

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 593**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007 E 11194316 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2463302**

54 Título: **Inmunoglobulinas multivalentes modificadas en la región de bucle estructural**

30 Prioridad:

**05.07.2006 AT 11472006**

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

**02.07.2015**

73 Titular/es:

**F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNGS-  
UND ENTWICKLUNGSGES.M.B.H (100.0%)  
Schwarzenbergplatz 7  
1030 Vienna, AT**

72 Inventor/es:

**RÜKER, FLORIAN;  
HIMMLER, GOTTFRIED y  
WOZNIAK-KNOPP, GORDANA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 539 593 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

Inmunoglobulinas multivalentes modificadas en la región de bucle estructural

5 La presente invención proporciona una inmunoglobulina multivalente, o una parte de la misma, que se une específicamente a al menos dos moléculas de la superficie celular de una sola célula, con al menos una modificación en al menos una región de bucles estructurales de dicha inmunoglobulina que determina la unión a un epítipo de dichas moléculas de la superficie celular, en que la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo.

10 Los anticuerpos monoclonales tienen utilidad en muchas aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y analíticas.

Se explicará aquí la estructura básica de un anticuerpo usando como ejemplo una inmunoglobulina IgG1 intacta. Se combinan dos cadenas pesadas (H; del inglés, *heavy*) idénticas y dos cadenas ligeras (L; del inglés, *light*) idénticas para formar la molécula de anticuerpo con forma de Y. Cada cadena pesada tiene cuatro dominios." Los dominios variables (VH) amino-terminales están en las puntas de la Y. Estos van seguidos de tres dominios constantes: CH1, CH2 y el CH3 carboxi-terminal, en la base del tallo de la Y. Un tramo corto, el conmutador, conecta las regiones variable y constante de la cadena pesada. La bisagra conecta CH2 y CH3 (el fragmento Fc) con el resto del anticuerpo (los fragmentos Fab). En una molécula de anticuerpo intacta se pueden producir un fragmento Fc y dos fragmentos Fab idénticos por escisión proteolítica de la bisagra. Las cadenas ligeras están formadas por dos dominios, variable (VL) y constante (CL), separados por un conmutador.

25 En la región bisagra, enlaces disulfuro conectan las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras están conectadas con las cadenas pesadas por enlaces disulfuro adicionales. Componentes carbohidratados enlazados por Asn están fijados en diferentes posiciones de los dominios constantes, dependiendo de la clase de la inmunoglobulina. En la IgG1, dos enlaces disulfuro en la región bisagra, entre parejas de Cys235 y Cys238, unen las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras están conectadas con las cadenas pesadas por dos enlaces disulfuro adicionales, entre Cys229s de los dominios CH1 y Cys214s de los dominios CL. Componentes carbohidratados están fijados a la Asn306 de cada CH2, lo que genera un acusado abultamiento en el tallo de la Y.

30 Estas características tienen profundas consecuencias funcionales. Las regiones variables tanto de la cadena pesada (VH) como de la cadena ligera (VL) están situadas en las "puntas" de la Y, donde están dispuestas para reaccionar con el antígeno. Esta punta de la molécula es el lado sobre el que está situado el extremo N de la secuencia de aminoácidos. El tallo de la Y se proyecta de modo que media eficazmente en funciones efectoras, tales como la activación del complemento y la interacción con receptores de Fc, o ADCC y ADCP. Sus dominios CH2 y CH3 sobresalen para facilitar la interacción con proteínas efectoras. El extremo C de la secuencia de aminoácidos, que puede ser denominado "pie" de la Y, está situado en el lado opuesto de la punta.

35 En los anticuerpos se encuentran dos tipos de cadena ligera denominados lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Una inmunoglobulina dada tiene cadenas  $\lambda$  o cadenas  $\kappa$ , nunca una de cada. No se han encontrado diferencias funcionales entre los anticuerpos que tienen cadenas ligeras  $\lambda$  o  $\kappa$ .

