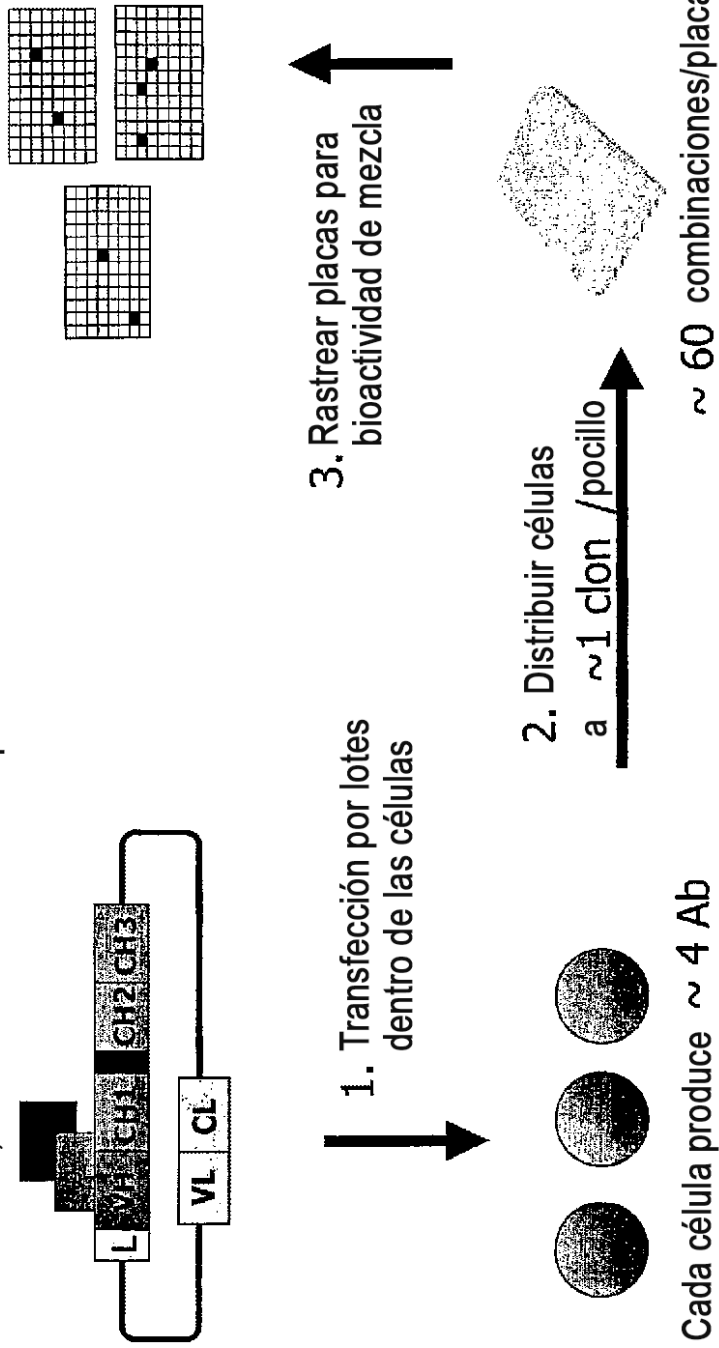


Figura 9

