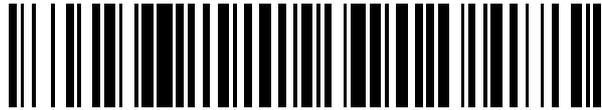


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 541**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2005 E 05851809 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1824987**

54 Título: **Intercambio de casete de región variable de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

16.11.2004 US 628581 P

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

15.11.2013

73 Titular/es:

**KALOBIOUS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
260 E. Grand Avenue
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**BEBBINGTON, CHRISTOPHER R.;
LUEHRSEN, KENNETH R. y
YARRANTON, GEOFFREY T.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 429 541 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

Intercambio de casete de región variable de inmunoglobulina

5 **Antecedentes de la invención**

Los restos de unión a antígeno de anticuerpos comprenden típicamente dos dominios de inmunoglobulina, un dominio de cadena variable pesada (V_H) y un dominio de cadena variable ligera (V_L). Cada dominio tiene tres bucles de secuencia variable que forman las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las seis CDR (tres de V_H y tres de V_L) se extienden desde una cara de la estructura de región variable para formar el sitio de unión a antígeno. En la mayoría de los anticuerpos, la asociación apropiada de las dos cadenas es necesaria para unir antígeno con afinidad significativa. Por tanto un dominio V_H y uno V_L juntos forman la unidad de unión a antígeno mínima.

15 Se ha hecho uso extendido de anticuerpos monoclonales, particularmente aquellos obtenidos a partir de roedores incluyendo ratones. Sin embargo, estos generan con frecuencia una respuesta inmune en el uso clínico humano (por ejemplo, Miller, R.A. *et al.*, Blood 62: 988-995 (1983); Schroff, R.W. *et al.*, Cancer Res. 45: 879-885 (1985)). La técnica ha intentado superar este problema construyendo anticuerpos "quiméricos" en los cuales un dominio variable de unión a antígeno animal se acopla a un dominio constante humano (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison, S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne, G.L. *et al.*, Nature 312: 643-646 (1984); Neuberger, M.S. *et al.*, Nature 314: 268-270 (1985)).

En un esfuerzo adicional para minimizar el uso de secuencias heterólogas en anticuerpos humanos, se han descrito varios enfoques de humanización (por ejemplo, Jones, P.T. *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann, L. *et al.*, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen, M. *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988); Queen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 86: 10029-33 (1989); Patentes de Estados Unidos N° 5.693.762 y 5.585.089). En tales técnicas, las CDR de una inmunoglobulina donadora se insertan en un armazón humano. Típicamente, los restos adicionales en los armazones del anticuerpo aceptor humano también se sustituyen con restos de roedor para conservar la conformación nativa de las CDR de roedor necesarias para recuperar la actividad de unión completa. Por tanto, los anticuerpos humanizados con frecuencia conservan seis CDR del anticuerpo de roedor y varios restos de roedor adicionales en las regiones flanqueantes. Mediante la transferencia de seis CDR desde el anticuerpo de roedor hasta armazones humanos, la especificidad del anticuerpo de partida típicamente se conserva en el anticuerpo humanizado pero la afinidad del anticuerpo humanizado está, en muchos casos, reducida en comparación con el anticuerpo de partida. Por consiguiente, pueden ser necesarias varias repeticiones de los procesos de humanización, en los cuales se construyen y ensayan combinaciones alternativas de retro-mutaciones en las regiones flanqueantes, con el fin de obtener afinidades de unión adecuadas. Incluso después de múltiples repeticiones, no siempre es posible identificar anticuerpos con CDR injertada con afinidades equivalentes al anticuerpo de partida.

40 Los anticuerpos humanos también se han aislado *in vitro* mediante expresión de repertorios de genes de anticuerpo en sistemas de expresión microbiana. Existen varias tecnologías de presentación en las cuales los fragmentos de anticuerpo expresados se presentan como proteínas de fusión ancladas a la superficie de una célula microbiana o un bacteriófago. El fago o célula hospedadora sirve como un paquete de presentación genética replicable (rgdp, por sus siglas en inglés) y los rgdp que se unen a un antígeno especificado se pueden seleccionar y expandir en cultivo para aislar genes que codifican anticuerpos frente al antígeno seleccionante. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de esta manera a partir de la expresión en la superficie de levadura (Feldhaus *et al.*, Nat. Biotechnol. 21: 163-70, 2003), células bacterianas (Daugherty *et al.*, Protein Eng. 12: 613-21, 1999) o, más comúnmente, en fagos. La presentación en fago permite explorar bibliotecas combinatorias grandes para determinar anticuerpos de unión a antígeno raros (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227: 381, 1992; Marks *et al.*, J Mol Biol. 222: 581, 1991; Winter *et al.*, Annu Rev. Immunol. 12: 433-55, 1994). Las bibliotecas combinatorias grandes de agentes de unión potenciales se pueden crear a partir de dos bibliotecas más pequeñas para selección de la combinación deseada. Por ejemplo, se puede crear y presentar en un bacteriófago una primera biblioteca de 10^7 cadenas H. Una segunda biblioteca de 10^7 cadenas L, en la cual las secuencias codificantes de estas cadenas ligeras están dentro de un vector de plásmido, se expresan en el espacio periplásmico de una bacteria hospedadora. Las bibliotecas de cadena H y cadena L se combinan para proporcionar 10^{14} combinaciones de cadenas H y L en la superficie del fago resultante en el sobrenadante bacteriano.

En la técnica se conocen diversos métodos para aumentar la diversidad en bibliotecas de fago-anticuerpo. Un método de este tipo implica combinar surtidos aleatorios de secuencias de CDR codificadas por línea germinal en un conjunto de regiones flanqueantes humanas con el fin de generar bibliotecas artificiales de anticuerpos humanos ("combinación de CDR"). Véase, por ejemplo, Jirholt *et al.*, Gene 215: 471, 1998; Soderlind *et al.*, Nat. Biotechnol. 18: 852-6, 2000).

La presentación en fago también se puede usar para identificar anticuerpos humanos con la especificidad de unión de un anticuerpo de roedor mediante un proceso de dos etapas de selección guiada en el cual una biblioteca de cadenas V_L humanas se empareja con la cadena V_H del anticuerpo de roedor y se seleccionan anticuerpos medio

humanos para unión a antígeno. Las cadenas humanas identificadas posteriormente se emparejan con una biblioteca de cadenas V_H humanas con el fin de identificar pares V_H - V_L capaces de unirse a antígeno (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.565.332; Jespers, *et al.*, Bio/Technology 12: 899-903, 1994; Beiboer *et al.*, J Mol Biol. 296: 833-49, 2000). En algunos casos la CDR3 de cadena pesada del anticuerpo de roedor se conserva en la selección guiada (Klimka *et al.*, Br J Cancer 83: 252-60, 2000). En otros casos, tanto la CDRH3 como la CDRL3 del anticuerpo de roedor se conservan en el anticuerpo humanizado final después de selección guiada (por ejemplo, Rader *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95: 8910-5, 1998).

En todos estos casos se usan típicamente bibliotecas grandes de diversidad elevada con el fin de identificar anticuerpos con afinidades elevadas. Los anticuerpos humanos obtenidos a partir de las tecnologías en la técnica, por lo tanto, tienden a tener un número significativo de diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de línea germinal más cercana. Tal mutación somática contribuye a la generación de anticuerpos de afinidad elevada en anticuerpos naturales (por ejemplo, England *et al.*, J. Immunol. 162: 2129, 1999) y generalmente se ha considerado importante para la generación de anticuerpos de afinidad elevada en anticuerpos generados a partir de bibliotecas *in vitro*. Sin embargo, tales mutaciones generan nuevas secuencias de proteína que se pueden reconocer como extrañas por el sistema inmune del organismo. Se espera que el sistema inmune no sea sensible (que sea "tolerante") a inmunoglobulinas expresadas de forma general durante el desarrollo, es decir, secuencias encontradas en la forma no mutada de línea germinal, pero las mutaciones en estas secuencias pueden permitir que el sistema inmune identifique a estas como proteínas extrañas. Por tanto se puede esperar que los anticuerpos con numerosas diferencias con respecto a las secuencias de línea germinal sean inmunogénicos cuando se usan de forma terapéutica en seres humanos.

Por lo tanto existe una necesidad de métodos mejorados para humanizar anticuerpos de roedor con el fin de reducir adicionalmente el potencial de inmunogenicidad mientras que se conserva la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo de partida. Existe también una necesidad de métodos para identificar anticuerpos humanos con la especificidad de un anticuerpo de referencia de partida, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, pero que utilizan secuencias de inmunoglobulina humanas que son de línea germinal o cercanas a línea germinal. La invención aborda esta necesidad.

La invención proporciona además soluciones a problemas de fiabilidad inherente en tecnologías de humanización de anticuerpo que incluyen selección guiada por cadena e injerto de CDR. Las tecnologías de injerto de CDR proporcionan anticuerpos con secuencias flanqueantes de V_H y V_L humanas pero que conservan partes significativas de la región variable del anticuerpo de referencia. Estas pueden tener afinidad reducida en comparación con el anticuerpo de partida y pueden requerir mucho trabajo para producirlos mediante múltiples etapas de ingeniería genética repetitivas. La presente invención proporciona métodos de ingeniería genética de un anticuerpo de referencia para proporcionar un anticuerpo humanizado que conserva la afinidad por el antígeno diana.

Chung *et al.* (2004) The FASEB Journal: 18, 361-363 divulga el uso de presentación en fago para seleccionar anticuerpos monoclonales específicos para integrina $\alpha IIb\beta 3$ a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos sintéticos en base a la secuencia HCDR3 aleatorizada VGXXXRADXXXAMDV.

El documento WO 2004/006955 divulga métodos de humanización de anticuerpos en base a selección de secuencias de región flanqueante variable a partir de genes de anticuerpo humano comparando tipos de estructura de CDR canónica para secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo no humano con tipos de estructura de CDR canónica para CDR correspondientes a partir de una biblioteca de secuencias de anticuerpo humano, preferentemente segmentos génicos de anticuerpo de línea germinal.

Rader *et al.* (1998) PNAS: 95: 8910-8915 divulga la incorporación de secuencias de reconocimiento clave a partir de un anticuerpo de roedor parental usando una estrategia de selección basada en presentación en fago. Las secuencias originales de las terceras CDR de cadenas pesada y ligera, HCDR3 y LCDR3, se conservaron y todas las otras secuencias se reemplazaron por secuencias humanas seleccionadas a partir de bibliotecas de anticuerpos presentados en fagos.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos modificados por ingeniería genética con la especificidad de un anticuerpo de referencia mediante el reemplazo de partes de las secuencias de V_H y V_L del anticuerpo de referencia con secuencias a partir de repertorios de anticuerpo humano. Además, la invención proporciona bibliotecas de regiones V híbridas.

Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para modificar por ingeniería genética un anticuerpo que conserva la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia por un antígeno diana, comprendiendo el método:

- (a) obtener una región variable a partir del anticuerpo de referencia;
- (b) reemplazar al menos un casete de intercambio, seleccionado entre el grupo que consiste en FR1-CDR1,

- FR1-FR2-CDR1, FR2-CDR2-FR3, CDR2-FR3 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de casetes de intercambio correspondientes a partir de segmentos V humanos, generando de ese modo una biblioteca de regiones V híbridas que comprende miembros en los cuales el al menos un casete de intercambio de la región variable del anticuerpo de referencia se reemplaza con casetes de intercambio correspondientes humanos codificados por genes diferentes, donde la CDR del al menos un casete de intercambio de la región variable del anticuerpo de referencia es una CDR intacta o una CDR parcial que es una subregión de la CDR que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR intacta y cada región flanqueante (FR) del al menos un casete de intercambio de la región variable del anticuerpo de referencia es una FR intacta o una FR parcial que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la FR intacta;
- (c) emparejar la biblioteca de regiones V híbridas de (b) con una región V complementaria; y
(d) seleccionar un anticuerpo que comprende una región V híbrida que tiene al menos un casete intercambiado generado en la etapa (b) que tiene una afinidad de unión por el antígeno diana.
- 15 Al menos uno de los casetes de intercambio humanos puede ser una secuencia de línea germinal humana. El anticuerpo que se selecciona puede ser un fragmento Fv, un fragmento Fab, un Fab', un F(ab')₂, un scFv u otro fragmento de una inmunoglobulina, tal como un fragmento que se suprime en CH₂ o CH₃.
- El método también puede comprender etapas adicionales de: (e) reemplazar un segundo casete de intercambio, que comprende al menos una CDR o una CDR parcial que es una subregión de la CDR que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR intacta, unido a al menos una región flanqueante (FR) o una FR parcial que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la FR intacta, que están juntos de forma natural, de la región V del anticuerpo de referencia con una biblioteca de casetes de intercambio correspondientes a partir de segmentos génicos V humanos para crear una segunda biblioteca híbrida de regiones V híbridas; (f) emparejar la segunda biblioteca de regiones V híbridas con una región V complementaria; (g) seleccionar un anticuerpo que comprende una segunda región V híbrida, anticuerpo que tiene una afinidad de unión por el antígeno diana; y (h) combinar el casete de intercambio humano del anticuerpo de (d) con el segundo casete de intercambio humano del anticuerpo modificado por ingeniería genética de (g), para obtener un anticuerpo con la especificidad de unión del anticuerpo de referencia, donde el anticuerpo tiene una región V híbrida que comprende al menos dos casetes de intercambio humanos. Estas etapas se pueden realizar simultáneamente con (b) a (d); o de forma secuencial, en cualquier orden con relación a las etapas (b) a (d).
- En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de reemplazo de la CDR3-FR4 de una región V híbrida con una biblioteca de regiones de CDR3-FR4, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que conserva la especificidad de unión por el antígeno diana.
- La región V complementaria de (c) o (f) puede ser, por ejemplo, una región V que comprende un segmento V de origen natural, una región V híbrida o una región V híbrida que es un miembro de una biblioteca que comprende diferentes regiones V híbridas.
- En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos que comprenden una o más regiones V híbridas se expresan y secretan en forma soluble a partir de una célula hospedadora, por ejemplo, una célula procariota, una levadura o una célula de mamífero y se unen a un antígeno.
- En realizaciones alternativas, un anticuerpo que comprende una región V híbrida se presenta en una célula, una espora o un virus.
- En un procedimiento de intercambio de casete ilustrativo, la invención proporciona un método para modificar por ingeniería un anticuerpo que comprende: (a) obtener una región variable (una región variable de cadena pesada o de cadena ligera) de un anticuerpo de referencia que tiene una especificidad de unión deseada; (b) reemplazar la FR1-CDR1-FR2 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR1-CDR1-FR2 para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejar las regiones variables híbridas con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tiene una afinidad detectable por el antígeno diana; (c) reemplazar la FR2-CDR2-FR3 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR2-CDR2-FR3 para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejar las regiones variables híbridas con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tiene una afinidad detectable por el antígeno diana; (d) combinar la FR1-CDR1-FR2 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (b) con la FR2-CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (c) para obtener un anticuerpo con un segmento V de región variable humano, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia. En una realización, la secuencia de FR2 o la secuencia de FR3 es una secuencia de FR parcial. En realizaciones adicionales, la FR1-CDR1-FR2 y/o la FR2-CDR2-FR3 son de una biblioteca de secuencias de línea germinal humana.
- Las etapas del método se pueden realizar simultáneamente o de forma secuencial. Además, cuando se realizan de forma secuencial, las etapas (b) y (c) se pueden realizar en cualquier orden.

La región V complementaria de (b) o (c) puede ser, por ejemplo, una región V que comprende un segmento V de origen natural, una región V híbrida o una región V híbrida que es un miembro de una biblioteca que comprende diferentes regiones V híbridas.

- 5 En una realización, la etapa de combinar la FR1-CDR1-FR2 con la FR2-CDR2-FR3 comprende combinar las regiones de FR2 en una región de homología, es decir, la FR1-CDR1-FR2 y la FR2-CDR2-FR3 se combinan en un área que tiene identidad de secuencia, por ejemplo, identidad de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85% o el 90% o más, en la región FR2. La "combinación" puede tener lugar, por ejemplo, a través de recombinación.
- 10 Como alternativa, la combinación de FR1-CDR1-FR2 con la FR2-CDR2-FR3 comprende reemplazar la FR2 de la FR1-CDR1-FR2 con la FR2 de la FR2-CDR2-FR3 o reemplazar la FR2 de FR2-CDR2-FR3 con la FR2 de FR1-CDR1-FR2.

15 El método expuesto anteriormente también puede comprender una etapa adicional de reemplazo de la CDR3-FR4 de una región variable híbrida que comprende al menos un segmento V humano, mencionado anteriormente, con una biblioteca de regiones CDR3-FR4 humanas, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que se une al antígeno diana.

20 En otra realización, el método puede comprender reemplazar la FR3-CDR3-FR4 de una región variable híbrida que comprende al menos un segmento V humano, mencionado anteriormente, con una biblioteca de regiones FR3-CDR3-FR4, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tiene una afinidad detectable por el antígeno diana. La realización comprende además combinar la FR3-CDR4-FR4 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado anteriormente con la FR2-CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (d) para obtener un anticuerpo con estos segmentos V de región variable humana, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia.

En otro procedimiento de ingeniería genética de anticuerpo ilustrativo de la invención, el método comprende:

- 30 (a) obtener una región variable de un anticuerpo de referencia que tiene una especificidad de unión deseada;
 (b) reemplazar la FR1-CDR1-FR2 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR1-CDR1-FR2 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejar las regiones variables híbridas con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tiene una afinidad detectable por el antígeno diana;
 35 (c) reemplazar la CDR2-FR3 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones CDR2-FR3 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, donde la CDR2 de la CDR2-FR3 del anticuerpo de referencia es una CDR2 parcial que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR2 intacta y la biblioteca de secuencias CDR2-FR3 humanas comprende secuencias CDR2-FR3 parciales correspondientes, emparejar las regiones variables híbridas con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tiene una afinidad detectable por el antígeno diana, y
 40 (d) combinar la FR1-CDR1-FR2 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (b) con la CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (c) para obtener un anticuerpo con un segmento V de región variable humana, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de reemplazo de la CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones CDR3-FR4 humanas, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que se une al antígeno diana. Las regiones CDR3 de la biblioteca de CDR3-FR4 humana pueden ser regiones CDR3 completas o regiones CDR3 parciales.