45 En una molécula de anticuerpo, cada dominio tiene una estructura similar de dos hojas beta íntimamente apiladas una contra otra en un barril beta antiparalelo comprimido. Esta estructura conservada se denomina "pliegue inmunoglobulínico". El pliegue inmunoglobulínico de dominios constantes contiene una hoja de 3 hebras apilada contra una hoja de 4 hebras. El pliegue es estabilizado por enlaces de hidrógeno entre las hebras beta de cada hoja, por enlaces hidrófobos entre restos de hojas opuestas en el interior y por un enlace disulfuro entre las hojas. La hoja de 3 hebras comprende las hebras C, F y G, y la hoja de 4 hebras tiene las hebras A, B, E y D. Las letras A a G representan las posiciones secuenciales de las hebras beta a lo largo de la secuencia de aminoácidos del pliegue inmunoglobulínico.

50 El pliegue de dominios variables tiene 9 hebras beta dispuestas en dos hojas de 4 y 5 hebras. La hoja de 5 hebras es estructuralmente homóloga a la hoja de 3 hebras de los dominios constantes pero contiene las hebras extra C y C". El resto de las hebras (A, B, C, D, E, F, G) tiene una topología igual y una estructura similar a la de sus equivalentes en los pliegues inmunoglobulínicos de los dominios constantes. Como en los dominios constantes, un enlace disulfuro une las hebras B y F de hojas opuestas.

55 Los dominios variables de ambas cadenas inmunoglobulínicas, la ligera y la pesada, contienen tres bucles hipervariables, o regiones determinantes de la complementariedad (CDRs; del inglés, *complementarity-determining regions*). Las tres CDRs de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDRs son bucles que conectan hebras beta B-C, C'-C" y F-G del pliegue inmunoglobulínico. Los restos de las CDRs varían de una molécula inmunoglobulínica a la siguiente, lo que imparte especificidad antigénica a cada anticuerpo.

60 Los dominios VL y VH de las puntas de las moléculas de anticuerpo están íntimamente apilados de modo que las 6 CDRs (3 de cada dominio) cooperan para construir una superficie (o cavidad) para una unión antigénicamente específica. De este modo, el sitio ligante de antígenos natural de un anticuerpo está compuesto de los bucles que

conectan las hebras B-C, C'-C" y F-G del dominio variable de cadena ligera y las hebras B-C, C'-C" y F-G del dominio variable de cadena pesada.

5 En una inmunoglobulina nativa, los bucles que no son bucles de CDR, o no forman parte de la cavidad ligante de antígenos según viene determinada por los bucles de CDR, no tienen una especificidad ligante de antígenos ni ligante de epítomos pero contribuyen a la plegadura correcta de la molécula inmunoglobulínica entera y/o a sus funciones efectoras u otras funciones, y, por lo tanto, son denominados "bucles estructurales" para la finalidad de esta invención. En los documentos de la técnica previa se muestra que se ha empleado hasta ahora el andamio de tipo inmunoglobulínico con el fin de manipular el sitio ligante de antígenos existente, introduciendo por ello nuevas propiedades ligantes. Sin embargo, hasta ahora, sólo se han alterado las regiones CDR para la unión de antígenos; en otras palabras, en el caso del pliegue inmunoglobulínico, sólo se ha modificado el sitio ligante de antígenos natural con objeto de cambiar su afinidad o especificidad de unión. Existe un vasto cuerpo bibliográfico en el que se describen diferentes formatos de dichas inmunoglobulinas manipuladas, frecuentemente expresados en forma de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFV; del inglés, single-chain Fv) o fragmentos Fab, ya sea presentados en la superficie de partículas de fago o ya sea solublemente expresados en diversos sistemas de expresión procarióticos o eucarióticos.