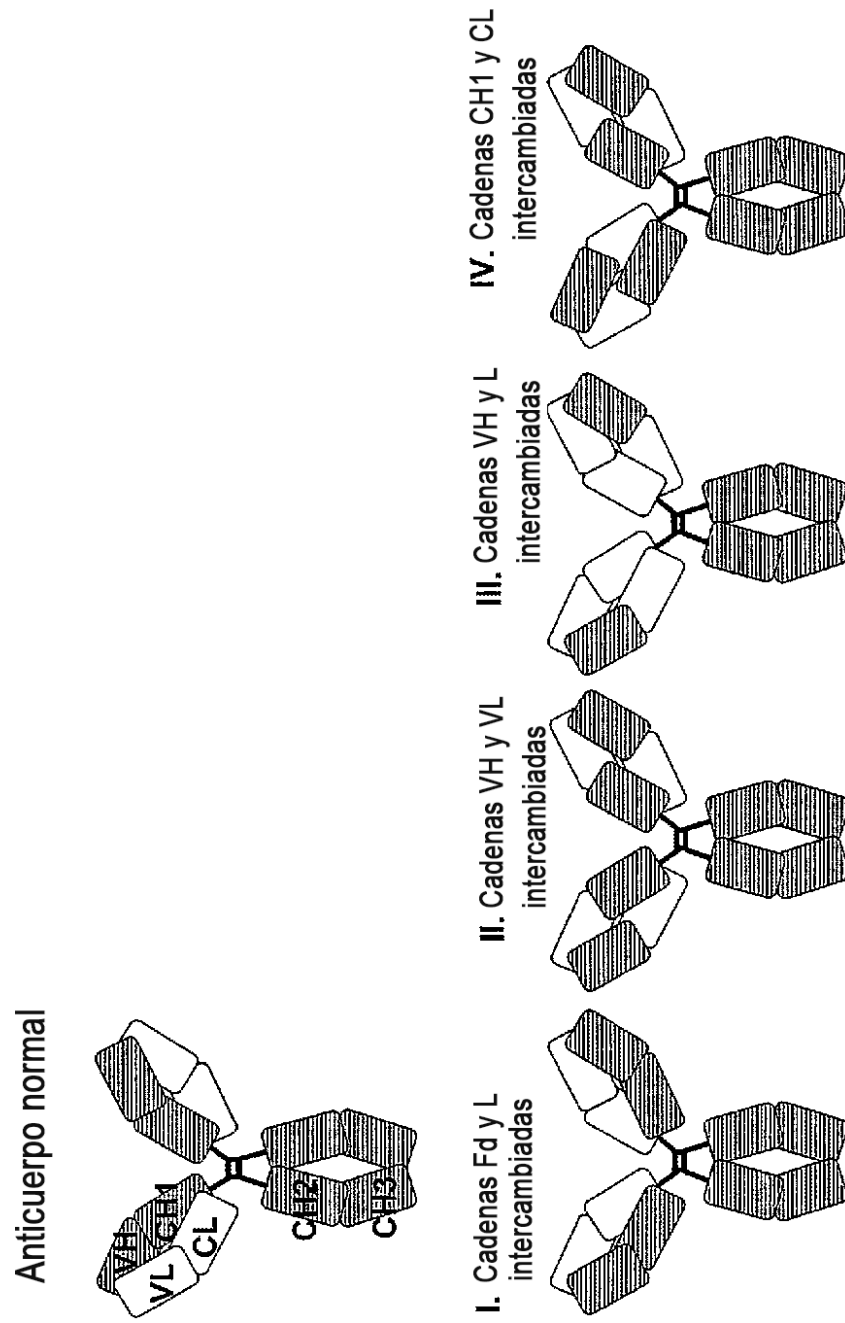
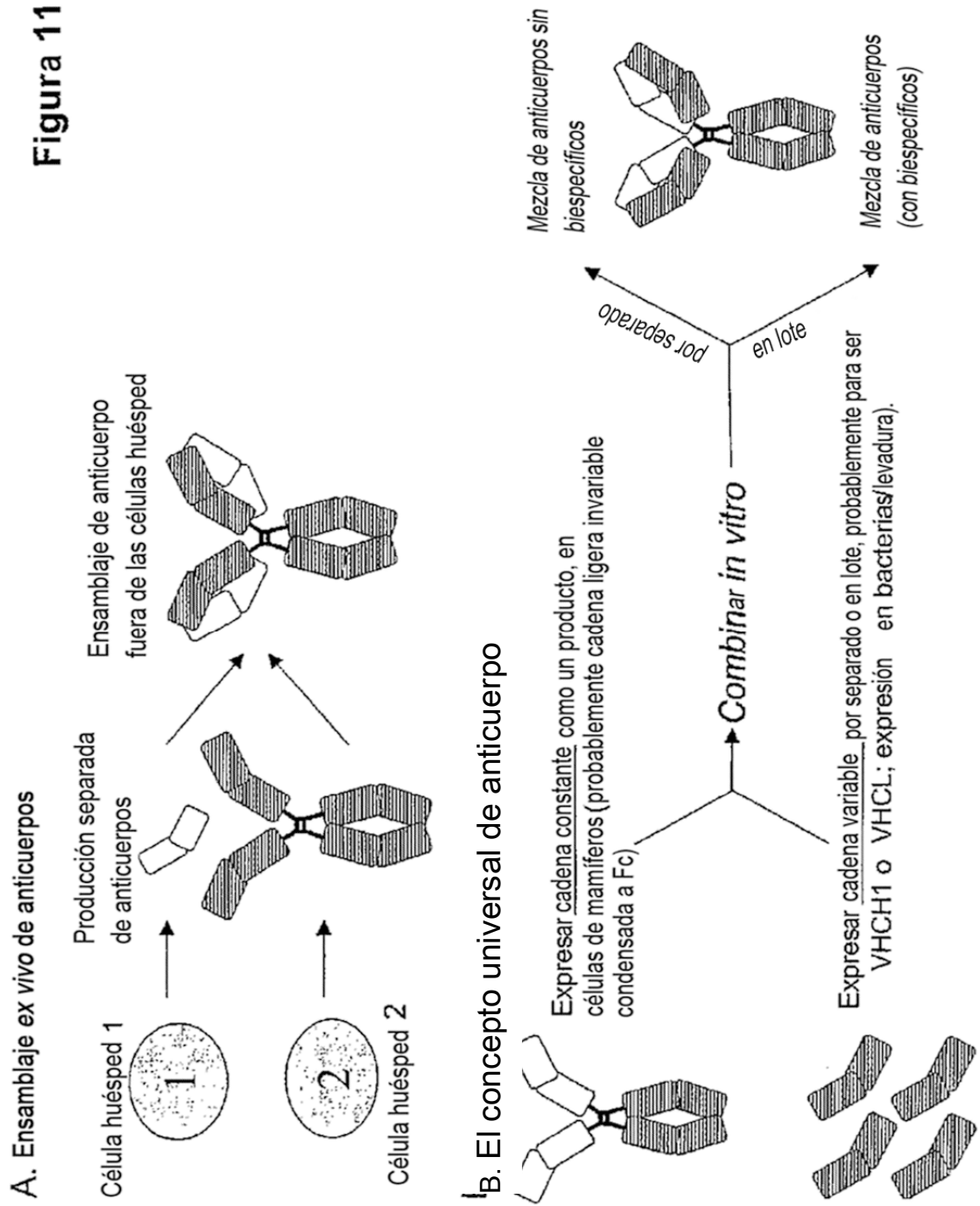