50 En realizaciones alternativas, el método ilustrativo comprende además: (e) reemplazar la FR4 de la región variable del anticuerpo de referencia de partida o anticuerpo modificado por ingeniería genética con una biblioteca de regiones FR4, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tiene una afinidad detectable por el antígeno diana.

55 En otro aspecto, la invención proporciona bibliotecas de regiones V híbridas. Una biblioteca de regiones V híbridas de la invención comprende miembros que tienen una diversidad de regiones V. Una región V híbrida en la biblioteca tiene al menos una CDR parcial, por ejemplo, una MEBS, de un anticuerpo de referencia y al menos un casete de intercambio a partir de un repertorio de anticuerpo, casete de intercambio que se selecciona entre el grupo que consiste en FR1-CDR1, FR1-CDR1-FR2, FR2-CDR2-FR3 o CDR2-FR3, donde la CDR del casete de intercambio es una CDR intacta o una CDR parcial que es una subregión de la CDR que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR intacta y en cada región flanqueante (FR) existe una FR intacta o una FR parcial que es una subregión de la FR que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la FR intacta. En algunas realizaciones, el casete de intercambio es una secuencia de línea germinal humana.

65 El miembro de la biblioteca puede tener al menos dos casetes de intercambio a partir de un repertorio humano.

En realizaciones típicas, la CDR o CDR parcial, a partir del anticuerpo de referencia que está presente en los miembros de la biblioteca es una secuencia CDR3. Además, los miembros de biblioteca con frecuencia tienen una secuencia FR4 humana, que puede ser la misma secuencia o secuencias diferentes en diversos miembros de la biblioteca. Típicamente, la CDR3 parcial es una MEBSD y/o el segmento D a partir del anticuerpo de referencia.

5

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1a-1c proporciona un esquema que muestra un reemplazo de un casete de intercambio de un casete FR1-CDR1-FR2 en un anticuerpo de referencia.

10

La Figura 2a-2c proporciona un esquema que muestra un reemplazo de casete de intercambio de un casete FR2-CDR2-FR3 en un anticuerpo de referencia.

15

La Figura 3a-3c proporciona un esquema que muestra el reemplazo de un FR2-CDR3-FR4 en un anticuerpo de referencia.

La Figura 4a-4c proporciona un esquema que muestra el reemplazo de una región CDR3-FR4 de un anticuerpo de referencia.

20

La Figura 5 proporciona un esquema que muestra un reemplazo de casete de intercambio de un casete CDR2-FR3 en un anticuerpo de referencia, donde la CDR2 del anticuerpo de referencia conserva el determinante de especificidad de unión esencial mínima.

25

La Figura 6a-6c proporciona un esquema que muestra una construcción de un casete de intercambio repetitivo.

La Figura 7a-7c proporciona un esquema que muestra una reconstrucción de casete.

Descripción detallada de la invención

30 Definiciones

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" se refiere a una proteína definida funcionalmente como una proteína de unión y definida estructuralmente como que comprende una secuencia de aminoácidos que se reconoce por un experto como que se obtiene a partir de la región flanqueante de un gen que codifica inmunoglobulina de un animal que produce anticuerpos. Un anticuerpo puede consistir en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una mirada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, las cuales a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

40

Una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) se conoce que comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

45

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados. Por tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que es en sí suaves para romper el enlace de disulfuro en la región de bisagra convirtiendo de ese modo el dímero $(Fab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (véase, *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que los fragmentos se pueden sintetizar de *novo* químicamente o mediante la utilización de metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento también incluye fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados usando metodología de ADN recombinante. Los anticuerpos preferidos incluyen dímeros V_H-V_L , incluyendo anticuerpos de cadena única (anticuerpos que existen como una cadena polipeptídica única), tales como anticuerpos Fv de cadena única (sFv o scfv) en los cuales se unen una región pesada variable y una ligera variable (directamente o a través de un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de cadena única es un heterodímero V_H-V_L enlazado covalentemente que se puede expresar a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias codificantes de V_H - y V_L - unidas directamente o unidas a través de un enlazador que codifica péptido (por ejemplo, Huston, *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883, 1988). Mientras que la V_H y la V_L están conectadas entre sí como una cadena polipeptídica única, los dominios V_H y V_L se asocian de forma no covalente. Como alternativa, el anticuerpo puede ser otro fragmento. Otros

65

fragmentos también se pueden generar, incluyendo el uso de técnicas recombinantes. Por ejemplo moléculas Fab se pueden presentar en fago si una de las cadenas (pesada o ligera) se fusiona a la proteína de cápside g3 y la cadena complementaria se exporta al periplasma como una molécula soluble. Las dos cadenas se pueden codificar en el mismo replicón o en replicones diferentes; las dos cadenas de anticuerpos en cada molécula de Fab se ensamblan después de la traducción y el dímero se incorpora en la partícula de fago a través de enlace de una de las cadenas a g3p (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5733743). Los anticuerpos scFv y varias estructuras diferentes que convierten las cadenas polipeptídicas ligera y pesada agregadas de forma natural pero separadas de forma química a partir de una región V de anticuerpo en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno se conocen por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778). Los anticuerpos particularmente preferidos incluyen todos aquellos que se han presentado en fago o que se han generado mediante tecnología recombinante usando vectores donde las cadenas se secretan como proteínas solubles, por ejemplo, scFv, Fv, Fab, pr (Fab')₂ o generados mediante tecnología recombinante usando vectores donde las cadenas se secretan como proteínas solubles. Los anticuerpos también pueden incluir dianticuerpos y minianticuerpos.

Los anticuerpos de la invención también incluyen dímeros de cadena pesada, tales como anticuerpos de camélidos. Ya que la región VH de una IgG de dímero de cadena pesada en un camélido no tiene que realizar interacciones hidrófobas con una cadena ligera, la región en la cadena pesada que normalmente contacta a una cadena ligera se cambia a restos de aminoácidos hidrófilos en un camélido. Los dominios VH de de IgG de dímero de cadena pesada se denominan dominios VHH.

En camélidos, la diversidad de repertorio de anticuerpo se determina mediante las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 en las regiones VH o VHH. La CDR3 en la región VHH de camello se caracteriza por su longitud relativamente larga que promedia 16 aminoácidos (Muyldermans *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(9): 1129). Esto contrasta con las regiones CDR3 de anticuerpos de muchas otras especies. Por ejemplo, la CDR3 de V_H de ratón tiene un promedio de 9 aminoácidos.

Las bibliotecas de regiones variables de anticuerpo obtenidas a partir de camélido, que mantienen la diversidad *in vivo* de las regiones variables de un camélido, se pueden preparar, por ejemplo, mediante los métodos divulgados en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° de Ser. 20050037421, publicada el 17 de febrero de 2005.

“Región V” se refiere a un dominio de región variable de anticuerpo que comprende los segmentos de región flanqueante 1, CDR1, región flanqueante 2, CDR2 y región flanqueante 3, incluyendo CDR3 y región flanqueante 4, segmentos que se añaden al segmento V como una consecuencia de rearrreglo de los genes de región V de cadena pesada y cadena ligera durante la diferenciación de células B.

Una “región variable complementaria” se refiere a una región que puede dimerizar con una región V para producir un fragmento de unión funcional que se une específicamente a un antígeno de interés. Una región variable complementaria es típicamente una región V_L, donde la región variable es una región V_H; o es una región V_H, donde la región variable es una región V_L. La región variable complementaria con frecuencia comprende una CDR3 de un anticuerpo de referencia que se une al antígeno de interés.

El término “segmento V” se refiere a la región de la región V (cadena pesada o ligera) que se codifica por un gen V. Un “segmento D” se refiere a la región de la región V (en este caso, una CDR3 en la región V) que se codifica por un gen D. De forma similar, un “segmento J” se refiere a una región codificada por un gen J. Estos términos incluyen diversas modificaciones, adiciones, supresiones y mutaciones somáticas, que pueden ocurrir durante la maduración.

Un “casete de intercambio” como se usa en el presente documento se refiere típicamente a al menos una CDR intacta unida a al menos una región flanqueante intacta que están juntas de forma natural. Un “casete de intercambio” también se puede referir a al menos a una parte de una CDR que está unida a al menos una región flanqueante que son, juntas, de origen natural. En otras realizaciones, un casete de intercambio se refiere a al menos una CDR unida a al menos una parte de FR que son, juntas, de origen natural. Un “casete de intercambio” también puede comprender al menos una CDR parcial unida a al menos a una FR parcial que son, juntas, de origen natural. Un “casete de intercambio” también se puede aislar a partir de una biblioteca sintética en la cual una o más de las CDR están mutadas. En este caso, la CDR antes de la mutagénesis y la región flanqueante son, juntas, de origen natural.

Una “CDR parcial” o “parte de una CDR” o “secuencia de CDR parcial” en el contexto de la presente invención se refiere a una subregión de una secuencia de CDR intacta, por ejemplo, la región CDR fuera del sitio de unión esencial mínima, que está presente en un casete de intercambio. Un casete de intercambio de la presente invención puede tener, por tanto, una CDR “parcial”. El resultado final en la región V híbrida es una CDR híbrida. Por ejemplo, un casete de intercambio de CDR2-FR3 incluye realizaciones en las cuales está presente una subregión de la secuencia CDR2 en el casete de intercambio de CDR2-FR3 de forma tal que una región V híbrida que se produce como resultado a partir del intercambio de CDR2-FR3 tendría una CDR2 en la cual parte de la CDR2 es de un casete intercambiado y parte es de la CDR2 del anticuerpo de referencia. Una secuencia de CDR “parcial”

comprende una subregión de restos contiguos que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% o más de la CDR intacta.

5 Una "FR parcial" o "parte de una FR" o "secuencia de FR parcial" en el contexto de la presente invención se refiere a una subregión de una FR intacta que está presente en un casete de intercambio. Por consiguiente, un casete de intercambio de la invención puede tener una "FR parcial" de forma que una región V híbrida que se genera a partir de un casete de intercambio que tiene una FR parcial, tiene parte de su secuencia de FR a partir del casete intercambiado y parte de la FR de la región V del anticuerpo de referencia. Una secuencia de FR "parcial" comprende una subregión de restos contiguos que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% o más de la FR intacta.

15 Un "casete extendido" como se usa en el presente documento se refiere a un casete de intercambio que comprende una región flanqueante adicional. Por tanto, en el presente documento un "casete extendido" es un casete de intercambio que tiene al menos una CDR y al menos dos regiones flanqueantes que son, juntas, de origen natural. Un "casete extendido" también se puede aislar a partir de una biblioteca sintética en la cual una o más de las CDR están mutadas. En este caso, la CDR antes de la mutagénesis y la región flanqueante juntas son de origen natural.

20 "De origen natural" como se usa en el contexto de casetes de intercambio y extendidos significa que los componentes están codificados por un gen único que no se había alterado mediante medios recombinantes y que existe previamente en una biblioteca de anticuerpo que se creó a partir de células no expuestas o células que se habían expuesto a un antígeno.

25 Un casete de intercambio "correspondiente" se refiere a una CDR y una región flanqueante que está codificada por un gen o segmento génico de anticuerpo diferente (con relación a un anticuerpo que ha de someterse a intercambio), pero es, en términos de estructura de anticuerpo general, la misma CDR y región flanqueante del anticuerpo. Por ejemplo, un casete de intercambio CDR1-FR1 se reemplaza por un casete CDR1-FR1 "correspondiente" que está codificado por un gen de anticuerpo diferente con relación a la CDR1-FR1 de referencia. La definición también se aplica a un casete de intercambio que tiene una secuencia de CDR parcial y/o una secuencia de región FR parcial.

30 Un "región V híbrida" se refiere a una región V en la cual al menos un casete de intercambio se ha reemplazado por un casete de intercambio correspondiente a partir de un gen o segmento génico de anticuerpo diferente.

35 "Antígeno" se refiere a sustancias que son capaces, en condiciones apropiadas, de inducir una respuesta inmune específica y de reaccionar con los productos de esa respuesta, es decir, con anticuerpos específicos o linfocitos T sensibilizados de forma específica o ambos. Los antígenos pueden ser sustancias solubles, tales como toxinas y proteínas extrañas, o particulados, tales como bacterias y células de tejido; sin embargo, únicamente la parte de la molécula de proteína o polisacárido que se conoce como el determinante antigénico (epítomos) se combina con el anticuerpo o un receptor específico en un linfocito. De forma más extensa, el término "antígeno" se puede usar para referirse a cualquier sustancia a la cual se une un anticuerpo o para la cual se desean anticuerpos, independientemente de si la sustancia es inmunogénica. Para tales antígenos, los anticuerpos se pueden identificar mediante métodos recombinantes, independientemente de cualquier respuesta inmune.

45 La "especificidad de unión" de un anticuerpo se refiere a la identidad del antígeno al cual se une el anticuerpo, preferentemente a la identidad del epítomo al cual se une el anticuerpo.

50 "Polinucleótido quimérico" significa que el polinucleótido comprende regiones que son de tipo silvestre y regiones que están mutadas. También puede significar que el polinucleótido comprende regiones de tipo silvestre de un polinucleótido y regiones de tipo silvestre de otro polinucleótido relacionado.

55 "Región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere al término reconocido en la técnica ilustrado por Kabat y Chothia. Las CDR también se conocen generalmente como regiones hipervariables o bucles hipervariables (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342: 877; E. A. Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (1987); y Tramontano *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 175). "Región flanqueante" o "FR" se refiere a la región del dominio V que flanquea las CDR. Las posiciones de las CDR y las regiones flanqueantes se pueden determinar usando diversas definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Kabat, Chothia, base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) y AbM (véanse, por ejemplo, Johnson *et al.*, mencionado anteriormente; Chothia & Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917; Chothia C. *et al.*, 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883; Chothia C. *et al.*, 1992, structural repertoire of the human VH segments *J. Mol. Biol.* 227, 799-817; Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1997, 273(4)). Las definiciones de sitios de combinación de antígeno también se describen en las siguientes: Ruiz *et al.*, IMGT, la base de datos internacional ImMunoGeneTics. *Nucleic Acids Res.*, 28, 219-221 (2000); y Lefranc, M.-P. IMGT, la base de datos internacional ImMunoGeneTics. *Nucleic Acids Res.* Jan 1; 29(1): 207-9 (2001); MacCallum *et al.*, Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, *J. Mol. Biol.*, 262 (5), 732-745 (1996); y Martin *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272 (1989); Martin, *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203, 121-153, (1991); Pedersen *et al.*,

Immunomethods, 1,126, (1992); y Rees *et al.*, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172 1996).

5 “Epítipo” se refiere a esa porción de un antígeno u otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión que interacciona con el bolsillo de unión de la región variable de un anticuerpo. Típicamente, tal interacción de unión se manifiesta como un contacto intermolecular con uno o más restos de aminoácidos de una CDR. Con frecuencia, la unión implica una CDR3 o un par de CDR3.

10 “Vector de expresión” incluye vectores que son capaces de expresar secuencias de ácido nucleico contenidas en los mismos, es decir, cualquier secuencia de ácido nucleico que sea capaz de lograr la expresión de un código de ácido nucleico especificado dispuesto en el mismo (las secuencias codificantes están unidas operativamente a otras secuencias capaces de lograr su expresión). Algunos vectores de expresión son replicables en el organismo hospedador como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Un elemento útil, pero no necesario, de un vector de expresión eficaz es una secuencia codificante de marcador, es decir, una secuencia que codifica una proteína que da como resultado una propiedad fenotípica (por ejemplo resistencia a tetraciclina) de las células que contienen la proteína que permite que esas células se identifiquen fácilmente. Los vectores de expresión se encuentran frecuentemente en forma de plásmidos o virus. Sin embargo, la invención tiene por objeto incluir tales otras formas de vectores de expresión que sirven a funciones equivalentes y que pueden, eventualmente, convertirse en conocidas en la técnica.

20 “Homólogos” significa polipéptidos que tienen restos iguales o conservados en una posición correspondiente en su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término también se extiende a dos o más secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos homólogos. Ejemplo de péptidos homólogos son los isotipos de inmunoglobulina.

25 “Célula hospedadora” se refiere a una célula procariota o eucariota en la cual se pueden introducir, expresar y/o propagar los vectores de la invención. Una célula hospedadora microbiana es una célula de un microorganismo procariota o eucariota, incluyendo bacterias, levaduras, hongos microscópicos y fases microscópicas en el ciclo de vida de hongos y mohos mucilaginosos. Las células hospedadoras procariotas típicas incluyen diversas cepas de *E. coli*. Las células hospedadoras eucariotas típicas son levaduras u hongos filamentosos o células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino, fibroblastos NIH 3T3 murinos, células 193 de riñón embrionario humano o células de mieloma o hibridoma de roedor.

35 “Aislado” se refiere a un ácido nucleico o polipéptido separado no solamente de otros ácidos nucleicos o polipéptidos que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico o polipéptido, sino también de polipéptidos y preferentemente se refiere a un ácido nucleico o polipéptido encontrado en presencia de (si hubiera alguno) únicamente un disolvente, tampón, ión u otro componente presente normalmente en una solución del mismo. Los términos “aislado” y “purificado” no abarcan ácidos nucleicos o polipéptidos presentes en su fuente natural.

40 “Purificado” significa que el ácido nucleico o polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, por ejemplo, polinucleótidos, proteínas y similares. En una realización, el polinucleótido o polipéptido está purificado de forma que constituye al menos el 95% en peso, más preferentemente al menos el 99,8% en peso, de las macromoléculas biológicas indicadas presentes (pero pueden estar presentes agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular de menos de 1.000 Dalton).

45 “Ácido nucleico recombinante” se refiere a un ácido nucleico en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Es decir, un ácido nucleico recombinante está flanqueado por una secuencia de nucleótidos que no flanquea de forma natural el ácido nucleico o tiene una secuencia que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden formar originalmente *in vitro* mediante la manipulación de ácido nucleico por endonucleasas de restricción o, alternativamente, usando técnicas tales como reacción en cadena de la polimerasa. Se entiende que una vez que se ha preparado un ácido nucleico recombinante y se ha reintroducido en una célula u organismo hospedador, el mismo se replicará de forma no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula hospedadora en lugar de manipulaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque replicados posteriormente de forma no recombinante, aún se consideran recombinantes para los fines de la invención.