20 En el Documento PCT/EP2006/050059 se describe un método para alterar una inmunoglobulina, que comprende una modificación en una región de bucles estructurales para obtener nuevos sitios ligantes de antígeno. Este método es aplicable en gran medida a inmunoglobulinas y puede ser usado para producir una serie de inmunoglobulinas que se dirijan a diversos antígenos. No se describen explícitamente agentes ligantes multivalentes de dianas de la superficie celular.

25 En el Documento US2005/26600A1 se describen polipéptidos que comprenden un dominio de armazón variable (VFR) variante de cadena pesada. Un VFR es parte de la cavidad o acanaladura ligante de antígenos que puede entrar en contacto con un antígeno. Los VFRs son parte de la región de bucles de CDR y están situados en un dominio variable en el lado de los bucles de CDR para sostener la unión del antígeno a través de la región de bucles de CDR. Los bucles estructurales distintos de los VFRs no han sido mutados con el fin de alterar un sitio ligante de antígenos.

30 Las proteínas de superficie celular asociadas con cánceres humanos pueden ser dianas eficaces para una terapia monoclonal. Los anticuerpos pueden provocar respuestas antitumorales mediante modulación de la activación celular o a través del reclutamiento del sistema inmune. Ciertos anticuerpos monoclonales (mAbs; del inglés, monoclonal antibodies) ejercen parte de su efecto por entrecruzamiento de la diana, lo que puede agrupar las dianas y dar lugar a la activación, inhibición o multiplicación de la señalización celular, acabando finalmente en parada celular y/o apoptosis con respecto a la diana celular.

40 Se ha demostrado que ciertos mAbs (anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21 y anti-CD22) que ejercen poca o ninguna actividad anticrecimiento inherente sobre líneas celulares de linfoma pueden ser convertidos en potentes agentes antitumorales al utilizarlos como homodímeros tetravalentes. Estas actividades podrían ser potenciadas in vivo mediante el reclutamiento de células efectoras y/o el complemento. Otra estrategia usada para mAbs terapéuticos es copular un fármaco citotóxico con el mAb. Dicha inmunotoxina se puede unir a la diana de la superficie celular y luego se puede internalizar, liberando el fármaco para matar la célula. Puede que sea necesario el agrupamiento de la diana como un requisito previo para la internalización.

45 Para aumentar la potencia de los mAbs que ejercen su efecto a través del agrupamiento de moléculas diana, se han diseñado diversos formatos de Abs multivalentes. Se han ideado IgGs de longitud completa covalentemente enlazadas que forman Abs tetravalentes, y Abs IgM e IgG presentes en la naturaleza que remedan IgM e IgA polímeras mediante el uso de su apéndice secretor. Se diseñó otro formato tetravalente al añadir Fab al extremo C de cada cadena H de una IgG de longitud completa.

50 Para mejorar la penetración en tumores, se han unido entre sí construcciones más pequeñas en que se usan fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv)<sub>2</sub> (consistiendo cada Fv en dominios ligeros variables y pesados variables unidos por conectores peptídicos), para formar complejos multivalentes. Dichas construcciones pueden tener semividadas relativamente cortas (en comparación con las de los mAbs de longitud completa); consecuentemente, esto ha sido abordado uniendo estos multímeros de scFv con fragmentos Fc de IgG. Con scFv y formatos similares es difícil controlar la formación del grado exacto de multimerización; es decir, se pueden formar dímeros, trímeros, tetrámeros y complejos más grandes en relaciones variables dependiendo de la construcción básica y del método de expresión.

60 En el Documento WO2006/036834 A se describen moléculas y métodos en los que se incorporan péptidos biológicamente activos a una región de bucles del dominio Fc.

65 En el Documento WO01/83525 A se describe la fusión de los dominios Fc con péptidos biológicamente activos para aumentar las semividadas de los péptidos in vivo.