Figura 10

Figura 11



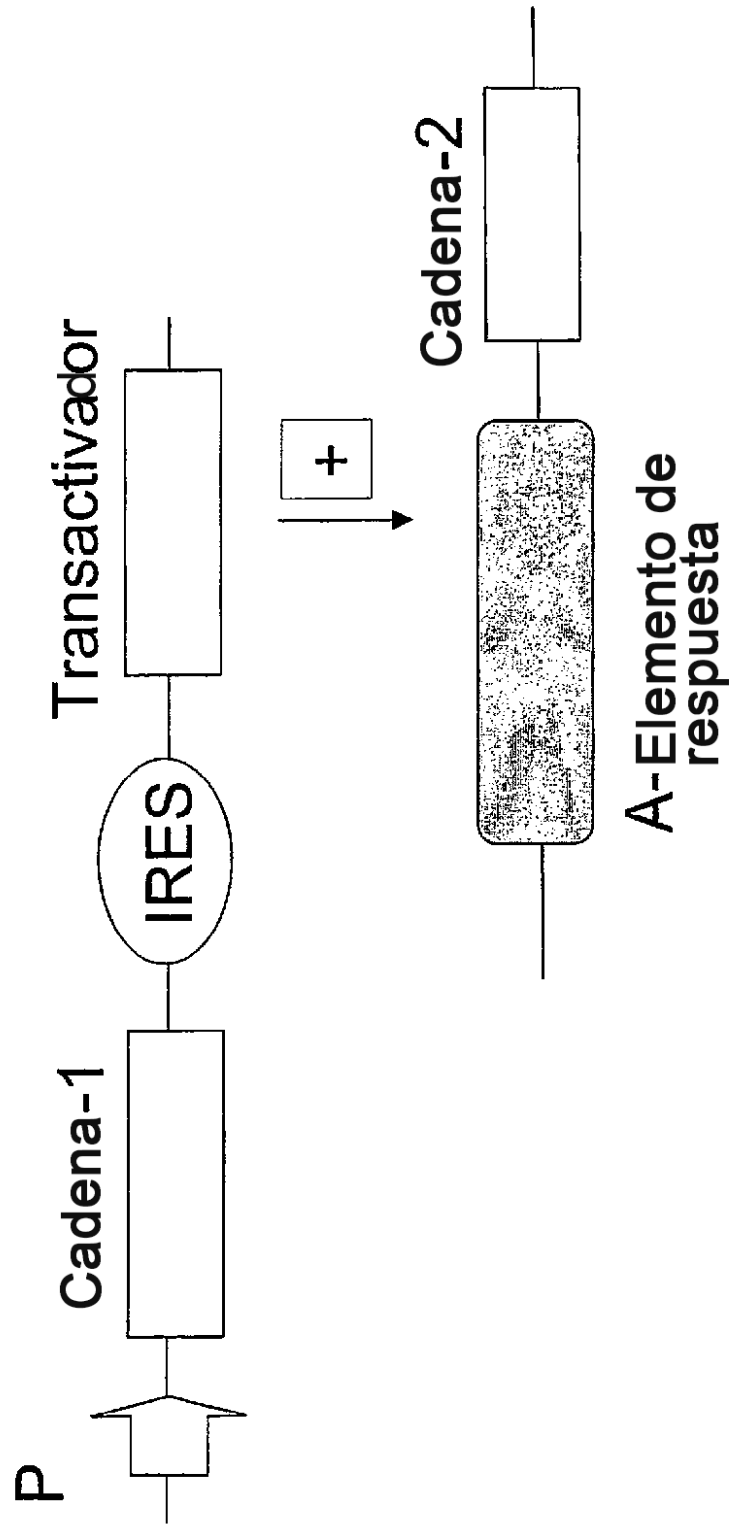


Figura 12

Secuencia de poliengarce pSCFV

```

-- lder pel B      -- inserción de VH      --engarce--
A  A  A  P  A  A  M  A  Q  V  Q  L  Q  V  T  V  S  S  G  G  G
GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCA CAG GTC CAA CTG CAG GTC ACC GTC TCG AGT GGT GGA GGC
---SfiI-----
--PstI-
--XhoI--
--NcoI---
--BstNI-
--engarce-----
G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  G  S  D  I  E  L  T  E  I  K
GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT ATC GAG CTC ACT GAG ATC AAA
--EcoRV- -Sali--
-----
R  A  A  A  E  Q  K  L  I  S  E  E  D  L  N  *
CGG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT TAA
---NotI---
-----etiqueta de c-myc-----

```

Sitios de enzimas:

```

SfiI : GGCCNNNN/NGGCC
NotI : GC/GGCCGC
ApaI : GTGCA/C
XhoI : C/TCGAG
SacI : GAGCT/C
PstI : CTGCA/G
NcoI : C/CATGG
Sali :GTCGAC
BstEII: GGTNACC
EcoRV : GAT/ATC

```

• La secuencia de poliengarce de pSCFV, un plásmido basado en pUC119 adecuado para clonación por etapas de regiones variables de anticuerpos y expresión de fragmentos de scFv.