“Polipéptido recombinante” se refiere a un polipéptido expresado a partir de un ácido nucleico recombinante o un polipéptido que se sintetiza químicamente *in vitro*.

60 “Variante recombinante” se refiere a cualquier polipéptido que difiera de polipéptidos de origen natural en inserciones, supresiones y sustituciones de aminoácidos, creado usando técnicas de ADN recombinante. La guía para determinar qué restos de aminoácido se pueden reemplazar, añadir o suprimir sin abolir las actividades de interés, tales como actividades enzimáticas o de unión, se puede encontrar mediante comparación de la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos y minimizando el número de cambios de secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología.

- Preferentemente, las “sustituciones” de aminoácidos son el resultado del reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, reemplazos conservativos de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar en base a la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por ejemplo,
- 5 aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.
- 10 Las “inserciones” o “supresiones” están típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar de forma experimental realizando sistemáticamente inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en una molécula polipeptídica usando técnicas de ADN recombinante y ensayando las variantes recombinantes resultantes para determinar la actividad.
- 15 Como alternativa, cuando se desea alteración de la función, las inserciones, supresiones o alteraciones no conservativas se pueden modificar por ingeniería genética para producir polipéptidos alterados. Tales alteraciones pueden alterar, por ejemplo, una o más de las funciones biológicas o características bioquímicas de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, tales alteraciones pueden cambiar las características de los polipéptidos tales como afinidades de unión a ligando, afinidades intercadena o índice de degradación/renovación. Además, tales
- 20 alteraciones se pueden seleccionar para generar polipéptidos que son más adecuados para expresión, aumento de escala y similares en las células hospedadoras elegidas para expresión. Por ejemplo, restos de cisteína se pueden suprimir o sustituir con otro resto de aminoácido con el fin de eliminar puentes de disulfuro.
- Como alternativa, las variantes recombinantes que codifican estos polipéptidos iguales o similares se pueden sintetizar o seleccionar usando la “redundancia” en el código genético. Diversas sustituciones de codón, tales como los cambios silentes que producen diversos sitios de restricción, se pueden introducir para optimizar la clonación en un plásmido o vector viral o la expresión en un sistema procarionota o eucariota particular. Las mutaciones en la
- 25 secuencia de polinucleótidos se puede reflejar en el polipéptido o dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar las características tales como afinidades de unión a ligando, afinidades intercadena o índice de degradación/renovación.
- 30 “Repertorio” o “biblioteca” se refiere a una biblioteca de genes que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpo tales como Fab, scFv, Fd, LC, V_H o V_L o un subfragmento de una región variable, por ejemplo, un casete de intercambio, que se obtiene a partir de un ensamble natural o “repertorio”, de genes de anticuerpo presentes, por
- 35 ejemplo en donadores humanos y obtenido principalmente a partir de células de sangre periférica y bazo. En algunas realizaciones, los donadores humanos son “no inmunes”, es decir, no presentan síntomas de infección. En la presente invención, una biblioteca o repertorio con frecuencia comprende miembros que son casete de intercambio de una parte dada de una región V.
- 40 “Biblioteca de anticuerpo sintético” se refiere a una biblioteca de genes que codifican uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como Fab, scFv, Fd, LC, V_H o V_L o un subfragmento de una región variable, por ejemplo, un casete de intercambio, en el cual una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se han alterado parcialmente o completamente, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido. “Aleatorizado” significa que parte o toda la secuencia que codifica la CDR se ha reemplazado por
- 45 secuencia que codifica de forma aleatoria los veinte aminoácidos o algún subgrupo de los aminoácidos.
- “Diana” se puede usar para referirse a la molécula a la cual se une un anticuerpo de referencia, “anticuerpo de referencia” siendo un anticuerpo para el cual el facultativo desea obtener una variante con características “mejoradas”. Por tanto, “diana” se puede usar en el presente documento como un sinónimo de “antígeno”.
- 50 “Vector” se refiere a un plásmido o fago o virus o vector, para expresar un polipéptido a partir de una secuencia de ADN (ARN). El vector puede comprender una unidad transcripcional que comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y que se traduce en proteína y (3) secuencias de inicio y terminación de la traducción apropiadas. Las unidades estructurales pretendidas para su
- 55 uso en sistemas de expresión de levadura o eucariotas pueden incluir una secuencia líder que posibilita la secreción extracelular de proteína traducida mediante una célula hospedadora.

60 Introducción

- La presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos modificados por ingeniería genética con la especificidad de un anticuerpo de referencia mediante el reemplazo de partes de las secuencias V_H y V_L del anticuerpo de referencia con secuencias a partir de repertorios de anticuerpo humano.
- 65 El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo humano de afinidad subóptima, en cuyo caso los métodos de la invención se pueden usar para aumentar la afinidad o para reducir adicionalmente el potencial de

inmunogenicidad. Como alternativa, el anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo murino y los métodos de la invención se usan para obtener un anticuerpo humano o humanizado con la especificidad del anticuerpo no humano. Los anticuerpos producidos usando los métodos de la presente invención se aíslan rápidamente a partir de bibliotecas de secuencias de anticuerpo, conservan la afinidad del anticuerpo de referencia y tienen un alto grado de homología con regiones V de anticuerpo humano. Con frecuencia, un anticuerpo producido usando el método de la invención conserva una CDR3 o la MEBSD de una CDR3, del anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede comprender un par de CDR3 (es decir, la CDR3 V_H y la CDR3 V_L), del anticuerpo de referencia.

10 Bibliotecas de casete de gen V

El segmento de gen V de tanto la cadena pesada como ligera se puede considerar que está comprendido de varios casetes formados por segmentos flanqueantes y CDR. Por tanto, los segmentos de genes de V_H y V_L están comprendidos cada uno por 5 "casetes mínimos" (CDR1, CDR2, FR1, FR2 y FR3). En la presente invención, las regiones V se considera que están compuestas de "casetes de intercambio" comprendidos por dos o más casetes mínimos, donde el casete de intercambio incluye al menos una CDR y al menos una FR unidas en orden natural. Por tanto, por ejemplo, un casete de intercambio relacionado con CDR1 puede consistir en FR1-CDR1 o FR1-CDR1-FR2. Existen nueve casetes de intercambio de este tipo en cada segmento de gen V, que consisten en al menos un armazón y una CDR (y menos de tres armazones) en el orden apropiado.

La región V completa incluye dos casetes mínimos adicionales, CDR3 y FR4, que están formados por re-arreglo somático y mutagénesis de segmentos de genes de línea germinal específicos adicionales (el segmento D en V_H y un segmento J tanto en V_H como en V_L). Los casetes de intercambio relacionados con CDR3 incluyen CDR3-FR4 o FR3-CDR-3-FR4. Por lo tanto la región V completa tiene un total de veinte casetes de intercambio de uno a tres armazones y una a tres CDR.

En algunas realizaciones, los casetes extendidos se emplean en los métodos de reemplazo de la invención. Estos casetes extendidos tienen al menos una CDR y dos armazones que aparecen juntos de forma natural, es decir, están codificados por el mismo gen. El casete extendido incluye FR1-FR2-CDR1, FR2-CDR2-FR3 y en aquellas realizaciones que implican intercambio de secuencias de CDR3, FR3-CDR3-FR4.

Los repertorios de regiones V de anticuerpos novedosos se pueden construir mediante técnicas de ADN recombinante que comprenden una pluralidad de secuencias que codifican uno o más casetes de intercambio y uno o más segmentos clonados a partir de un anticuerpo de referencia. Tales repertorios codifican regiones V híbridas que no existen de forma natural y que contienen secuencias recombinadas a partir de genes V de anticuerpo diferentes.

Los métodos que comprenden el reemplazo de un casete de intercambio de una región variable con un casete de intercambio correspondiente a partir de un anticuerpo que se codifica por un gen diferente se pueden llevar a cabo secuencialmente o simultáneamente. Por tanto, un anticuerpo de referencia en el cual un casete de intercambio se ha reemplazado por una biblioteca correspondiente de secuencias a partir de otros genes de anticuerpo se puede seleccionar para unión a antígeno al mismo tiempo que un casete de intercambio diferente se reemplaza por una biblioteca separada de secuencias de casete de intercambio correspondientes y se selecciona para unión a antígeno. Como alternativa, se puede realizar una etapa de selección después de la otra.

Las bibliotecas se generan usando casetes clonados de secuencias de anticuerpo de referencia y repertorios de secuencias obtenidas a partir de inmunoglobulina humana. Los repertorios humanos se pueden generar mediante amplificación por PCR usando cebadores apropiados para los segmentos deseados a partir de ADNc obtenido de sangre periférica o bazo, en cuyo caso los repertorios se espera que contengan clones con mutaciones somáticas. Como alternativa, los repertorios se pueden obtener mediante amplificación de ADN genómico a partir de células del sistema no inmune con el fin de obtener secuencias codificadas por línea germinal no mutadas.

Las bibliotecas de casete se pueden expresar en una diversidad de vectores de expresión y presentarse en la superficie de virus, células o esporas. Los ejemplos de sistemas de presentación incluyen levaduras, bacterias o fagos. En este caso, las células hospedadoras o fagos se seleccionan en antígeno diana con el fin de aislar clones que expresan anticuerpos de unión a antígeno.

Como alternativa, las bibliotecas de casete se pueden expresar como anticuerpos solubles o fragmentos de anticuerpo y secretarse a partir de células hospedadoras. Por ejemplo, las bibliotecas se pueden expresar mediante secreción a partir de *E. coli* o levadura y las colonias de células que expresan moléculas de unión a antígeno se revelan mediante un ensayo de unión de transferencia de colonias. Se puede usar cualquier célula hospedadora adecuada. Tales células incluyen células tanto procariotas como eucariotas, por ejemplo, bacterias, levaduras o células de mamífero.

Ingeniería genética de anticuerpo usando bibliotecas de casete

En un aspecto, la invención proporciona métodos para modificar genéticamente anticuerpos, por ejemplo, humanizar un anticuerpo, que implican el reemplazo de partes de la región variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de referencia con la secuencia correspondiente a partir de un repertorio de secuencias de región variable. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado se puede generar mediante:

Construcción de un repertorio de segmentos de gen V de anticuerpo (Repertorio A). El repertorio A es una biblioteca de secuencias de anticuerpo humano en la cual cada miembro de la biblioteca se fusiona a una secuencia que codifica un casete de intercambio a partir de un anticuerpo de referencia en la posición apropiada de forma que se genera un segmento de gen V completo.

Fusión de los segmentos de gen V de anticuerpo del repertorio A con secuencias CDR3 a partir de un anticuerpo de referencia y secuencias que codifican una FR4 e inserción en un vector de expresión de forma que se puede generar un repertorio de regiones V funcionales (Repertorio B).

Emparejamiento del Repertorio B con una región V complementaria clonada o un repertorio de regiones V complementarias para formar el Repertorio C que comprende dímeros $V_H - V_L$ funcionales capaces de unión a antígeno.

Expresión de Repertorio C en una célula hospedadora de forma que los dímeros $V_H - V_L$ se secretan a partir de la célula hospedadora o se presentan como proteínas de fusión en la superficie celular.

Contacto con los dímeros $V_H - V_L$ del Repertorio C con antígeno y aislamiento de clones que expresan dímeros $V_H - V_L$ que se unen a antígeno.

Identificación de una región V de anticuerpo humanizado o repertorio de regiones V capaces de unirse a antígeno de la etapa 5 de forma que cada uno de los armazones y una o más de las CDR se obtienen a partir de un repertorio humano (Repertorio D).

El proceso se puede repetir de forma que casetes alternativos del anticuerpo de referencia se reemplazan con secuencias humanas. El proceso también se puede llevar a cabo repetitivamente de forma que los casetes de intercambio se reemplazan en serie de forma que toda o una gran parte del segmento de gen V del anticuerpo de referencia se reemplaza por secuencias humanas.

En una realización, el repertorio A consiste en secuencias de gen V_H híbridas que contienen un casete funcional a partir de un anticuerpo de referencia y una pluralidad de secuencias humanas para generar el dominio V_H completo. En este caso, la región V complementaria es una región V_L .

En una realización alternativa, el repertorio A consiste en secuencias V_L híbridas y el dominio V complementario es un dominio V_H .

Los dímeros $V_H - V_L$ pueden consistir en fragmentos F_v funcionales o los mismos pueden consistir en fragmentos de anticuerpo más largos tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv o inmunoglobulinas completas. Los dímeros $V_H - V_L$ también se pueden expresar como proteínas de fusión, por ejemplo en la superficie de un bacteriófago filamentoso. Preferentemente los dímeros $V_H - V_L$ se expresan y secretan a partir de una célula huésped y se unen a antígeno en forma soluble. Por ejemplo moléculas de Fab o Fab' se pueden expresar y secretar a partir de una célula hospedadora tal como *E. coli* o levadura.

El segmento de gen V híbrido consiste en un casete de intercambio a partir de un anticuerpo de referencia y secuencias humanas adicionales proporcionadas a partir de un repertorio de secuencias humanas para completar el segmento de gen V. Preferentemente, el anticuerpo de referencia es un anticuerpo no humano tal como un anticuerpo de roedor, pero el anticuerpo de referencia también puede ser un anticuerpo humano. El casete de intercambio tiene al menos un armazón y una CDR enlazadas en un orden natural y no tiene más de dos armazones y dos CDR. Los ejemplos de casetes de intercambio que se usan con frecuencia incluyen:

FR1-CDR1
FR1-CDR1-FR2
FR2-CDR2-FR3
CDR2-FR3, o
FR3-CDR3.

En algunas realizaciones, una CDR en un casete de intercambio es una CDR híbrida. Una "CDR híbrida" en el contexto de la presente invención se refiere a una CDR que comprende una MEBSD a partir de un anticuerpo de referencia y una secuencia adicional en la CDR que es diferente de la secuencia de CDR del anticuerpo de referencia. La posición de la secuencia MEBSD se puede determinar empíricamente mediante uno o más métodos que incluyen pero sin limitación barrido de alanina, cristalografía de rayos X, mutagénesis de punto aleatorio, etc., que se describen con mayor detalle más adelante. La sub-secuencia MEBSD puede estar en cualquier posición dentro de la CDR y típicamente comprende uno a varios aminoácidos. Un casete de CDR se puede construir usando cualquiera de las seis CDR contenidas dentro de V_H y V_L .

Con el fin de crear una biblioteca de repertorio que contenga la MEBSD de CDR, se diseña un cebador con oligonucleótidos que tanto codifican la MEBSD como hibridan a secuencias de línea germinal a partir de una región diferente de la CDR de forma que alguna parte del casete de CDR final incluya diversidad de secuencia representada en el repertorio de Ig humana. Una o ambas regiones flanqueantes que se unen de forma natural a la CDR del casete se incluyen en el repertorio creado. El repertorio de casete CDR-FR se combina posteriormente con las secuencias complementarias necesarias para crear una región V completa. Las secuencias complementarias se pueden obtener a partir de la secuencia del anticuerpo de referencia u otros casetes de intercambio que se conoce que soportan unión a antígeno. El casete CDR-FR se inserta en un vector de expresión junto con la cadena V_H o V_L complementaria.

Combinación de segmentos de gen V híbridos con secuencias de CDR3

Cada segmento de gen V híbrido se combina típicamente con secuencias CDR3 a partir de la cadena correspondiente de un anticuerpo de referencia y un segmento FR4 adecuado para permitir el ensamblaje de dominios V completos. La FR4 puede ser del anticuerpo de referencia o puede ser de un gen de segmento J humano clonado o un repertorio de secuencias FR4. Como alternativa, se puede proporcionar una MEBSD de una CDR3 a partir del anticuerpo de referencia y un segmento J humano completo se puede usar para proporcionar parte de CDR3 además de FR4.

La MEBSD es la región dentro de una secuencia de CDR3 o un par de CDR3 necesaria para conservar la especificidad de unión del anticuerpo de referencia cuando se combina con secuencias humanas que reconstituyen el resto de CDR3 y el resto de la región V. La MEBSD se puede definir empíricamente o se puede predecir a partir de consideraciones estructurales.

Para determinación empírica, se pueden llevar a cabo métodos tales como mutagénesis mediante alanina en la región CDR3 de un anticuerpo de referencia (Wells, Proc. Natl Acad. Sci. USA 93: 1-6, 1996) con el fin de identificar restos que juegan un papel en la unión a antígeno. Los análisis adicionales pueden incluir Mutagénesis Dirigida Exhaustiva, en la cual cada resto de CDR3 se reemplaza, uno por vez, con cada uno de los 19 aminoácidos alternativos, en lugar del reemplazo únicamente con alanina. Se pueden usar ensayos de unión, por ejemplo, ensayos de unión de transferencia de colonia, para explorar bibliotecas de tales mutantes para determinar aquellos mutantes que conservan especificidad de unión. Las colonias que secretan fragmentos de anticuerpo con señales de ensayo reducidas en al menos diez veces con relación al anticuerpo de referencia se pueden secuenciar y las secuencias de ADN usarse para generar una base de datos de posiciones de aminoácidos en CDR3 que son importantes para la retención de unión. La MEBSD se puede definir entonces como el conjunto de restos que no toleran sustitución de sitio única o que toleran únicamente sustitución conservativa de aminoácidos.

La MEBSD también se puede deducir a partir de consideraciones estructurales. Por ejemplo, si se conoce la estructura cristalina de rayos X o si está disponible un modelo de la interacción de anticuerpo y antígeno, la MEBSD se puede definir a partir de los aminoácidos necesarios para formar contacto adecuado con el epitopo y para conservar la estructura de la superficie de unión a antígeno.

Como alternativa, la MEBSD se puede predecir a partir de la estructura primaria de la CDR3. Por ejemplo, en dominios V_H , la MEBSD puede, en algunos anticuerpos, corresponder a un segmento D (incluyendo cualquier supresiones o adiciones N identificables que se producen como resultado del re-arreglo y la maduración del anticuerpo de referencia). En este caso, el segmento J se puede reemplazar por un segmento J humano clonado o un repertorio de segmentos J. La especificidad de unión del dominio V_H de referencia modificado con segmento J sustituido se puede determinar en combinación con una cadena ligera complementaria adecuada. Esta cadena complementaria puede ser la cadena ligera del anticuerpo de referencia o puede ser una cadena ligera humana que contenga la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo de referencia. La especificidad de unión se puede determinar mediante ensayo de unión de transferencia de colonia o mediante otra metodología de ensayo conocida. Si las colonias que secretan anticuerpos de unión a antígeno no se identifican mediante este enfoque, las secuencias adicionales de la CDR3 del anticuerpo de referencia se pueden sustituir por secuencias correspondientes en el segmento J y estos mutantes adicionales explorarse con la cadena ligera complementaria hasta que se identifica una MEBSD.

Las MEBSD se pueden identificar de forma similar en CDR3 de la cadena ligera, en cuyo caso la cadena complementaria usada en el ensayo de exploración comprende un dominio V_H . En este caso, el dominio V_H se puede obtener a partir del anticuerpo de referencia o puede ser un dominio V_H humano con la CDR3 del anticuerpo de referencia. Debido a que no existe segmento D en la cadena ligera, la MEBSD se puede deducir mediante mutagénesis dirigida o mediante inspección de la secuencia de CDR3 y sustitución de esas secuencias en CDR3 codificadas por el segmento de gen V o esas secuencias codificadas por el segmento J. La exploración para determinar unión a antígeno, por ejemplo, mediante ensayo de unión de transferencia de colonia, se puede usar para definir qué segmento de la CDR3 constituye la MEBSD.

Adicionalmente, programas informáticos tales como JOINSOLVER™ (Souto-Carneiro, *et al.*, J. Immunol. 172: 6790-6802, 2004) se pueden usar para analizar CDR3 de gen de inmunoglobulina para buscar secuencias de línea

germinal D. La estrategia de JOINSOLVER® es buscar secuencias de línea germinal D que flanquean genes de línea germinal V_H y J_H . Adicionalmente, el mismo busca adiciones de tipo P y N en las uniones VHD y DJ_H. La base de datos de genes de línea germinal D humanos empleada incluye todos los segmentos D del banco de datos IMGT así como los genes de línea germinal inversos y DIR.

5 Por tanto, por ejemplo, un dominio V_H híbrido de la invención puede comprender un casete de intercambio de un anticuerpo de referencia tal como un anticuerpo de ratón, secuencias de gen V restantes a partir de un repertorio humano, un segmento D a partir del anticuerpo de referencia y un segmento JH humano. En un segundo ejemplo, el dominio V_H o V híbrido puede comprender un casete de intercambio de un anticuerpo de referencia de roedor, secuencias de gen V restantes de un repertorio humano, una región CDR3 del anticuerpo de referencia y un segmento FR-4 humano.

15 En otra realización, el segmento de gen V híbrido puede estar comprendido por casetes de intercambio completamente humanos de dos o más genes V_H o V_L humanos diferentes. Por tanto, por ejemplo, un casete de intercambio se puede obtener de un gen V_H humano y fusionarse a un segundo casete de intercambio de un gen V_H humano diferente de la misma subclase o de una subclase diferente. Con frecuencia, ambos casetes funcionales tienen secuencia de línea germinal o tienen secuencias cercanas a línea germinal.

20 El reemplazo en serie para identificar casetes de gen V humanos funcionales compatibles con unión a antígeno, permite el reemplazo rápido del segmento de gen V de un anticuerpo de referencia con secuencias completamente humanas. La capacidad de recombinar casetes de intercambio a partir de dos o más genes de anticuerpos diferentes aumenta la diversidad potencial de secuencias generadas a partir de las bibliotecas de gen V humanas. Mediante este enfoque, es posible recombinar dos o más casetes de línea germinal para generar diversidad de secuencia adicional no encontrada en la línea germinal pero sin introducir mutaciones puntuales potencialmente inmunogénicas.

Combinación de casetes de intercambio seleccionados

30 En algunas realizaciones, la selección de anticuerpos que comprenden casetes intercambiados incluye etapas donde la misma región flanqueante se incluye en el casete de intercambio durante más de una etapa de selección, por ejemplo, se lleva a cabo una etapa de reemplazo de una FR1-CDR1-FR2 a partir de un anticuerpo de referencia y también se lleva a cabo una etapa de reemplazo de la FR2-CDR2-FR3 a partir del anticuerpo de referencia. En estos casos, los anticuerpos seleccionados se identifican y después la región o regiones flanqueantes solapantes (en este ejemplo, FR2) se combinan para crear el nuevo anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia. La etapa de combinación de la región flanqueante solapante (es decir, FR2 en este ejemplo) puede comprender combinar las dos regiones flanqueantes seleccionadas de forma independiente en una región de homología elevada, o seleccionar una u otra de las regiones flanqueantes para incorporación. La combinación de las regiones flanqueantes se describe adicionalmente en la sección "**Anticuerpos modificados por ingeniería genética**". Típicamente, cuando las dos regiones flanqueantes se combinan, las mismas son regiones flanqueantes de la misma subclase. Por consiguiente, las mismas tienen un grado de homología elevado (es decir, típicamente mayor del 80% de identidad).

45 La combinación de los casetes de intercambio se puede realizar mediante recombinación entre regiones homólogas o mediante la fusión de casetes adyacentes en orden natural. La recombinación se puede permitir que ocurra mediante procesos de recombinación naturales en una célula hospedadora o se puede realizar mediante técnicas de biología molecular *in vitro*. Por ejemplo, dos secuencias homólogas a partir de casetes complementarios se pueden digerir con enzimas de restricción y ligarse entre sí. Como alternativa, las secuencias recombinadas deseadas se pueden diseñar y generar usando ADN sintético o ensamblarse usando oligonucleótidos sintéticos mediante el uso de técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. La fusión de casetes de intercambio adyacentes se consigue mediante técnicas de ADN recombinante convencionales por ejemplo usando PCR.

Generación de regiones V mediante el reemplazo de casetes que contienen CDR3

55 Como se ha indicado anteriormente, la región V completa tiene dos casetes mínimos adicionales (CDR3 y FR4) que no están presentes en el segmento de gen V. Estos casetes adicionales del anticuerpo de referencia también se pueden sustituir por secuencias de una biblioteca de secuencias de anticuerpo humano de forma que una región V se genera a partir de secuencias completamente humanas mientras que conserva la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo de referencia.

60 En este caso, el segmento de gen V se humaniza en primer lugar mediante reemplazo en serie de casetes funcionales como se ha descrito anteriormente. El segmento de gen V humanizado se usa posteriormente para guiar la selección de un repertorio de secuencias que comprende secuencias CDR3 y FR4 humanas. Un anticuerpo humanizado o completamente humano con al menos una CDR3 que contiene secuencias humanas se genera mediante:

65

Obtención de secuencias de gen V a partir de repertorio D anteriormente y combinación con secuencias de CDR3 y secuencias FR4 a partir de una biblioteca de secuencias CDR3-FR4 para formar el Repertorio E.

Expresión de Repertorio E en una célula hospedadora y co-expresión de una o una pluralidad de cadenas complementarias de forma que se genera un repertorio de dímeros V_H-V_L .

5 Contacto de dímeros V_H-V_L con antígeno y aislamiento de dímeros V_H-V_L que se unen al antígeno.

Las secuencias de gen V del Repertorio D pueden ser secuencias V_H , en cuyo caso la cadena complementaria es una cadena V_L . Como alternativa, las secuencias de gen V en el repertorio D pueden ser secuencias V_L y la cadena complementaria es una cadena V_H .

10 La biblioteca de secuencias de CDR3-FR4 puede ser de origen completamente humano o puede estar comprendida parcialmente por secuencias humanas con algunas secuencias conservadas del anticuerpo de referencia. Por ejemplo, la secuencia de la región codificada por el segmento J se puede proporcionar mediante uno o una pluralidad de segmentos J humanos y el resto de la CDR3, comprendida por el segmento D y cualquier adición N, puede ser del anticuerpo de referencia. Como alternativa, la CDR3 puede contener secuencias aleatorias o secuencias sintéticas.

15 En algunas realizaciones, la región CDR3-FR4 puede estar comprendida por una región FR3-CDR3-FR4. En una realización de este tipo, la FR3 puede ser, por ejemplo, de un repertorio humano con una región CDR3-FR4 como se ha descrito anteriormente.

20 Anticuerpos modificados por ingeniería genética

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética usando los métodos de la invención como se describe en el presente documento tienen al menos un casete de intercambio de un gen de anticuerpo y un segundo casete de otro gen de anticuerpo. Los anticuerpos formados a partir de la combinación de dos o más casetes de intercambio se distinguen de los anticuerpos humanos de origen natural y de otras formas de anticuerpos modificados por ingeniería genética o seleccionados *in vitro* o *in vivo* en base a sus secuencias. La combinación de los dos casetes de intercambio genera diversidad combinatoria adicional que no se encuentra en los anticuerpos naturales. Para las combinaciones de casetes de intercambio de línea germinal, el origen de cada casete se identifica fácilmente a partir de bases de datos de secuencias de región V de línea germinal humanas. Para combinaciones que implican casetes de intercambio a partir de anticuerpos mutados somáticamente, la secuencia de línea germinal humana más cercana se identifica mediante comparación de cada casete mínimo a su vez con las bases de datos de secuencias de región V. Por este medio, se pueden identificar los casetes de intercambio usados en la construcción de una región V recombinada.

25 Se conocen las secuencias de todos los genes de región V de línea germinal humanos y se puede acceder a ellas en la base de datos de base V, proporcionada por el MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido (Honegger y Pluckthun, J. Mol. Biol. 309: 657, 2001; Tomlinson, *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 776, 2002; Cox, *et al.*, Eur. J. Immunol. 24: 827, 1994).

Los métodos de la invención también proporcionan anticuerpos humanos novedosos generados por recombinación entre casetes de intercambio en una o ambas regiones V. El reemplazo de casetes de intercambio proporciona diversidad adicional a partir de la recombinación entre diferentes genes V. Los casetes pueden ser una combinación de casetes no humanos y humanos o pueden ser completamente humanos.

30 Existen 51 genes V_H de línea germinal en seres humanos y cada uno de estos se puede recombinar. Existen 40 genes V_{kappa} y 31 genes V_{lambda} y cada uno de los genes kappa o lambda se puede recombinar. Preferentemente la recombinación es entre miembros de la misma subclase. Los genes de línea germinal V_H se subdividen en 7 subclases ($V_{H1}-V_{H7}$) y las cadenas ligeras de línea germinal se subdividen en 16 subclases ($V_{\text{kappa}1}-V_{\text{kappa}6}$ y $V_{\text{lambda}1}-V_{\text{lambda}10}$).

35 La recombinación entre casetes funcionales puede realizarse de forma provechosa usando secuencias homólogas en uno de los armazones. Por ejemplo, las regiones FR2 de anticuerpos dentro de la misma subclase V_H son altamente homólogas. Las secuencias de región FR2 de los anticuerpos de línea germinal humanos se muestran más adelante. Los anticuerpos de línea germinal de la subclase V_{H2} tienen secuencias de aminoácido idénticas en FR2. En la subclase V_{H3} , 9 de 22 secuencias de anticuerpo de línea germinal tienen secuencias FR2 idénticas al consenso para esta subclase. Únicamente 2 de 51 anticuerpos de línea germinal humanos difieren de la secuencia de FR2 de consenso para su subclase particular en más de 1 aminoácido de los 14 aminoácidos en FR2. Estos se muestran más adelante en la Tabla 1.

40 Tabla 1. Secuencias de aminoácido de la región Flanqueante-2 de dominios V_H de línea germinal humanos. Las secuencias en la tabla representan únicamente las subclases con más de un miembro. Las diferencias de la secuencia de consenso para cada subclase están subrayadas.

65

ES 2 429 541 T3

				SEC ID N°:	
VH1	1-3	1-02	WVRQAPGQGLEWMG	1	
	1-3	1-03	WVRQAPGQ <u>R</u> LEWMG	2	
	1-3	1-08	WVRQA <u>I</u> GQGLEWMG	3	
	1-2	1-18	WVRQAPGQGLEWMG	1	
	1-U	1-24	WVRQAPG <u>K</u> GLEWMG	4	
	1-3	1-45	WVRQAPGQ <u>A</u> LEWMG	5	
	1-3	1-46	WVRQAPGQGLEWMG	1	
	1-3	1-58	WVRQA <u>R</u> GQ <u>R</u> ASE <u>I</u> T	6	
	1-2	1-69	WVRQAPGQGLEWMG	1	
	1-2	1-E	WVRQAPGQGLEWMG	1	
	1-2	1-f	WV <u>Q</u> QAPG <u>K</u> GLEWMG	7	
	VH2	3-1/2-1	2-05	WIRQPPGKALEWLA	8
		3-1	2-26	WIRQPPGKALEWLA	8
3-1		2-70	WIRQPPGKALEWLA	8	
VH3	1-3	3-07	WVRQAPGKGLEWV <u>A</u>	9	
	1-3	3-09	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	1-3	3-11	W <u>I</u> RQAPGKGLEWVS	11	
	1-1	3-13	WVRQA <u>I</u> GKGLEWVS	12	
	1-U	3-15	WVRQAPGKGLEWVG	13	
	1-3	3-20	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	1-3	3-21	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	1-3	3-23	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	1-3	3-30	WVRQAPGKGLEWVA	9	
	1-3	3-30.3	WVRQAPGKGLEWV <u>A</u>	9	
	1-3	3-30.5	WVRQAPGKGLEWV <u>A</u>	9	
	1-3	3-33	WVRQAPGKGLEWV <u>A</u>	9	
	1-3	3-43	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	1-3	3-48	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	1-U	3-49	W <u>E</u> RQAPGKGLEWV <u>I</u>	14	
	1-1	3-53	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	1-3	3-64	WVRQAPGKGLE <u>Y</u> VS	15	
	1-1	3-66	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	1-4	3-72	WVRQAPGKGLEWV <u>I</u>	13	
	1-4	3-73	MVRQA <u>S</u> GKGLEWVG	16	
	1-3	3-74	WVRQAPGKGL <u>V</u> WVS	17	
	1-6	3-d	WVRQAPGKGLEWVS	10	
	VH4	2-1/1-1	4-04	W <u>V</u> RQPPGKGLEWIG	18
2-1		4-28	WIRQPPGKGLEWIG	19	
3-1		4-30.1	WIRQ <u>H</u> PGKGLEWIG	20	
3-1		4-30.2	WIRQPPGKGLEWIG	19	
3-1		4-30.4	WIRQPPGKGLEWIG	19	
3-1		4-31	WIRQHPGKGLEWIG	20	
1-1		4-34	WIRQPPGKGLEWIG	19	
3-1		4-39	WIRQPPGKGLEWIG	19	
1-1		4-59	WIRQPPGKGLEWIG	19	
3-1		4-61	WIRQPPGKGLEWIG	19	
2-1		4-b	WIRQPPGKGLEWIG	19	

Adicionalmente, los segmentos de gen V se pueden recombinar con un casete CDR3-FR4 que puede ser humano o que puede estar comprendido por secuencias humanas y no humanas.

5

Por tanto, en una realización, un dominio V_H o un dominio V_L contienen los siguientes elementos:

un segmento de gen V comprendido por un casete de intercambio humano a partir de un gen de anticuerpo humano y un segundo casete de intercambio a partir de un gen de anticuerpo humano diferente una CDR3 obtenida al menos parcialmente a partir de un anticuerpo de referencia una secuencia FR4.

5 Con frecuencia al menos uno de los casetes de intercambio es idéntico a una secuencia de línea germinal humana. El dominio V_H o V_L en esta realización está emparejado con una cadena complementaria para formar un dímero V_H-V_L funcional, capaz de unirse a un antígeno definido. La cadena complementaria tiene típicamente una secuencia CDR3 obtenida a partir del mismo anticuerpo de referencia que la primera cadena de forma que el par de CDR3 define la especificidad de la unión a antígeno. Con mayor frecuencia, la segunda cadena tiene una CDR3 a partir de un anticuerpo de referencia y un segmento de gen V completo a partir de un clon de anticuerpo único, tal como un gen de línea germinal humano.

10 También se proporciona un dímero V_H-V_L humano capaz de unirse a un antígeno con especificidad predefinida que comprende:

15 una primera región V comprendida por un segmento de gen V codificado por línea germinal; una parte de CDR3 obtenida a partir de un anticuerpo de referencia; y secuencias adicionales para completar las secuencias CDR3 y FR4.

20 una región V complementaria comprendida por un segmento de gen V constituido a partir de dos casetes de intercambio recombinados al menos uno de los cuales es de secuencia de línea germinal; una parte de CDR3 obtenida a partir de un anticuerpo de referencia; y secuencias adicionales para completar las secuencias CDR3 y FR4.

25 En un ejemplo, la primera región V es una región V_H y la parte de CDR3 a partir del anticuerpo de referencia es un segmento D de un anticuerpo de roedor que se une a un antígeno de especificidad predefinida. En este caso, la región V complementaria es una región V_L y la parte de la CDR3 a partir del anticuerpo de referencia puede ser obtenida de gen V o puede ser parte del segmento JL.

30 En algunos se usan CDR3 completas a partir del anticuerpo de referencia, en cuyo caso los pares de CDR3 son suficientes para dirigir la especificidad de unión del dímero V_H-V humano al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia.

35 La recombinación de dos casetes de intercambio a partir de diferentes anticuerpos humanos se usa para acceder a diversidad de secuencia adicional que no se encuentra en genes de línea germinal humanos naturales pero sin la necesidad de explotar mutación somática con el fin de generar anticuerpos de afinidad adecuada para el antígeno deseado. Tales anticuerpos tienen segmentos de gen V comprendidos en su totalidad a partir de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal y por lo tanto se espera que sean mínimamente inmunogénicos en uso clínico en seres humanos. La recombinación de dos genes específicos puede, sin embargo, introducir "epítopos de unión", es decir, secuencias en el sitio de recombinación que no se encuentran de forma natural y que se pueden reconocer por receptores de células T como epítopos de células T extraños y por lo tanto desencadenar una respuesta inmune. Sin embargo, mediante la elección apropiada de sitios de recombinación, tales epítopos de unión se pueden reducir o evitar en su totalidad. Por tanto, por ejemplo, los diferentes miembros de la subclase V_{H3} de cadenas pesadas son altamente homólogos en la región Flanqueante-2 y la recombinación en esta región se puede usar para evitar la generación de epítopos de células T de unión significativos.