Figura 13

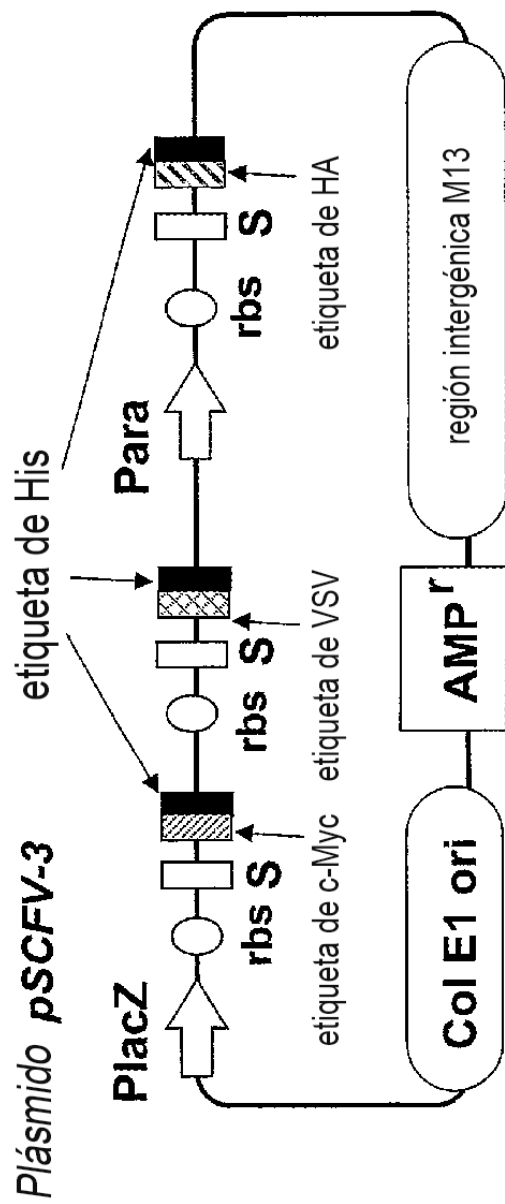


Figura 14A

Plásmido pSCFV-JA-JB-M57

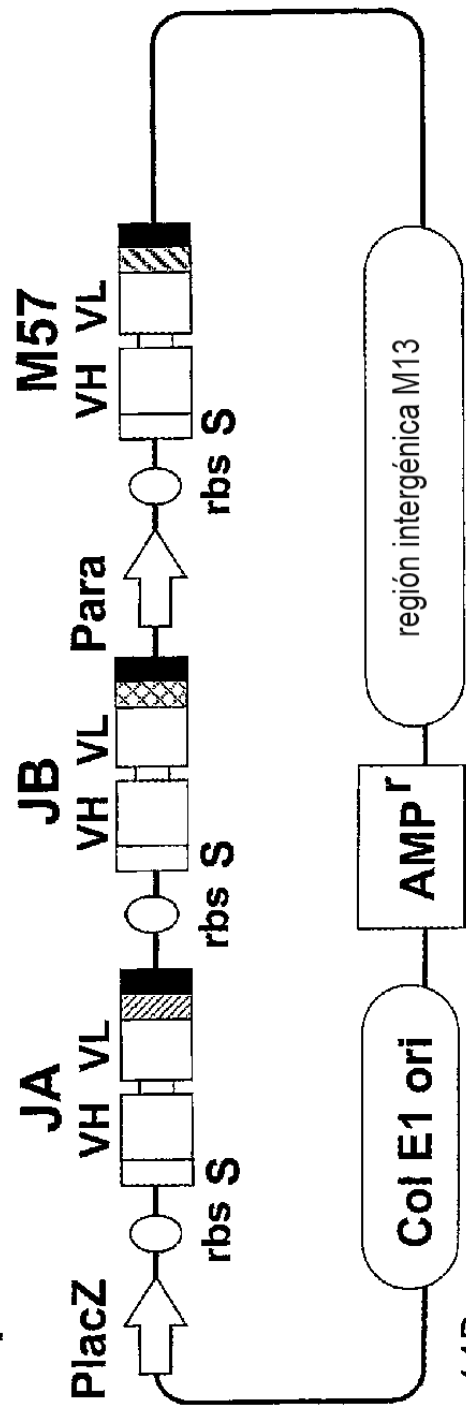


Figura 14B

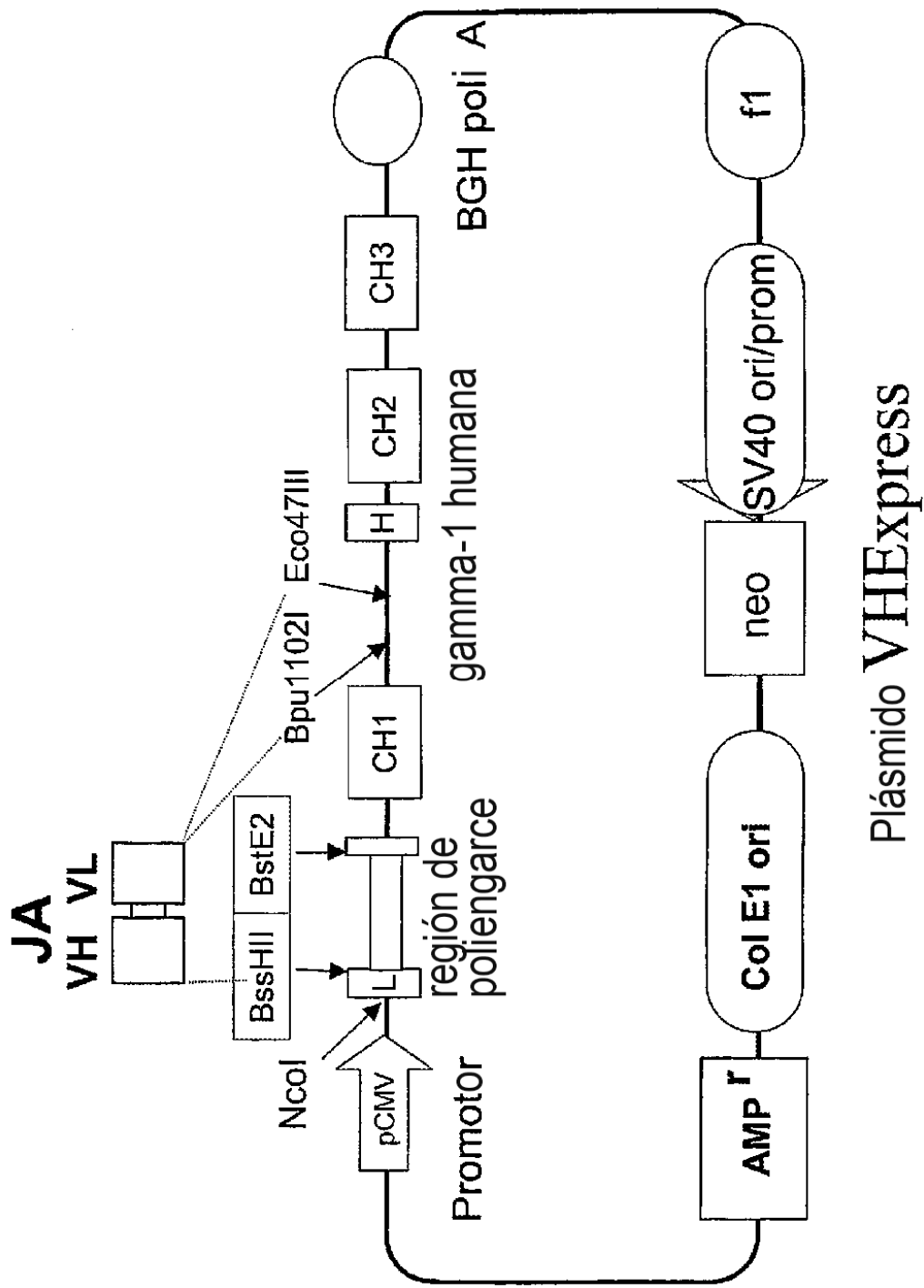


Figura 15

Comparación de cadenas ligeras de tres hibridomas

Clon	CDR1	CDR2	CDR3
JA :	EIVLTQSPATLSLSPGERATLAC RASQTASRYLA	WYQOKPGQAPRELLIY DTSNRAT GIPARFSGSGGTDFTLSISLEPEDEFAVIYC QORENWFMT	FGQGTKVEFKRT
JB :	SYVLTPPFSVAPGKTARINC GNNIEYRSVH	WYQOKSGQAPVAVIY DNSDRPS GIPERFSGSKSGNTATLTISRVEAGDEADYIC QVWDISSDVV	EGGGTKLTVL
M57:	QSALTQPRSVSGSPGQSVTTISC TGTSSDIGGYNFVS	WYQQHPGKAPKIMYI DATRRPS GVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYIC CSYAGDYTPGVV	EGGGTKLTVL