Clonación de segmento V humano

50 Segmentos V humanos correspondientes a casetes de intercambio se pueden obtener usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, segmentos V, tanto de línea germinal como madurados por afinidad, se pueden obtener a partir de repertorios de región V de linfocitos de sangre periférica (PBL) combinados a partir de múltiples individuos usando métodos de clonación de ADNc convencionales (Sambrook y Russell, eds, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a Ed., vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). Se puede usar PCR para amplificar segmentos V deseados para clonación. Sin embargo, los mecanismos de amplificación exponencial son propensos a desviaciones aleatorias y esto puede verse agravado por el uso de cebadores degenerados, que tienen eficacias de cebado variables, dando como resultado una pérdida significativa de diversidad. Por tanto, cuando se desea amplificación, puede ser deseable usar un primer método de amplificación lineal independiente, tal como transcripción *in vitro* (Sambrook y Russell, eds, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a Ed., vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

60 En una realización, se aísla ARNm a partir de PBL humanos u otros tejidos con alto contenido en linfocitos tales como bazo usando métodos convencionales (por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1997).

65 Las secuencias de segmento V humano de línea germinal se pueden clonar a partir de ADN genómico humano mediante PCR o métodos de amplificación lineal en la misma manera que secuencias de segmento V re-arregladas

y mutadas somáticamente se clonan a partir de ADNc.

Métodos de exploración

- 5 Se pueden usar varios procedimientos de exploración diferentes dependiendo de la elección del vector de expresión. Los métodos de exploración por presentación se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, referencias de presentación ilustrativas citadas anteriormente).

10 En una realización, el repertorio de anticuerpo se expresa como fragmentos Fab o Fab' en *E. coli*. Tales fragmentos de anticuerpo se pueden detectar, por ejemplo, en un ensayo de transferencia de colonia. El uso de fragmentos Fab', con una bisagra de inmunoglobulina, permite la generación de una mezcla de moléculas Fab' monovalentes y fragmentos F(ab')₂ bivalentes. La presencia de moléculas F(ab')₂ puede ser provechosa en la detección de anticuerpos frente a determinados antígenos para los cuales la unión bivalente puede contribuir a la avidéz y por tanto a la intensidad de la señal en el ensayo de detección. Un protocolo ilustrativo para explorar moléculas secretadas mediante un ensayo de transferencia de colonia se describe brevemente más adelante.

20 Vectores y métodos para expresión de fragmentos de anticuerpos a partir de *E. coli* se conocen en la técnica (por ejemplo, Pluckthun, *Methods* 2: 88-96, 1991; Corisdeo y Wang, *Protein Expr Purif.* 34: 270-9, 2004; Humphreys *et al.*, *Protein Expr Purif.* 26: 309-20, 2002). Las cadenas pesada y ligera se pueden expresar a partir de dos promotores separados (tales como los promotores tac, lac o Ara) o a partir de un mensaje dicistrónico, en cuyo caso se usa un promotor único. Cada cadena se traduce. En algunas realizaciones, un péptido señal se puede presentar péptido para secreción directa. Un péptido señal de este tipo puede ser un péptido señal procariota natural tal como PelB u OmpA o puede ser un péptido señal no natural (por ejemplo, Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2002/0072093).

25 También se conocen ensayos de unión de transferencia de colonia para detección de unión de fragmentos de anticuerpos secretados a antígeno recubierto en filtros (por ejemplo, Govannoni *et al.*, *Nucleic Acids Research* 29: e27, 2001). Para exploración de biblioteca, la biblioteca se siembra en placas a una densidad de no más de ~ 10⁴ por placa de 150 mm o el equivalente en medio sólido con antibiótico, pero sin inductor de transcripción. Por tanto, para una biblioteca de 10⁶, se requieren al menos 100 de las placas de 150 mm o el equivalente. Después de cultivo durante una noche, las colonias resultantes se transfieren a filtros de nitrocelulosa y se incuban en medio recién preparado durante unas pocas horas en presencia del inductor de transcripción, por ejemplo, IPTG para el promotor *lac*. El filtro se transfiere con el lado de las colonias hacia arriba a un segundo filtro, que se ha recubierto con antígeno (0,5-20 µg/ml), se ha bloqueado con leche seca sin grasa y colocado sobre medio sólido recién preparado que contiene el inductor. Los filtros se incuban durante algunas pocas horas más mientras que los anticuerpos se difunden desde las colonias hasta el antígeno en el filtro directamente por debajo de cada colonia. Los filtros recubiertos con antígeno se procesan posteriormente para detectar anticuerpos unidos al antígeno. Los filtros se lavan y se incuban durante unas pocas horas con un anticuerpo anti-etiqueta que se une a la etiqueta de epítipo en cada Fab y que se conjuga a peroxidasa de rábano picante (HRP). La conjugación puede ser directa o indirecta, por ejemplo, a través de acoplamiento de biotina-estreptavidina o similares. Después de lavar el anticuerpo anti-etiqueta/HRP no unido, el filtro se incuba posteriormente en presencia del sustrato (reactivo ECL Plus, Amersham Biosciences) como se ha indicado por el comerciante y el Fab unido se detecta y cuantifica mediante detección espectrofotométrica o autorradiográfica de la quimioluminiscencia resultante. Como cada filtro es una imagen de la placa a partir de la cual se transfirieron las colonias, las colonias que producen Fab que se une a antígeno se identifican fácilmente y se recuperan. Las condiciones para el CLBA se pueden optimizar empíricamente. Por ejemplo, el inductor de transcripción se puede optimizar para evitar la sobreexpresión o subexpresión determinando experimentalmente la cantidad necesaria para, por ejemplo, detección del 100% de diez-veces-sobre el fondo mediante quimioluminiscencia de la biblioteca de Fab cuando se usa un agente de unión de Fab universal, por ejemplo, un anticuerpo anti-Ig humana, como el antígeno en el filtro.

50 La rigurosidad de selección también se puede manipular ajustando la concentración de antígeno en el filtro. Por ejemplo, la concentración de antígeno sobre la cual el Fab que se tiene que humanizar produce una señal mínima, por ejemplo, no más de 10 veces sobre el fondo, se puede determinar y usarse para selección, de forma que los Fab con afinidades superiores y/o niveles de expresión superiores se pueden identificar fácilmente mediante la intensidad de sus señales. Los niveles de expresión se pueden determinar en paralelo preparando réplicas de transferencias de colonia e incubándolas sobre filtros recubiertos con un agente de unión de Fab universal, tal como un anticuerpo anti-Ig humana. La afinidad relativa para cada colonia se determina posteriormente como la proporción de su señal de quimioluminiscencia a partir del filtro de antígeno a su señal a partir del filtro de agente de unión a Fab y las proporciones se pueden comparar entre sí y con la misma proporción para el Fab no humano parental para ordenar de acuerdo a su importancia los Fab seleccionados de acuerdo con la afinidad. Las afinidades absolutas se pueden determinar posteriormente mediante cualquiera de varios métodos, por ejemplo, métodos de resonancia de plasmón superficial (SPA, Fägerstam *et al.*, 1992, *J Chromatog* 597: 397-410).

Determinación de afinidad

5 Anticuerpos aislados a partir de exploraciones primarias de anticuerpos secretados o seleccionados a partir de tecnologías de presentación se someten a análisis adicional con el fin de determinar afinidades cuantitativas por antígeno diana. Típicamente, los anticuerpos se expresan en forma soluble para este fin, lo cual puede necesitar el reformateo como un fragmento soluble o como IgG completa si los anticuerpos se aislaron originalmente como proteínas de fusión a partir de un enfoque de presentación en superficie.

10 Las afinidades se pueden determinar mediante una diversidad de estudios de unión de competición que requieren interacción de anticuerpo en solución con antígeno nativo, en solución o en células completas y análisis de afinidad a partir de representaciones de Scatchard. Como alternativa, la afinidad se puede determinar en antígeno asilado, por ejemplo en Ensayos de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA) o mediante análisis de resonancia de plasmón superficial o numerosos inmunoensayos diferentes conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999). Harlow & Lane y
15 manuales de procedimiento similares también divulgan técnicas para cartografiar epítopos o, como alternativa, experimentos de competición para determinar si un anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo donador.

20 En las primeras etapas de exploración, por ejemplo, exploraciones que analizan el reemplazo de un casete de intercambio donde el resto de las secuencias de anticuerpo son anticuerpo de referencia, se selecciona un anticuerpo que tiene una afinidad demostrable por el anticuerpo. La afinidad puede ser menor que el anticuerpo de referencia.

25 Los anticuerpos producidos usando los métodos de la invención son típicamente anticuerpos de afinidad elevada y pueden tener constantes de disociación monovalentes en el intervalo de 50 nM a 1 pM. Preferentemente el anticuerpo tiene una afinidad monovalente menor que 10 nM y más preferentemente menor que 1 nM.

Los anticuerpos tienen afinidades preferentemente de no más de 5 veces peores que el anticuerpo de referencia y más preferentemente tienen afinidad más elevada que el anticuerpo de referencia.

30 EjemplosConstrucción y exploración de bibliotecas de casete V_H o V_L

35 Regiones V híbridas se crean mediante recombinación de parte de un anticuerpo de referencia con bibliotecas de casete creadas a partir de un repertorio de región V humano. El proceso de recombinación se realiza típicamente mediante PCR de extensión por solapamiento, un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia (Mehta, RK and Singh, J., *Biotechniques* 26: 1082-1086,1999). La cadena híbrida puede ser una V_H o una V_L . Los repertorios de segmento V humanos se pueden obtener a partir de segmentos V codificados por ARNm aislado a partir de cualquiera de varias células B que producen Ig incluyendo aquellas en la sangre periférica o el bazo. La
40 biblioteca de casete V_H o V_L se puede emparejar con la cadena complementaria que puede ser del anticuerpo de referencia, de una cadena humana o de una cadena híbrida humana-de referencia y ensayarse para determinar la unión al antígeno diana.

45 La biblioteca de casete de intercambio se crea típicamente con dos o más ciclos de PCR. En la primera etapa, la secuencia del anticuerpo de referencia se usa para diseñar cebadores de PCR para las regiones N-terminal o C-terminal y una región o regiones (típicamente las CDR) dentro de la región V que serán comunes para todas las moléculas en la biblioteca recombinada. Los cebadores de PCR también se diseñan para ser complementarios a repertorios de región V humana, aprovechando la conservación de secuencia de nucleótidos y aminoácidos encontrada en las familias de región V. Los cebadores de repertorio se pueden degenerar en una o más posiciones
50 para dar cuenta de la heterogeneidad de secuencia. El cebador o el conjunto de cebador se pueden diseñar para amplificar una o más familias de región V.

Ejemplo 1. Casete de intercambio de FR1-CDR1-FR2

55 A modo de ejemplo, se usan tres reacciones de PCR para crear una región V híbrida. La primera PCR amplifica la región FR1-CDR1-FR2 humana a partir de un repertorio de segmento V humano usando los cebadores A y B (Figura 1a). El cebador A se selecciona entre uno o más de un grupo de cebadores N-terminales diseñados para amplificar todas las regiones V_L de línea germinal (Welschof, M. *et al.*, *J. Immunological Methods* 179: 203-214, 1995). Adicionalmente, se une un sitio de enzima de restricción en el extremo 5' del cebador A para clonación posterior en un vector de expresión. El cebador B es uno o más cebadores complementarios a una región conservada en el
60 centro de o en el extremo C-terminal de FR2 humana; la región de complementariedad tiene típicamente 12-15 nucleótidos (nt) y puede incluir posiciones degeneradas para dar cuenta de la heterogeneidad en la línea germinal humana.

65 Adicionalmente, el Cebador B tiene una región de 12-15 nt en su extremo 5' complementaria a 12-15 nt del anticuerpo de referencia. La segunda PCR amplifica la región CDR2-FR3-CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia

usando Cebadores C y D (Figura 1b), habiéndose diseñado los cebadores C y D usando la secuencia de nucleótidos conocida del anticuerpo de referencia. Típicamente, el Cebador D tiene un sitio de restricción unido en su extremo 5' para clonación posterior en un vector de expresión. Las reacciones de PCR usan condiciones convencionales (por ejemplo 94° C durante 10 s, 50° C durante 1 min y 72° C durante 30 s, repetidos durante 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes se purifican en gel lejos de los Cebadores A, B, C y D de amplificación y se cuantifica el rendimiento de producto. En la tercera y última PCR, cantidades molares iguales de los dos productos de PCR se mezclan y amplifican con Cebador A y Cebador D usando condiciones de ciclación convencionales. Las regiones complementarias de los Cebadores B y C se hibridan y soportan la síntesis de una región V contigua que es un híbrido del repertorio humano FR1-CDR1-FR2 y el anticuerpo de referencia CDR2-FR3-CDR3-FR4 (Figura 1c). La biblioteca de región V híbrida se clona en un vector de expresión usando los sitios de restricción en los Cebadores A y D y típicamente se aíslan 10.000 clones para análisis adicional.

Un ejemplo específico del casete de intercambio FR1-CDR1-FR2 es el siguiente. Un repertorio humano de secuencia FR1-CDR1-FR2 se adjuntó a la región CDR2-FR3-CDR3-FR4 murina del anticuerpo anti-citoquina humana 19 y los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 humanos que soportan la unión a antígeno se seleccionaron entre el repertorio. El Cebador A es específico para los extremos N de las regiones V de V_H humanas; un sitio BssHII se unió al Cebador A y se usó para clonación en un vector de expresión. El Cebador B es una mezcla de los tres cebadores que se hibridan al extremo C-terminal de un repertorio FR2 humano. 15 nt adicionales de la secuencia CDR2 del anticuerpo murino 19 se añadieron al extremo 5' del Cebador B como una región de hibridación al Cebador C en la PCR de extensión por solapamiento usada para construir la región V final. El Cebador C se hibrida a la CDR2 de la V_L del anticuerpo murino 19 y se solapa con el extremo 5' de las secuencias que comprenden el Cebador B. El Cebador D se hibrida a FR4 del Fab murino y tiene un sitio SpeI unido que se usa para clonación en un vector de expresión.

En la primera PCR, los cebadores A y B se usaron para amplificar los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 humanos a partir del ADNc de primera cadena de un repertorio de Ig inmune humano obtenido a partir de sangre periférica y bazo. En la segunda PCR, se amplificó la CDR2-FR3-CDR3-FR4 de V_L murina 19. Cantidades molares iguales de las dos PCR se mezclaron y amplificaron con los Cebadores A y D para construir la región V final. De este modo, se construyó la biblioteca de casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 de repertorio humano. Una cadena pesada Vh1-02 de línea germinal que contiene el anticuerpo murino 19 CDR3-FR4 se usó para la cadena complementaria.

Aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes se ensayaron en un ensayo de unión de transferencia de colonia (CLBA) usando la proteína de citoquina humana como el antígeno diana. Se seleccionaron dos clones, FB27-A11 y FB27-A12, que se unen al antígeno. Cada uno era una secuencia FR1-CDR1-FR2 V_H humana unida a la secuencia CDR2-FR3-CDR3-FR4 murina. Los clones FB27 demostraron unirse a antígeno de citoquina humana en un ensayo de ELISA.

Ejemplo 2. Casete de intercambio de FR2-CDR2-FR3

En otra realización de la invención, un repertorio de FR2-CDR2-FR3 se recombina con las regiones FR1-CDR1 y CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia. En este ejemplo, tres reacciones de PCR se realizan para obtener la región V híbrida final. El repertorio de región V humana se obtiene a partir de una biblioteca de segmentos V humanos a los cuales se ha unido la región CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia mediante procedimientos de ADN recombinante convencionales. El Cebador A y el Cebador B (Figura 2a) se diseñan para ser complementarios al extremo N de la región V y la región C-terminal de CDR1 del anticuerpo de referencia; típicamente un sitio de restricción se une al extremo 5' del Cebador A para clonación posterior en un vector de expresión. Para la primera reacción de PCR, se usan Cebadores A y B para amplificar la región FR1-CDR1 del anticuerpo de referencia usando condiciones de ciclación convencionales para la PCR. El producto de PCR resultante se purifica en gel lejos de los Cebadores A y B y se cuantifica. Para la segunda reacción de PCR, el Cebador C (Figura 2b) se diseña para ser complementario a las regiones FR2 del repertorio de Ig humana de región V; algunas posiciones del Cebador B pueden estar degeneradas para dar cuenta de las variaciones en la secuencia de nucleótidos de línea germinal humana. Adicionalmente, una secuencia de 12-18 nt complementaria a los 12-18 nt finales de CDR1 del anticuerpo de referencia se une al extremo 5' del Cebador C para facilitar la PCR de extensión por solapamiento. El cebador D (Figura 2b) es complementario al extremo 3' de FR4; típicamente un sitio de restricción se une al extremo 5' del Cebador D para clonación posterior en un vector de expresión. Los Cebadores C y D se usan para amplificar el repertorio humano FR2-CDR3-FR3 más regiones CDR3-FR4 de referencia a partir de la biblioteca de repertorio de región V humana usando condiciones de ciclación convencionales para la PCR. El producto de PCR resultante se purifica en gel lejos de los Cebadores C y D y se cuantifica. En la tercera y última PCR, cantidades molares iguales del primer y segundo productos de PCR se mezclan y amplifican con Cebador A y Cebador D usando condiciones de ciclación convencionales. Las regiones complementarias de Cebadores B y C se hibridan y soportan la síntesis de una región V contigua que es un híbrido de la región V de referencia FR1-CDR1, el repertorio humano FR2-CDR2-FR3 y la región V de referencia CDR3-FR4 (Figura 2b). La biblioteca de región V híbrida se clona en un vector de expresión usando los sitios de restricción en los Cebadores A y D y típicamente se aíslan 10.000 clones para análisis adicional.