Figura 16

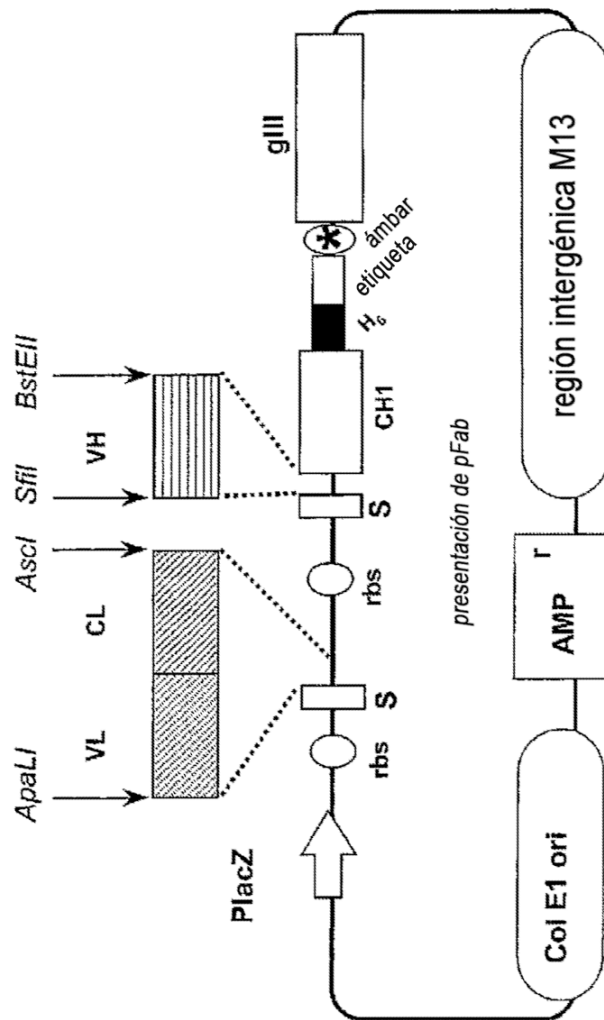
[illegible]

Figura 17

CDR1 CDR2 CDR3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYAMS WVRQAPGKGLEWVS AISASGHSTYLLADSVKKG

RETISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAK DREVTMIVVLNGGEDY WGQGRVTVSS

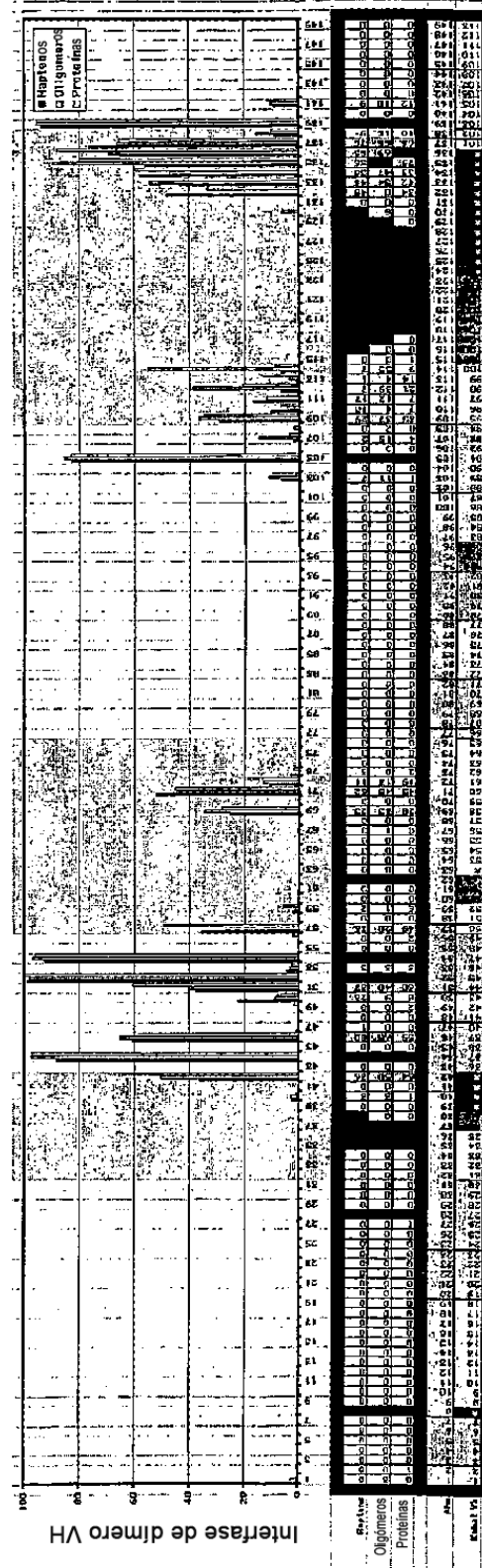
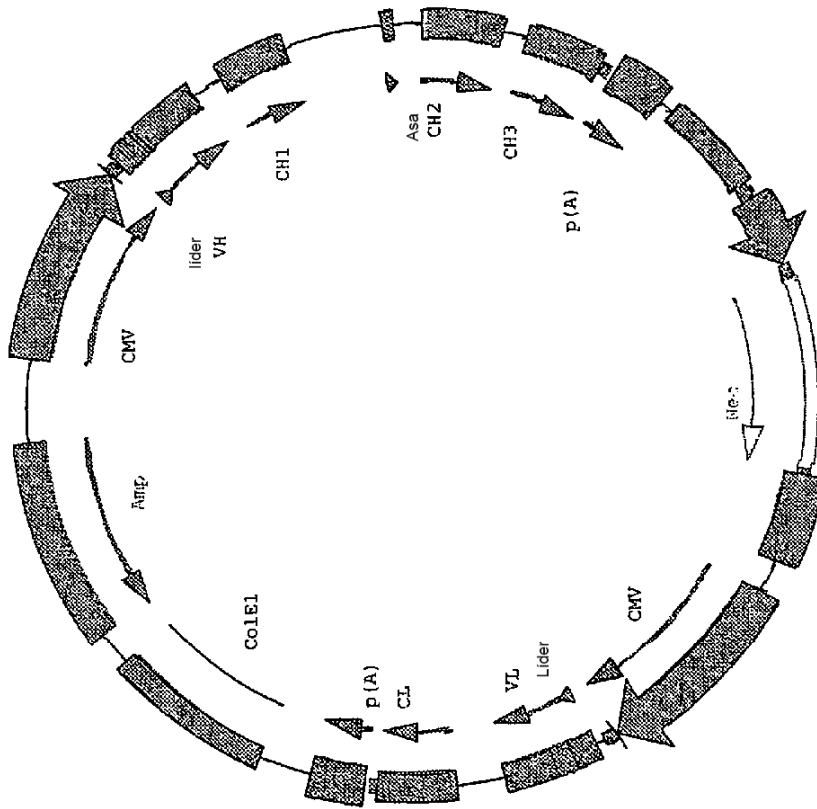
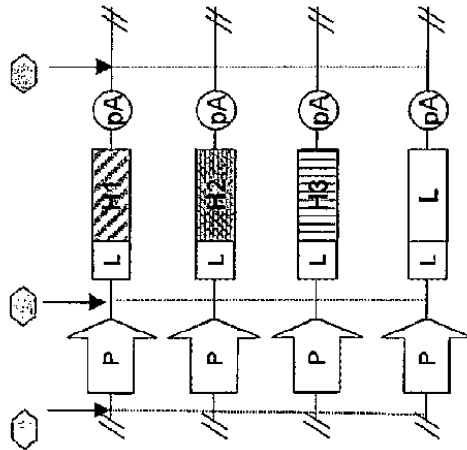