Como un ejemplo específico, un repertorio de casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 se construyó en la V_L del anticuerpo anti-citoquina murino 19. El Cebador A es complementario a la región N-terminal de la V_L murina y tiene un sitio *Bss*HII unido al extremo 5' para clonación en un vector de expresión. El Cebador B es complementario a los 18 nt finales de la CDR1 de V_L del anticuerpo murino 19. El Cebador C se hibrida a la región N-terminal del repertorio humano FR2 de V_{kl} ; en su extremo 5' existe una región de 18 nt unida de complementariedad al Cebador B. El Cebador D se hibrida al extremo C de la región V murina 19 y tiene un sitio *Spe*I unido que se usa para clonación en un vector de expresión.

En la primera PCR, los Cebadores A y B se usan para amplificar la región FR1-CDR1 murina. En la segunda PCR, los Cebadores C y D se usan para amplificar el repertorio FR2-CDR2-FR3 humano a partir de una biblioteca de región V humana, conteniendo cada miembro de la biblioteca la CDR3 de V_L del anticuerpo murino 19 y la FR4 murina o de línea germinal humana. En la tercera PCR, cantidades molares iguales de las primeras dos reacciones de PCR se amplifican con Cebadores A y D para completar la construcción del repertorio de región V de casete de intercambio FR2-CDR2-FR3. Una cadena pesada V_{H1-02} de línea germinal humana que contiene la región CDR3-FR4 murina 19 se usó para la cadena complementaria.

Aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes se ensayaron en un ensayo de unión de transferencia de colonia (CLBA) usando la proteína citoquina humana como el antígeno diana. Cuatro anticuerpos recombinantes, FB25-6-1, FB25-D3, FB25-E1 y FB26-E9 que se unieron al antígeno diana se recuperaron y purificaron. Dos de los clones fueron la secuencia de FR2-CDR2-FR3 V_{kl} humana unida a las secuencias FR1-CDR1 y CDR3-FR4 murinas. Los otros dos clones fueron secuencia de FR2-CDR2-FR3 V_{kIII} humana unida a las secuencias FR1-CDR1 y CDR3-FR4 murinas. Los casetes de intercambio FR2-CDR2-FR3 V_{kIII} se incluyeron probablemente en la biblioteca debido a que el Cebador C presenta hibridación cruzada frente a secuencias de segmento V de V_{kIII} humana. Los clones FB25 y FB26 demostraron unirse a antígeno de citoquina humana en un ensayo de ELISA.

Ejemplo 3. Biblioteca FR3-CDR3-FR4

La biblioteca de FR3-CDR3-FR4 puede ser de V_H o V_L y se construye de la siguiente manera. El ADNc de primera cadena se prepara usando procedimientos convencionales a partir de ARNm obtenido de células que expresan un repertorio inmune, por ejemplo, células B de sangre periférica o bazo. Una biblioteca de ADNc de segmento V que contiene la región a partir de FR1 a FR3 se prepara a partir del ADNc de primera cadena mediante PCR. El ADNc se amplifica a través de PCR usando un cebador o cebadores directos en la región N-terminal de FR1 y un cebador o cebadores inversos de la región C-terminal de FR3. Los cebadores de PCR se diseñan para ser complementarios a repertorios de segmento V humanos, aprovechándose de la conservación de secuencia de nucleótidos y aminoácidos observada en las familias de segmento V. Los cebadores de repertorio pueden estar degenerados en una o más posiciones para dar cuenta de la heterogeneidad de secuencia. El cebador o conjunto de cebador se puede diseñar para amplificar una o más familias del segmento V.

En primer lugar se construye una biblioteca de región V que contiene la CDR de referencia y una FR4. La región CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia se une al repertorio de segmento V mediante uno de varios métodos que incluyen el ligamiento a través de un sitio de restricción compatible o PCR de extensión por solapamiento. La región FR4 puede ser la misma que el anticuerpo de referencia o la misma se puede convertir en secuencia de línea germinal humana en aquellos restos en los que difieren las regiones de referencia y J de línea germinal humana.

El repertorio FR3-CDR3-FR4 se construye con tres reacciones de PCR de la forma siguiente. En la primera PCR (Figura 3a), el Cebador A y el Cebador B se usan para amplificar la región FR1-CDR1-FR2-CDR2 del anticuerpo de referencia. Típicamente, el Cebador A tiene un sitio de restricción unido para clonación en un vector de expresión. En la segunda PCR, el repertorio FR3-CDR3-FR4 se puede obtener a partir de la biblioteca de región V construida mediante una primera PCR usando un Cebador C directo para el extremo N-terminal de FR3 y un Cebador D inverso para el extremo C-terminal de FR4. Típicamente, los cebadores de PCR tienen 15-20 nt de longitud y el Cebador C directo tiene una región de 12-15 nt de la CDR2 de referencia en su extremo 5' usada para PCR de extensión por solapamiento. El Cebador C puede contener uno o más miembros y puede estar degenerado en una o más posiciones para reflejar la heterogeneidad de secuencia en la línea germinal humana en estas posiciones. Típicamente, el Cebador D tiene un sitio de restricción unido para clonación en un vector de expresión. Las reacciones de PCR usan condiciones convencionales (por ejemplo, 94° C durante 10 s, 50° C durante 1 min y 72° C durante 30 s, repetidos durante 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes se purifican en gel lejos de los Cebadores de amplificación A, B, C y D y se cuantifica el rendimiento de producto. En la tercera PCR, cantidades molares iguales de las primeras dos reacciones de PCR se amplifican con Cebador A y D para completar la construcción del repertorio FR3-CDR3-FR4 humano. El repertorio de Ig humano FR3-CDR3-FR4 es diverso en FR3 y común en la región CDR3-FR4. La biblioteca FR3-CDR3-FR4 se clona en un vector de expresión y se co-expresa con la cadena V_H o V_L complementaria. La cadena V_H o V_L se puede obtener a partir del anticuerpo de referencia o puede ser una cadena humana modificada por ingeniería genética.

Una biblioteca FR3-CDR3-FR4 se preparó para las cadenas tanto V_H como V_L de un clon de anticuerpo de referencia murino 10 que se une a una proteína de citoquina humana. Aproximadamente 10.000 anticuerpos

recombinantes resultantes para las cadenas tanto V_H como V_L se ensayaron en un ensayo de unión de transferencia de colonia (CLBA) usando una proteína de citoquina humana como el antígeno diana. Dos anticuerpos recombinantes de la biblioteca FR3-CDR3-FR4 de V_H , B-17-11-H1 y B-17-15-H5” que se unieron al antígeno diana se recuperaron y purificaron. Dos anticuerpos recombinantes de la biblioteca FR3-CDR3-FR4 de V_L , B-18-17-H7 y B-18-20-H10, que se unieron al antígeno diana se recuperaron y purificaron. Todos los clones de V_H o V_L tenían una secuencia de FR3 similar a y en algunos casos idéntica a la secuencia de FR3 de línea germinal humana. Los clones de anticuerpo B para las cadenas tanto V_H como V_L demostraron unirse al antígeno de citoquina humana en un ensayo de ELISA.

10 Ejemplo 4. Reemplazo de CDR3-FR4

La región CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia se puede reemplazar por un casete de intercambio CDR3-FR4 seleccionado entre un repertorio humano. Una biblioteca de CDR3-FR4 se puede fusionar a uno o a una combinación de segmentos V obtenidos a partir de regiones V que se conoce que se unen al antígeno de referencia. En la primera PCR, los Cebadores A y B (Figura 4a) se usan para amplificar un segmento V a partir del anticuerpo de referencia o a partir de un segmento V humano modificado por ingeniería genética que se conoce que se une al antígeno diana. En la Figura 4a, el Cebador A se hibrida al extremo N de la región V y típicamente tiene un sitio de restricción unido al extremo 5' para clonación en un vector de expresión. El Cebador B se hibrida al extremo C-terminal de FR3 y tiene un sitio de restricción unido al mismo para unión del producto de PCR al repertorio de casete de intercambio CDR3-FR4. En la segunda PCR, los Cebadores C y D (Figura 4b) se usan para amplificar el casete de intercambio CDR3-FR4 a partir de un ARNm de repertorio de Ig humano obtenido a partir de linfocitos de sangre periférica y/o linfocitos de bazo. El Cebador C se hibrida a FR3 o a FR3 y una parte de CDR3. El Cebador C también contiene un sitio de restricción que se puede usar para fusionar la biblioteca de casete de intercambio CDR3-FR4 al segmento o segmentos V. El Cebador D contiene una o más secuencias que se hibridan a los extremos C-terminales de regiones V humanas; el Cebador D puede contener una mezcla de nucleótidos degenerados en una o más posiciones que refleja la diversidad de secuencia en el repertorio de región J humano. Adicionalmente, el Cebador D contiene un sitio de restricción que se puede usar para inserción de las regiones V resultantes en un vector de expresión.

A modo de ejemplo específico, la región CDR3-FR4 de V_L murina de un anticuerpo anti-citoquina humano modificado por ingeniería genética 19 se reemplazó con un casete de intercambio CDR3-FR4 humano. El Cebador A se une a las regiones N-terminales de FB39-3, FB38-4, FB44-15 y FB44-16, un grupo de cadenas V_L humanas modificadas por ingeniería genética cada una de las cuales se une a citoquina humana cuando se empareja con una V_H complementaria. El Cebador A contiene el sitio de restricción *Bss*HII usado para clonación en un vector de expresión. El Cebador B se hibrida a los extremos C-terminales de FR3 para cada V_L del grupo de FB39-3, FB38-4, FB44-15 y FB44-16. El Cebador B contiene el sitio de restricción *Bst*11071 para facilitar el ligamiento de los segmentos V a la biblioteca de casete de intercambio CDR3-FR4. El Cebador C se hibrida a FR3 humana de la familia V_L de V κ III. El Cebador D contiene tres cebadores que se hibridan a las secuencias FR4 para las regiones J humanas Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5. El Cebador D contiene un sitio *Spe*I usado para clonar las regiones V en un vector de expresión.

En la primera PCR, los cebadores A y B se usan para amplificar los segmentos V a partir de un grupo de cuatro cadenas V_L humanas modificadas por ingeniería genética que contienen la CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia murino 19. Las cadenas V_L se conoce que se unen a antígeno de citoquina humana cuando se emparejan con una cadena pesada V_H 1-02 de línea germinal humana complementaria con la CDR3 de V_H de referencia y una FR4 humana modificada por ingeniería genética unida. En la segunda PCR, los cebadores C y D se unen para amplificar un repertorio de casete de intercambio CDR3-FR4 a partir de un ADNc de primera cadena de bazo humano. Los productos de PCR de la primera y segunda reacciones se digieren con *Bst* 11071, se purifican en gel y se ligan entre sí usando procedimientos convencionales. Los productos de ligamiento resultantes se digieren con *Bss*HII y *Spe*I y se insertan en un vector de expresión. Un segmento V que contiene una cadena pesada V_H 1-02 de línea germinal humana, la CD3 murina 19 y una FR4 de línea germinal humana se usaron para la cadena complementaria.

Aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes se ensayaron en un ensayo de unión de transferencia de colonia (CLBA) usando la proteína de citoquina humana como el antígeno diana. Un anticuerpo recombinante, FB67-2, que se une el antígeno diana se recuperó y purificó. El casete de intercambio CDR3-FR4 era una secuencia de aminoácidos diferente de la CDR3-FR4 de referencia y parecía obtenerse a partir de la subclase V κ III de V_L humana. El clon FB67-2 demostró unirse a antígeno de citoquina humana en un ensayo de ELISA.

60 Ejemplo 4. Casete CDR2-FR3

Los ejemplos anteriores describen casetes de intercambio que contienen regiones CDR completas y al menos una región flanqueante adyacente. Como alternativa, un casete de CDR puede estar comprendido por una subsecuencia de la CDR que se obtiene a partir del anticuerpo de referencia junto con una biblioteca de repertorio que contiene el resto de la región CDR.

A modo de un ejemplo específico, se preparó una biblioteca de casete para la región CD2-FR3 de V_H de un anticuerpo de referencia murino, clon 10, que se une a citoquina humana. La CDR2 de V_H del clon 10 tiene 17 aminoácidos de longitud y su secuencia de aminoácidos es la más similar a la subclase V_H3 humana. La MEBSD se definió empíricamente usando mutagénesis puntual. Todas las alteraciones en las posiciones 1-6 de la CDR2 de referencia dieron como resultado una pérdida completa de la actividad de unión mientras que las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 7-17 no abolieron la unión a antígeno.

Las regiones V que contienen la biblioteca de casete CDR se construyen con cinco reacciones de PCR como se muestra en la Figura 5. Las reacciones de PCR usan condiciones convencionales (por ejemplo, 94° C durante 10 s, 50° C durante 1 min y 72° C durante 30 s, repetidos durante 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes se purifican en gel lejos de los cebadores de amplificación y se cuantifica el rendimiento del producto. La primera reacción de PCR se realiza con los cebadores A y B. El cebador A contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la MEBSD junto con 13 nucleótidos cadena abajo que se hibridan a la mayoría de las secuencias CDR2 de línea germinal de la familia V_H3 humana. El cebador B se hibrida al extremo C terminal de FR3 y se diseña para capturar las secuencias de línea germinal humanas del repertorio V_H3 . Los cebadores A y B se usan para amplificar el repertorio de Ig humana a partir de ADNc de primera cadena de bazo dando como resultado una biblioteca de casete de intercambio de CDR2-FR3. En la segunda reacción de PCR los cebadores C y D se usan para amplificar la FR1-CDR1-FR2 humana a partir de una cadena V_H que se conoce que se une al antígeno diana cuando se empareja con una V_L complementaria. El cebador C contiene un sitio de restricción usado para clonar la región V final en un vector de expresión. El cebador D contiene una región de complementariedad al cebador A para facilitar la PCR de extensión por solapamiento. En la tercera PCR, los cebadores E y F se diseñan para amplificar la región CDR3-FR4 de la V_H de referencia o de una V_H humana modificada por ingeniería genética que se conoce que soporta la unión a antígeno cuando se empareja con la V_L complementaria. El cebador E tiene una región de complementariedad al cebador B con el fin de facilitar la PCR de extensión por solapamiento. El cebador F contiene un sitio de restricción usado para clonar la región V en un vector de expresión.

En la cuarta PCR, cantidades molares iguales de la primera y segunda reacciones de PCR se incluyen en una reacción de PCR junto con los cebadores C y B. Los fragmentos resultantes se purifican en gel lejos de los cebadores B y C de amplificación y se cuantifica el rendimiento de producto. En la reacción de PCR final, cantidades molares iguales de las cuarta y tercera reacciones de PCR se combinan y amplifican con cebadores C y F para construir la región V final. Los productos de PCR se purifican y digieren con enzimas de restricción que escinden los sitios incluidos en los cebadores C y F. La biblioteca de casete CDR2-FR3 se inserta en un vector de expresión junto con una cadena V_L complementaria. Típicamente, una biblioteca de 10.000 miembros se explora para determinar unión a antígeno mediante CLBA.

La biblioteca de casete CDR2-FR3 se exploró mediante CLBA usando el antígeno de citoquina humana como una diana. Se purificaron varios anticuerpos, incluyendo B180-27-4B, B180-32-6F, B180-33-7B y B180-34-7F, que mostraron unión a la proteína de citoquina humana cuando se ensayaron en un ensayo de ELISA.

Ejemplo 4. Construcción y exploración de casete de intercambio repetitivo

Los ejemplos anteriores describen la construcción de bibliotecas de casete de intercambio que son un híbrido de biblioteca de repertorio de Ig humana y una secuencia común a partir del anticuerpo de referencia. También se pueden construir bibliotecas de casete de intercambio donde la secuencia común no es del anticuerpo de referencia, sino que en lugar de ello, es de un casete de intercambio humano seleccionado o de una región V humana modificada por ingeniería genética seleccionada. Una estrategia de casete de intercambio repetitivo de este tipo se puede usar para la V_H o la V_L . La biblioteca de casete de intercambio repetitivo se clona en un vector de expresión y se co-expresa con la cadena V_H o V_L complementaria. La cadena V_H o V_L complementaria se puede obtener a partir del anticuerpo de referencia o a partir de una región V humana modificada por ingeniería genética.

A modo de ejemplo específico, una biblioteca de repertorio de Ig humana de FR2-CDR2-FR3 se unió con un casete de intercambio FR1-CDR1-FR2 seleccionado; la región de unión fue una secuencia común dentro de FR2. La construcción se llevó a cabo con tres reacciones de PCR como se muestra en la Figura 6. El anticuerpo de referencia 19 se une a un antígeno de citoquina humana. Una región V_H se seleccionó a partir de un Fab (FB 42-8) que mostró unión a un antígeno de citoquina humana. La región V_H comprendía un segmento V humano unido a la CDR3 de referencia y una FR4 de línea germinal humana. En la primera PCR (Figura 6a), el cebador A y el cebador B se usaron para amplificar el casete FR1-CDR1-FR2 a partir de FB 42-8; el cebador B se hibridó al extremo C terminal de FR2. El cebador A contiene un sitio de restricción usado para clonación en un plásmido de expresión. En la segunda reacción de PCR (Figura 6b), el cebador C y el cebador D se usaron para amplificar la región FR2-CDR2-FR3 a partir de una biblioteca de región V_H que contiene la CDR3 de referencia y una FR4 de línea germinal humana. El cebador C se hibrida al extremo C terminal de FR2 y es la secuencia complementaria del cebador B. Típicamente, el cebador D tiene un sitio de restricción unido para clonación en un vector de expresión. Las reacciones de PCR usan condiciones convencionales (por ejemplo, 94° C durante 10 s, 50° C durante 1 min y 72° C durante 30 s, repetido durante 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes se purifican en gel lejos de los cebadores de amplificación A, B, C y D y se cuantifica el rendimiento de producto. En la tercera PCR, cantidades molares iguales de las primeras dos reacciones de PCR se amplifican con los cebadores A y D para completar la

construcción de la región V que contiene el repertorio de casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 humano. La biblioteca de casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 se clonó en un vector de expresión y se co-expresó con cuatro cadenas V_L humanas modificadas por ingeniería genética complementarias.

- 5 Aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes para la biblioteca de casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 se ensayaron en un ensayo de unión de transferencia de colonia (CLBA) usando una proteína citoquina humana como el antígeno diana. Se seleccionaron tres Fab (FB48-12, FB48 y FB48-18-20) que mostraron unión al antígeno de citoquina humana en un ensayo de ELISA.

10 Ejemplo 5. Reconstrucción de casete

Los casetes de intercambio descritos en los ejemplos anteriores eran híbridos de secuencia humana y de referencia. Los casetes de intercambio humano seleccionados se pueden recombinar con el fin de crear regiones V humanas completas o parciales. Típicamente, uno o varios casetes de intercambio humanos seleccionados a partir de Fab que se unen a antígeno diana se fusionan con PCR de extensión por solapamiento o ligamiento para crear regiones V que se ensayan para determinar unión a antígeno. Una estrategia de reconstrucción de casete de intercambio de este tipo se puede usar para la V_H o la V_L . Los casetes de intercambio pueden originarse a partir de subclases de región V iguales o diferentes de forma que la región V reconstruida final es similar a una línea germinal humana o única o es un híbrido similar a dos o más líneas germinales humanas. El casete de intercambio o biblioteca de casete de intercambio reconstruido se clona en un vector de expresión y se co-expresa con la cadena V_H o V_L complementaria. La cadena V_H o V_L complementaria se puede obtener a partir del anticuerpo de referencia o a partir de una región V humana modificada por ingeniería genética.

A modo de ejemplo específico, se pueden usar tres reacciones de PCR para recombinar casetes de intercambio (Figura 7). Se identificaron varios casetes de intercambio humano CDR1 FR1-FR2 de V_L para el anticuerpo de referencia 19 que se unen a antígeno de citoquina humana. En la primera PCR (Figura 7a), el cebador A y el cebador B se usaron para amplificar la región de casete de intercambio FR1-CDR1-FR2 a partir del ADN de región V. Típicamente, el cebador A tiene un sitio de restricción unido para clonación en un vector de expresión. El cebador A puede ser uno o una combinación de cebadores que se hibridan a las regiones N terminal de FR1 de cada uno de los casetes de intercambio que se tienen que amplificar. El cebador B puede ser uno o una combinación de cebadores que se hibridan con FR2 de cada casete de intercambio que se tiene que amplificar. Se identificaron varios casetes de intercambio humanos CDR3-FR2-FR3 de V_L que se unieron a antígeno de citoquina humana. En la segunda PCR (Figura 7b), el cebador C y el cebador D se usaron para amplificar la región FR2-CDR2-FR3 a partir del ADN de la región V, junto con la CD3 de referencia y una FR4. Típicamente, el cebador D tiene un sitio de restricción unido para clonación en un vector de expresión. El cebador C puede ser uno o una combinación de cebadores que se hibridan dentro de FR2 de cada casete de intercambio que se tiene que amplificar. Típicamente, el cebador B y el cebador C son secuencias complementarias para facilitar la tercera PCR de extensión por solapamiento. Las reacciones de PCR usan condiciones convencionales (por ejemplo, 94° C durante 10 s, 50° C durante 1 min y 72° C durante 30 s, repetidas durante 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes se purifican en gel lejos de los cebadores de amplificación A, B, C y D y se cuantifica el rendimiento del producto. En la tercera PCR, cantidades molares iguales de las primeras dos reacciones de PCR se amplificaron con cebadores A y D para completar la construcción del repertorio de región de V_L humana. El repertorio de V_L se clonó en un vector de expresión y se co-expresó con una cadena V_H complementaria.

45 Aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes para la biblioteca de repertorio de región V se ensayaron en ensayos de unión de transferencia de colonia (CLBA) y ELISA usando una proteína de citoquina humana como el antígeno diana. Se seleccionaron tres Fab (FB30-G4, FB31-13-1 y FB40-1-1H) que mostraron unión al antígeno de citoquina humana en un ensayo de ELISA.

50 Los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 y CDR2-FR2-FR3 a partir de FB30-G4 son ambos los más similares a la subclase Vkl humana. Los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 y CDR2-FR2-FR3 a partir de FB31-13-1 son ambos los más similares a la subclase VklII humana. Los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 y CDR2-FR2-FR3 a partir de FB40-1-1H son los más similares a las subclases VklII humana y Vkl humana, respectivamente.

55 Se usó análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore) para determinar las afinidades de unión de los Fab humanos modificados por ingeniería genética obtenidos mediante reconstrucción de casete. Para este fin, los fragmentos de Fab se purificaron a partir de medio de cultivo de clones de *E. coli* que expresan Fab usando cromatografía de afinidad de proteína G. A partir de la cinética de unión determinada a partir del análisis de resonancia de plasmón superficial, se identificó un Fab de casete reconstruido con la especificidad de unión de anticuerpo 19 y una afinidad de 20 pM, lo cual es similar a la afinidad del anticuerpo de referencia anticuerpo 19 (10 pM).

65 Se identificaron Fab reconstruidos con la especificidad del anticuerpo 10 con afinidades de 0,4 nM (en comparación con una afinidad de 1,5 nM para el clon 10), demostrando que el intercambio de casete se puede usar para identificar Fab con una afinidad más elevada que el anticuerpo de referencia correspondiente

Los ejemplos anteriores se proporcionan a modo de ilustración únicamente y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que se podrían cambiar o modificar para producir básicamente resultados similares.

REIVINDICACIONES

1. Un método de modificación por ingeniería genética de un anticuerpo que conserva la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia por un antígeno diana, comprendiendo el método:

- 5 (a) obtener una región variable a partir del anticuerpo de referencia;
 (b) reemplazar al menos un casete de intercambio, seleccionado entre el grupo que consiste en FR1-CDR1, FR1-FR2-CDR1, FR2-CDR2-FR3 y CDR2-FR3 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de casetes de intercambio correspondientes a partir de segmentos V humanos, generando de ese modo una biblioteca de regiones V híbridas que comprenden miembros en los cuales el al menos un casete de intercambio de la región variable del anticuerpo de referencia se reemplaza con casetes de intercambio correspondientes humanos codificados por diferentes genes, donde la CDR del al menos un casete de intercambio de la región variable del anticuerpo de referencia es una CDR intacta o una CDR parcial que es una subregión de la CDR que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR intacta y cada región flanqueante (FR) del al menos un casete de intercambio de la región variable del anticuerpo de referencia es una FR intacta o una FR parcial que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la FR intacta;
 (c) emparejar la biblioteca de regiones V híbridas de (b) con una región V complementaria; y
 (d) seleccionar un anticuerpo que comprende una región V híbrida que tiene al menos un casete intercambiado generado en la etapa (b) que tiene una afinidad de unión por el antígeno diana.

2. El método de la reivindicación 1, comprendiendo además:

- 25 (e) reemplazar un segundo casete de intercambio, que comprende al menos una CDR o una CDR parcial que es una subregión de la CDR que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR intacta, unida a al menos una región flanqueante (FR) o una FR parcial que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la FR intacta que están juntas de forma natural, de la región V del anticuerpo de referencia con una biblioteca de casetes de intercambio correspondientes a partir de segmentos de genes V humanos para crear una segunda biblioteca híbrida de regiones V híbridas;
 30 (f) emparejar la segunda biblioteca de regiones V híbridas con una región V complementaria;
 (g) seleccionar un anticuerpo que comprende una segunda región V híbrida, anticuerpo que tiene una afinidad de unión por el antígeno diana; y
 (h) combinar el casete de intercambio humano del anticuerpo modificado por ingeniería genética de (d) con el segundo casete de intercambio humano del anticuerpo de (g), para obtener un anticuerpo con la especificidad de unión del anticuerpo de referencia, donde el anticuerpo tiene una región V híbrida que comprende al menos dos casetes de intercambio humanos.

3. El método de la reivindicación 2, comprendiendo además una etapa de reemplazo de la CDR3-FR4 de la región V híbrida con una biblioteca de regiones CDR3-FR4, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que conserve la especificidad de unión por el antígeno diana.

4. El método de la reivindicación 2, comprendiendo además una etapa de reemplazo de la FR4 de la región V híbrida con una biblioteca de secuencias FR4.

45 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde al menos una de las CDR del casete de intercambio de (b) o (e) es una secuencia de CDR parcial que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR intacta o donde al menos una de las FR del casete de intercambio de (b) o (e) es una secuencia de FR parcial que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la FR intacta.

50 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la región V complementaria de (c) o (f) tiene un segmento V de origen natural o tiene un segmento V de línea germinal o es una región V híbrida o es una región V híbrida que es un miembro de una biblioteca que comprende diferentes regiones V híbridas.

7. Un método de modificación por ingeniería genética de un anticuerpo que conserva la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia por un antígeno diana, comprendiendo el método:

- 55 (a) obtener una región variable de un anticuerpo de referencia que tiene una especificidad de unión deseada;
 (b) reemplazar la FR1-CDR1- FR2 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR1-CDR1-FR2 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejar las regiones variables híbridas con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tenga una afinidad detectable por el antígeno diana;
 60 (c) reemplazar la FR2-CDR2-FR3 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR2-CDR2-FR3 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejar las regiones variables híbridas con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tenga una afinidad detectable por el antígeno diana; y
 65 (d) combinar la FR1-CDR1-FR2 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (b) con la FR2-

CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (c) para obtener un anticuerpo con un segmento V de región variable humano, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia.

- 5 8. El método de la reivindicación 7, donde (b) y (c) se llevan a cabo de forma secuencial.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, donde la región variable complementaria de (b) o (c) comprende un segmento V de origen natural o es una región V híbrida o tiene un segmento V de línea germinal o es un miembro de una biblioteca de regiones V híbridas.
- 10 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la región variable del anticuerpo de referencia es una región variable de cadena pesada.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la región variable del anticuerpo de referencia es una región variable de cadena ligera.
12. El método de la reivindicación 7 u 8, donde la combinación de la FR1-CDR1-FR2 con la FR2-CDR2-FR3 comprende combinar las regiones FR2 en una región de homología.
- 20 13. El método de la reivindicación 7 u 8, donde la combinación de la FR1-CDR1-FR2 con la FR2-CDR2-FR3 comprende reemplazar la FR2 de FR1-CDR1-FR2 con la FR2 de FR2-CDR2-FR3 o reemplazar la FR2 de FR2-CDR2-FR3 con la FR2 de FR1-CDR1-FR2.
- 25 14. El método de la reivindicación 7 u 8, comprendiendo además una etapa de reemplazo de la CDR3-FR4 de la región variable híbrida con una biblioteca de regiones CDR3-FR4 humanas, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que se une al antígeno diana.
- 30 15. El método de la reivindicación 14, donde las regiones CDR3 de la biblioteca de regiones CDR3-FR4 humanas son regiones CDR3 parciales que son al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR3 intacta.
16. El método de la reivindicación 7 u 8, comprendiendo además:
- 35 (e) reemplazar la FR3-CDR3-FR4 de la región variable que comprende el segmento V humano de (d) con una biblioteca de regiones FR3-CDR3-FR4, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tiene una afinidad detectable por el antígeno diana; y
- (f) combinar la FR3-CDR3-FR4 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (e) con la FR2-CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (d) para obtener un anticuerpo con un segmento V de región variable humano, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia.
- 40 17. El método de la reivindicación 7 u 8, donde las regiones FR1-CDR1-FR2 humanas y/o las regiones FR2-CDR2-FR3 humanas son de línea germinal.
- 45 18. Un método para modificar por ingeniería genética un anticuerpo que conserva la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia por un antígeno diana, comprendiendo el método:
- (a) obtener una región variable de un anticuerpo de referencia que tiene una especificidad de unión deseada;
- 50 (b) reemplazar la FR1-CDR1-FR2 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR1-CDR1-FR2 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejar las regiones variables híbridas con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tenga una afinidad detectable por el antígeno diana;
- (c) reemplazar la CDR2-FR3 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones CDR2-FR3 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, donde la CDR2 de la CDR2-FR3 del anticuerpo de referencia es una CDR2 parcial que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR2 intacta y la biblioteca de secuencias CDR2-FR3 humanas comprende secuencias CDR2-FR3 parciales correspondientes, emparejar las regiones variables híbridas con una región complementaria y seleccionar un anticuerpo que tenga una afinidad detectable por el antígeno diana; y
- 55 (d) combinar la FR1-CDR1-FR2 de la región variable del anticuerpo seleccionado en (b) con la CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (c) para obtener un anticuerpo con un segmento V de región variable humano, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia.
- 60 19. El método de la reivindicación 18, comprendiendo además una etapa de reemplazo de la CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones CDR3-FR4 humanas, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que se une al antígeno diana.
- 65

20. El método de la reivindicación 19, donde las regiones CDR3 de la biblioteca de regiones CDR3-FR4 humanas son regiones CDR3 parciales que son al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR3 intacta.
- 5 21. El método de la reivindicación 18, comprendiendo además:
- (e) reemplazar la FR4 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR4, emparejar la región variable con una región variable complementaria y seleccionar un anticuerpo que tiene una afinidad detectable por el antígeno diana.
- 10 22. El método de la reivindicación 18, donde las regiones FR1-CDR1-FR2 humanas y/o las regiones CDR2-FR3 humanas son de línea germinal.
- 15 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un fragmento Fv, un Fab, un Fab', un F(ab')₂ o un scFv.
24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los anticuerpos se expresan y secretan en forma soluble a partir de una célula hospedadora y se unen a un antígeno.
- 20 25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, donde los anticuerpos se presentan en la superficie de una célula, una espora o un virus.
- 25 26. Una biblioteca de regiones V híbridas que comprende miembros que tienen una diversidad de regiones V, donde un miembro tiene al menos una subsecuencia determinante de especificidad de unión esencial mínima (MEBSD) de una CDR a partir de un anticuerpo de referencia y al menos un casete de intercambio a partir de un repertorio de anticuerpo, casete de intercambio que se selecciona entre el grupo que consiste en FR1-CDR1, FR1-FR2-CDR1, FR2-CDR2-FR3 y CDR2-FR3 donde la CDR del casete de intercambio es una CDR intacta o una CDR parcial que es una subregión de la CDR que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la CDR intacta y en cada región flanqueante (FR) existe una FR intacta o una FR parcial que es una subregión de la FR que es al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la FR intacta.
- 30 27. La biblioteca de la reivindicación 26, donde el miembro de la biblioteca tiene al menos dos casetes de intercambio de un repertorio humano.
- 35 28. La biblioteca de la reivindicación 26, donde el casete de intercambio es una secuencia de línea germinal humana.
29. La biblioteca de la reivindicación 26, donde la MEBSD es de la CDR3 del anticuerpo de referencia.
- 40 30. La biblioteca de la reivindicación 29, donde el miembro de la biblioteca tiene una CDR3 del anticuerpo de referencia.
31. La biblioteca de la reivindicación 30, donde el miembro tiene una CDR3 del anticuerpo de referencia y una FR4 humana.
- 45 32. La biblioteca de la reivindicación 30, donde el miembro tiene una CDR3 en la que el segmento D es del anticuerpo de referencia.