Figura 18



• Figura 19

Casetes de expresión eucariótica para tres genes de cadena pesada de anticuerpos diferentes y un gen de cadena ligera común



Base de vector de expresión eucariótica para cassette(s)

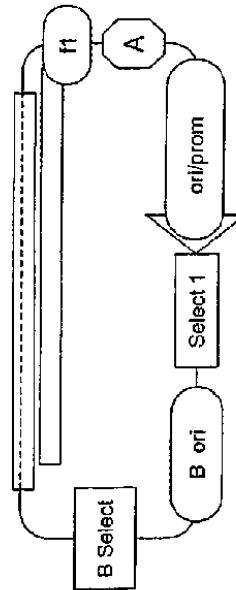
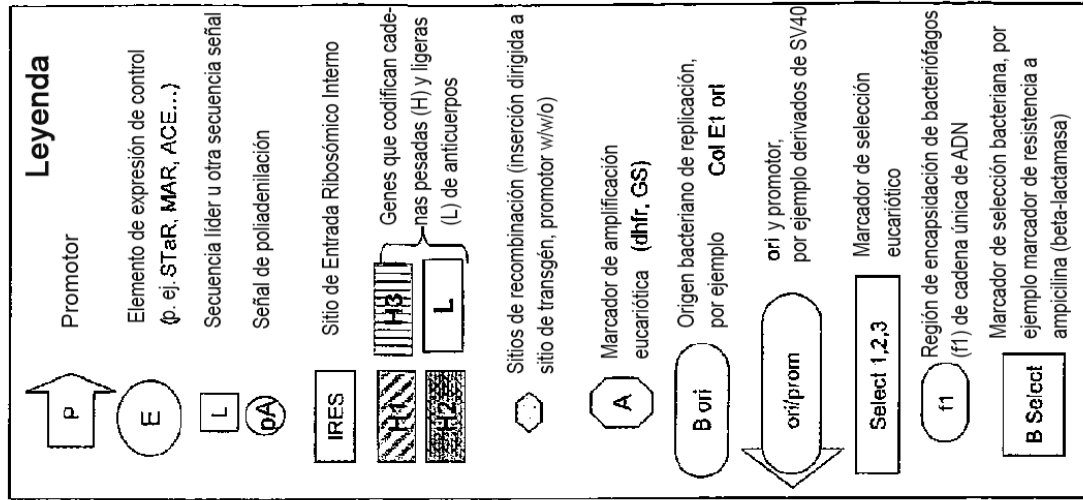