Figura 1

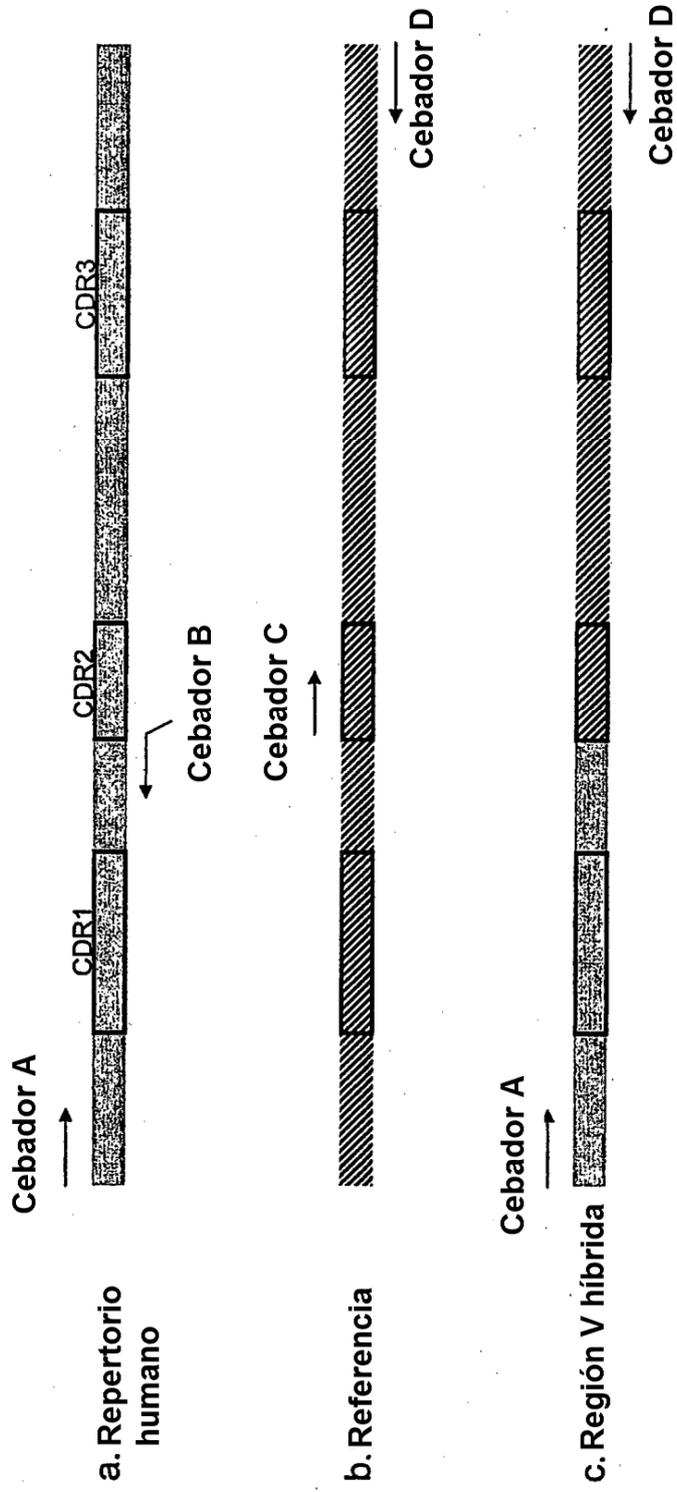


Figura 2

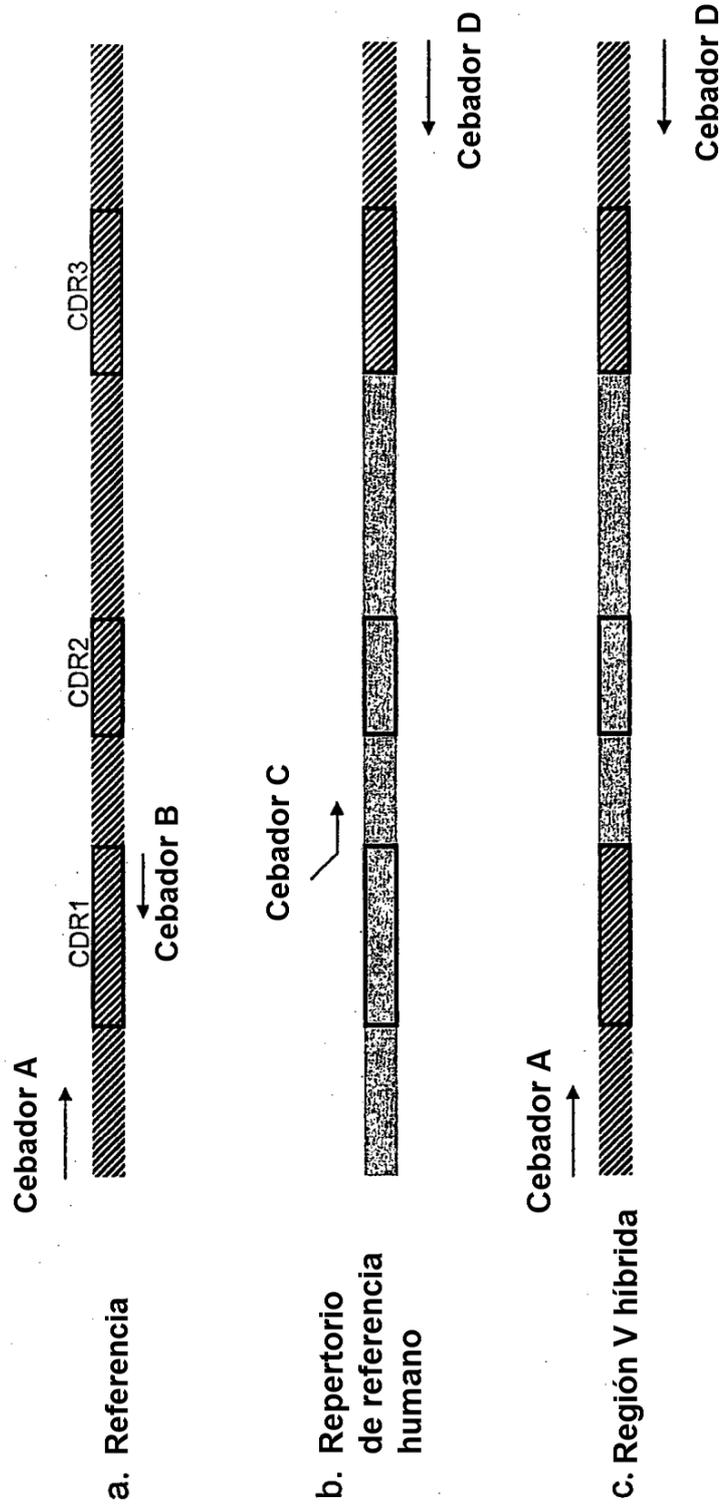


Figura 3

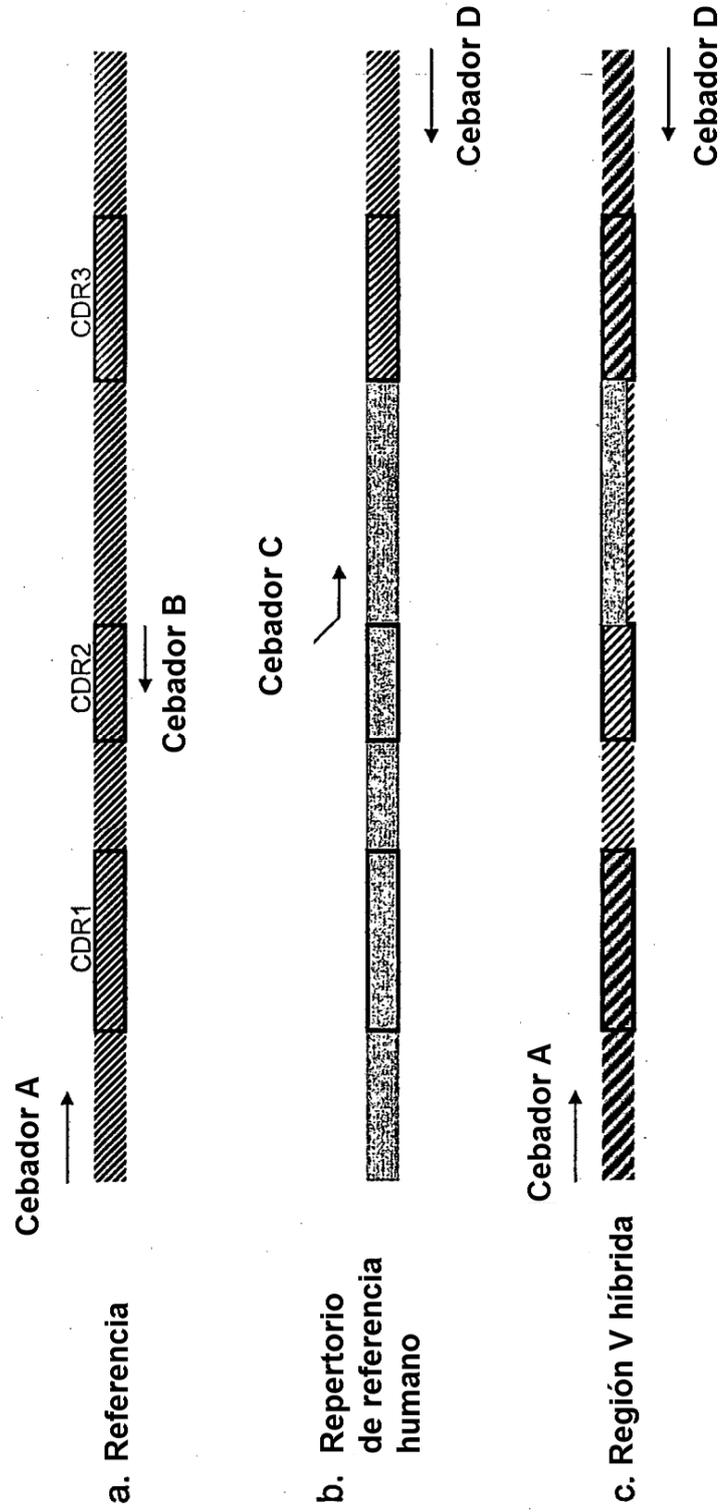


Figura 4

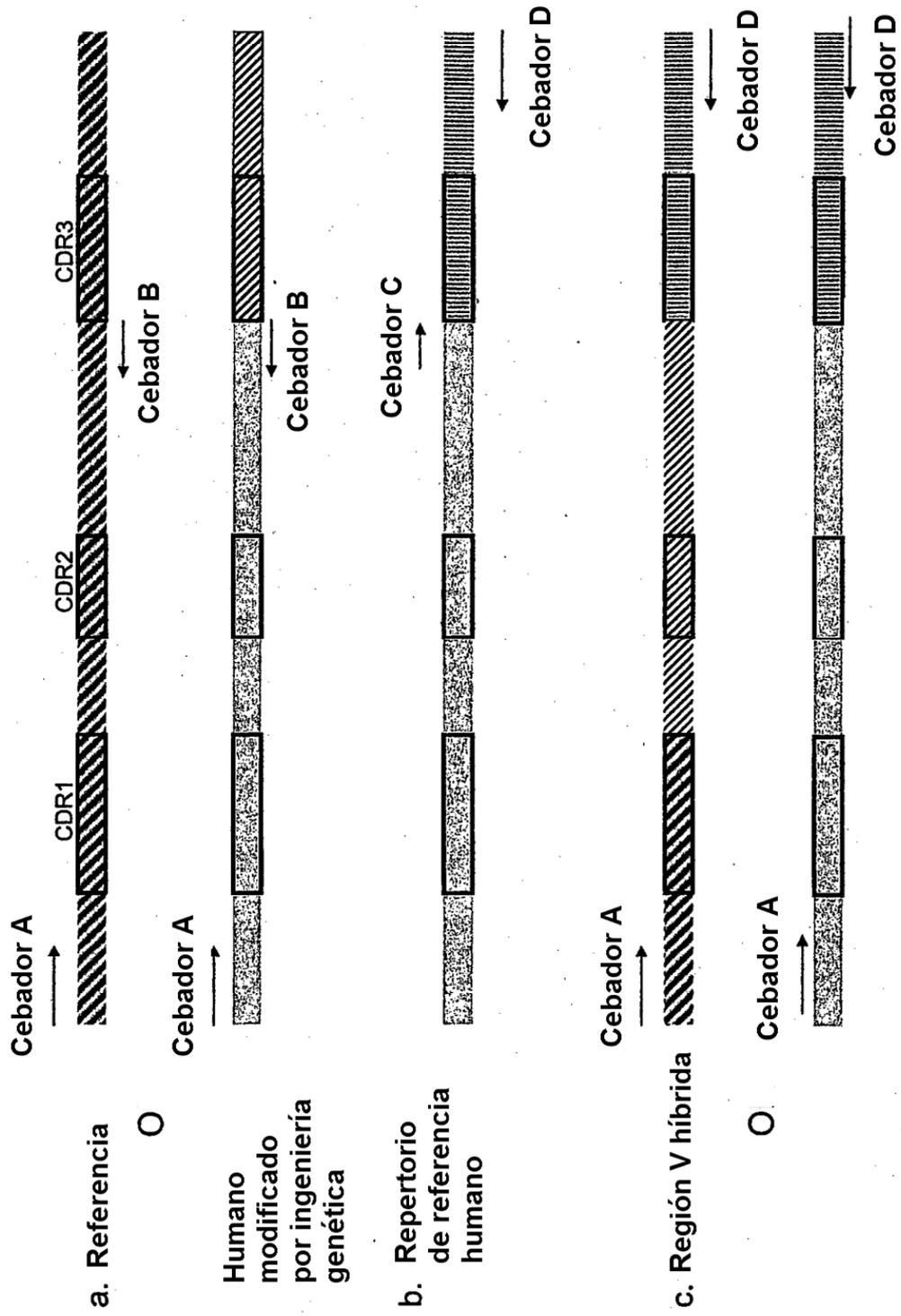


Figura 5

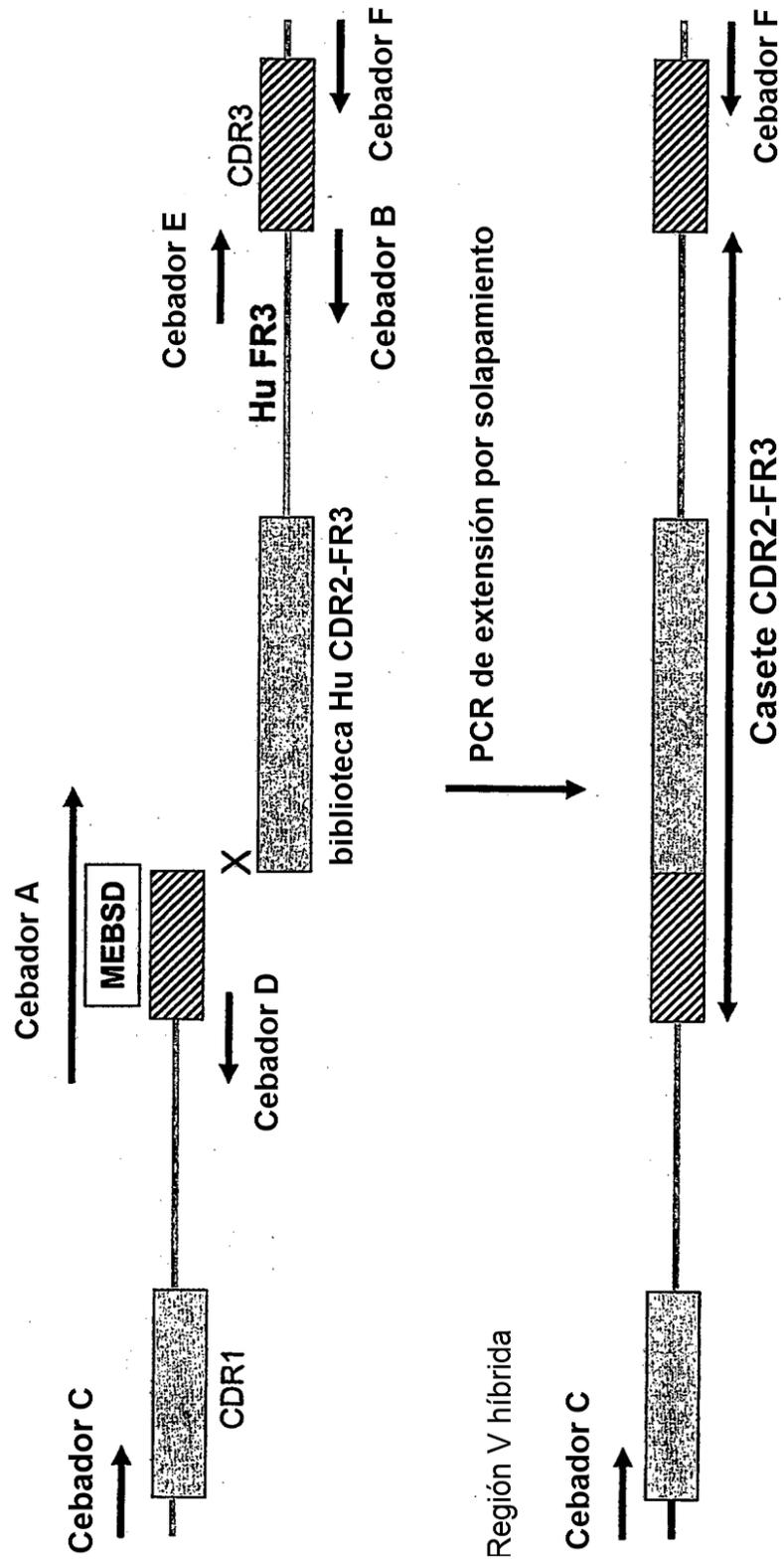


Figura 6

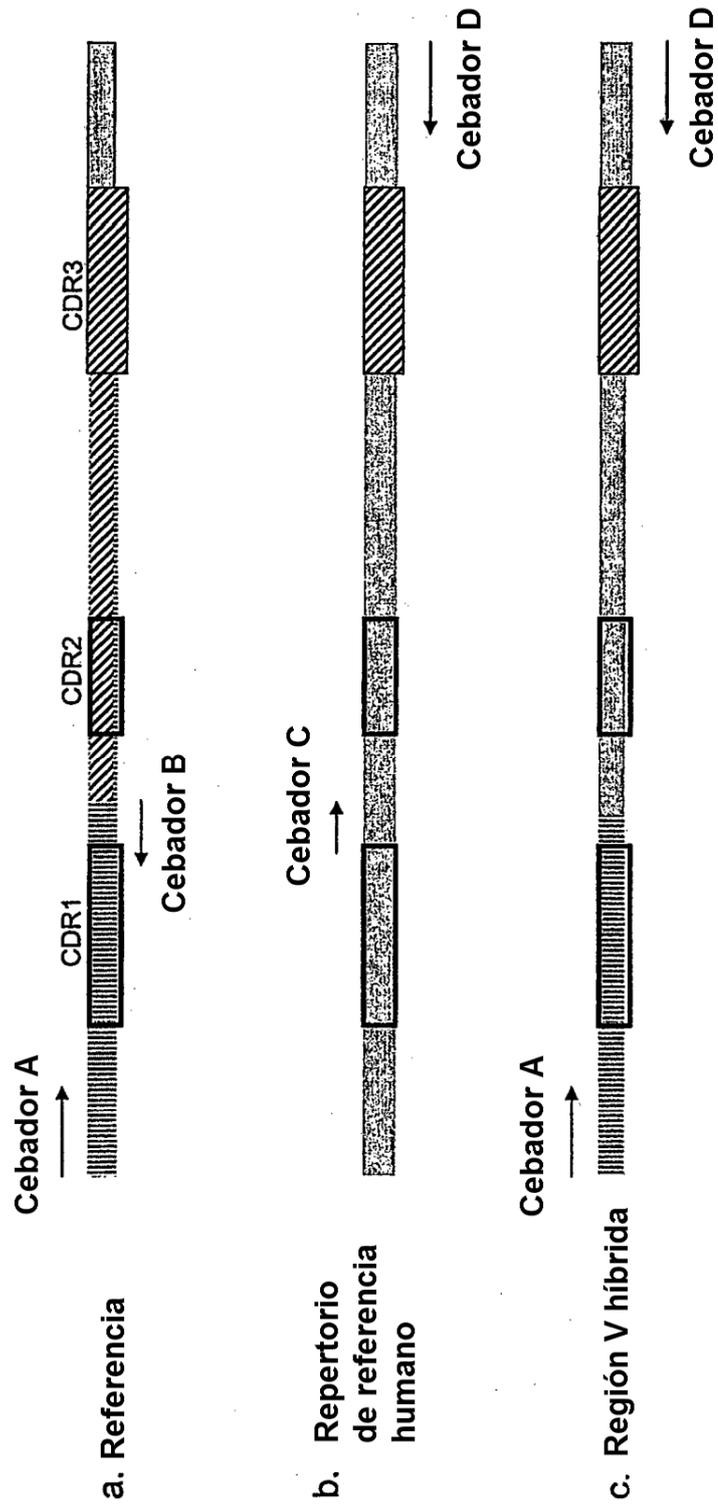


Figura 7