Figura 20



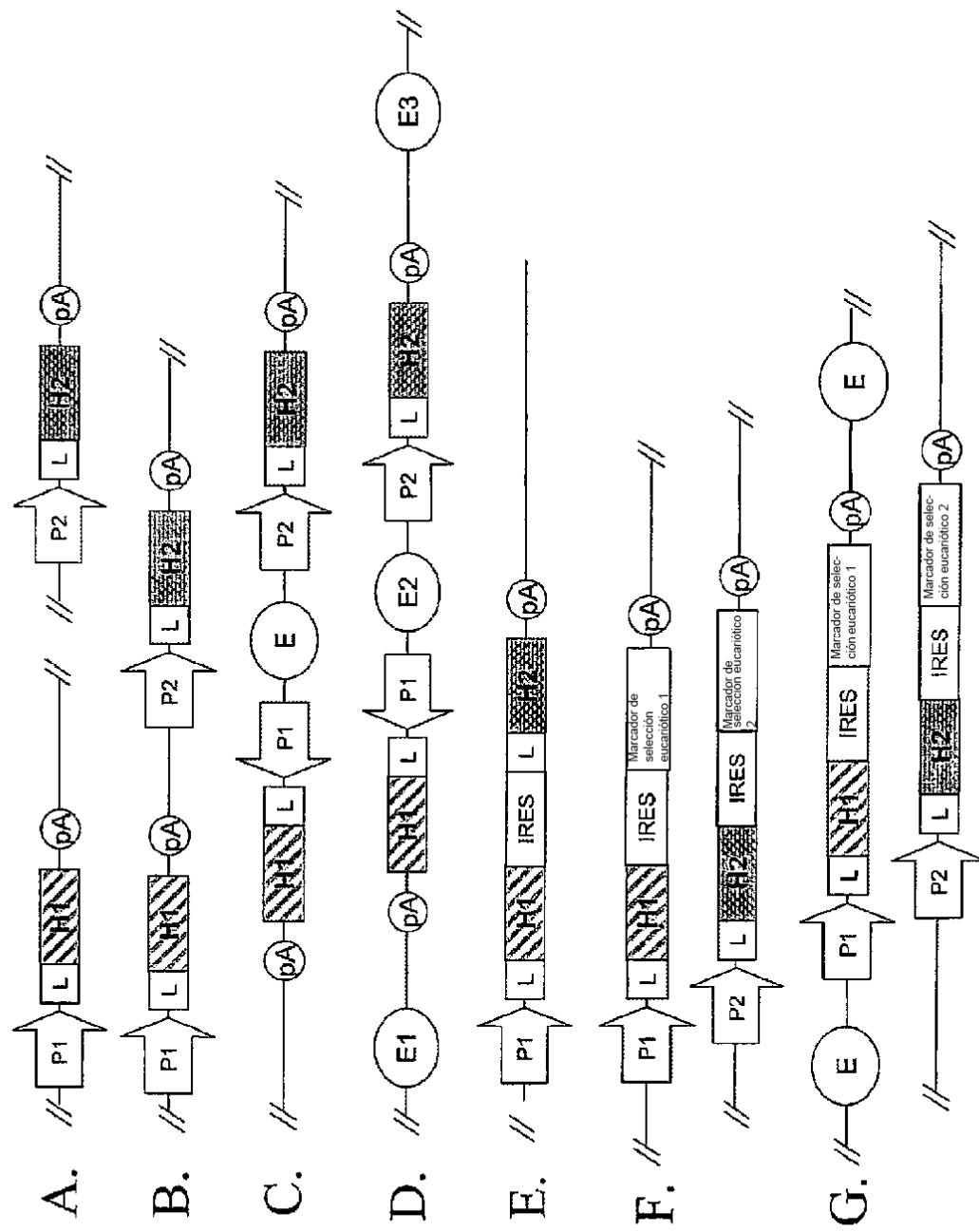


Figura 21

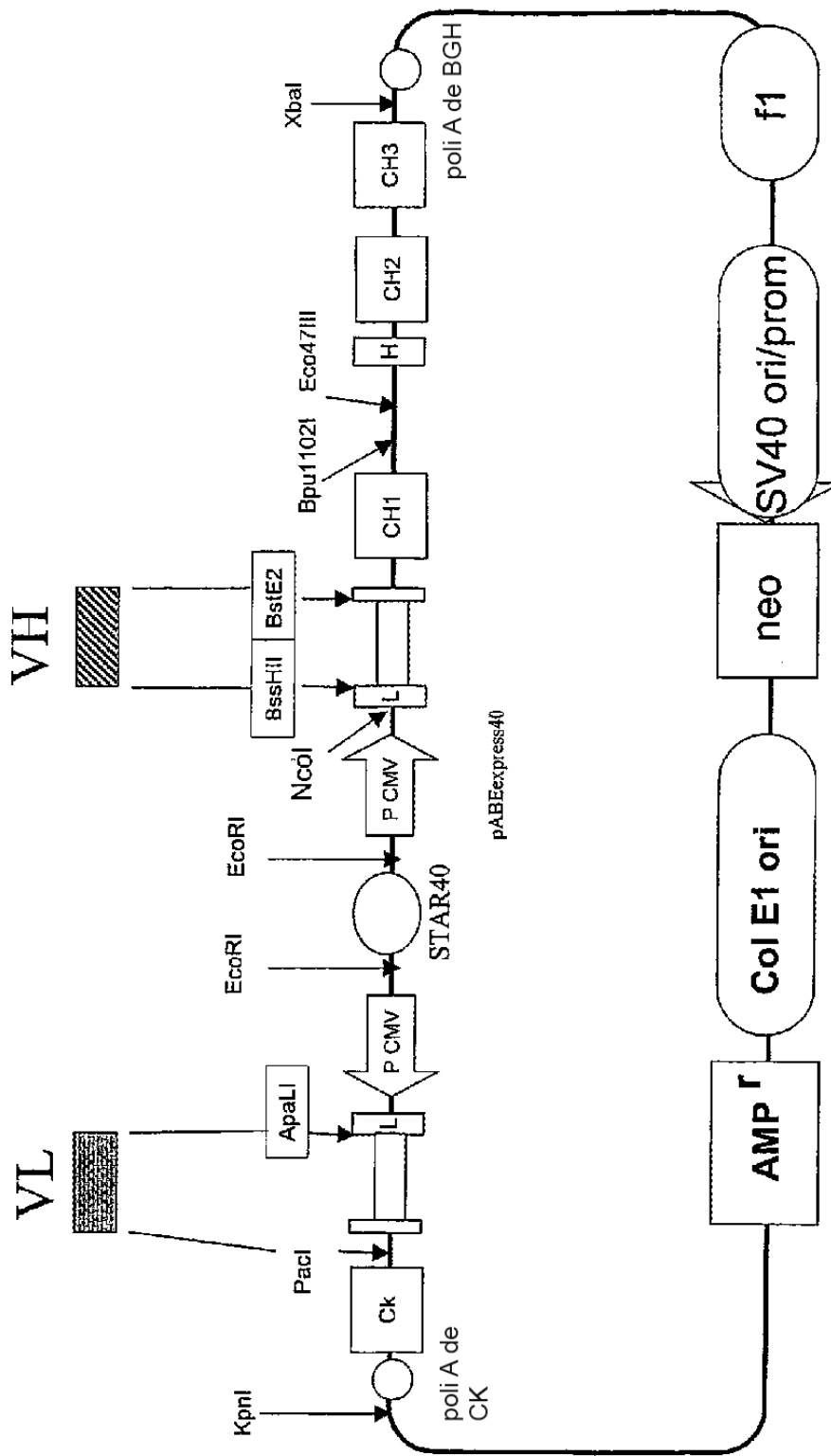


Figura 22

Diseño de una biblioteca de cadena ligera híbrida para h4D5v8 y 2C4:

	CDR1	CDR2
	24 30	53
h4D5:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS	
2C4 :	-----K-----SIG--	-----YR-T
HYB1:	-----X-----XXX--	-----XX-X
HYB2:	-----S-----	-----XX-X

	CDR3
	91 95
h4D5:	GVPSRFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYQCQQ HYTTPPT FGQGTKEIKR
2C4 :	-----Y-IY-Y-----
HYB1:	-----X-XX-X-----
HYB2:	-----F-----

Figura 23

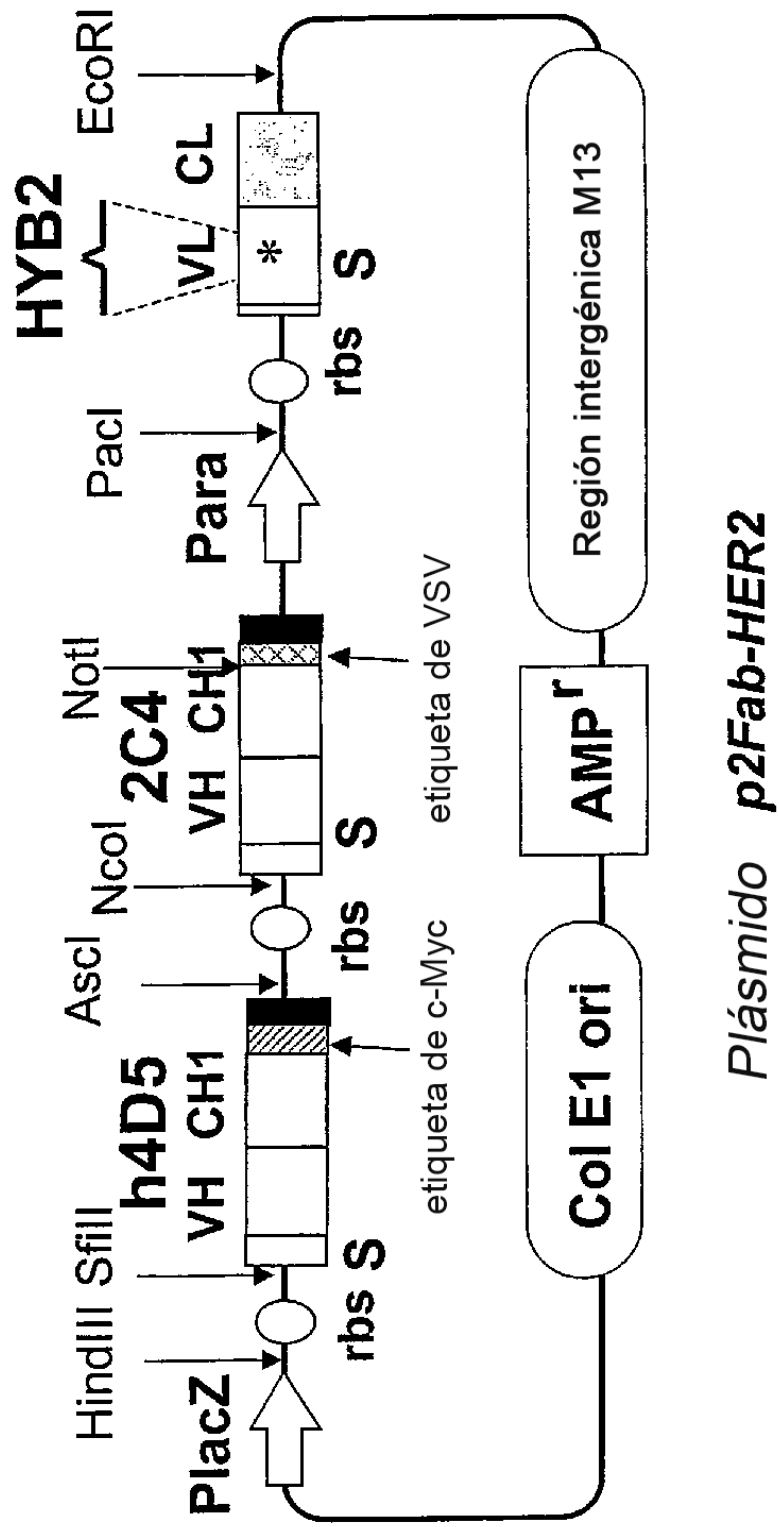


Figura 24

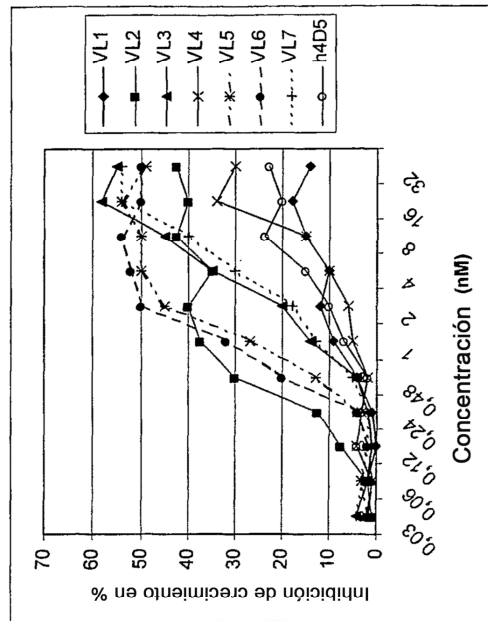


Figura 25