Adachi Masaaki et al. (Protein Science, Cambridge University Press, Cambridge, Gran Bretaña, volumen 12, nº 10 (2003), 2125-2131) describen la modificación de CL-CH1 para controlar la afinidad antígeno-anticuerpo de Fv.

5 En el Documento WO02/32925 A se describen bancos de fragmentos de fibronectina con bucles aleatorios de tipo CDR en los dominios variables.

Cualquiera de los formatos conocidos para producir inmunoglobulinas multivalentes tiene ciertas desventajas, sea en cuanto a inmunogenicidad, semivida in vivo o cuestiones de producción.

10 El objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema modular que permita diseñar una inmunoglobulina multivalente para dirigir a células de acuerdo con las respectivas necesidades, para solventar problemas de la técnica anterior.

### 15 **Breve descripción de la invención**

La presente invención proporciona dominios inmunoglobulínicos que se unen a proteínas de la superficie celular a través de bucles estructurales modificados para proporcionar una unión adicional a una molécula de la superficie celular, lo que permite el entrecruzamiento de receptores de la superficie celular.

20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una inmunoglobulina multivalente, o una parte ligante de la misma, que se une específicamente a al menos dos moléculas de la superficie celular de una sola célula con al menos una modificación en al menos una región de bucles estructurales de dicha inmunoglobulina que determina la unión con un epítipo de dichas moléculas de superficie celular, que incluye estructuras de propiedades antigénicas, situado en una sola célula o asequible en una población celular homogénea, en que la inmunoglobulina no  
25 modificada no se une significativamente a dicho epítipo.

De acuerdo con la presente invención, la inmunoglobulina multivalente de la invención puede ser además combinada con una o más inmunoglobulinas modificadas o con inmunoglobulinas no modificadas, o partes de las mismas, para obtener una inmunoglobulina de combinación.

30 Preferiblemente, la modificación del dominio de bucles estructurales en cuanto a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos es una supresión, una sustitución, una inserción o una combinación de lo anterior.

35 La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina de la invención o parte de la misma y un método para alterar una inmunoglobulina multivalente de acuerdo con la invención, que comprende las operaciones de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región de bucles estructurales;
- 40 - modificar al menos un resto nucleotídico de dicha región de bucles estructurales;
- transferir dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión;
- hacer que se exprese dicha inmunoglobulina multivalente;
- hacer que la inmunoglobulina multivalente expresada entre en contacto con un epítipo, y
- 45 - determinar si dicha inmunoglobulina multivalente se une con dicho epítipo.

Además, se proporciona el uso de la inmunoglobulina multivalente de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para uso terapéutico, por ejemplo, para el tratamiento de células tumorales y células infectadas con patógenos.

### 50 **Descripción detallada de la invención**

Los dominios inmunoglobulínicos modificados de acuerdo con la invención pueden ser utilizados como tales o ser incorporados a diversos formatos de anticuerpo conocidos, tales como anticuerpos completos, Fab, Fv monocatenarios, Fab2, minicuerpos y similares, para obtener sitios ligantes adicionales para receptores o epítopos de la superficie celular.

En particular, la presente invención se refiere a un método para alterar una inmunoglobulina que se une específicamente a epítopos de antígenos. Por medio de la modificación en la región de bucles estructurales, se puede alterar la inmunoglobulina para que se una al epítipo. En una realización preferida, la inmunoglobulina se une específicamente a al menos dos de dichos epítopos que difieren entre sí, que proceden de, o remedan, el mismo antígeno o antígenos diferentes.

Por ejemplo, el método de acuerdo con la invención se refiere a alterar una inmunoglobulina que se une específicamente a al menos un primer epítipo y que comprende al menos una modificación en al menos una región de bucles estructurales de dicha inmunoglobulina, y determinar la unión específica de dicha al menos una región de bucles con al menos un segundo epítipo, en que la región de bucles estructurales no modificada (región no CDR) no

se une específicamente a dicho al menos un segundo epítipo, que comprende las operaciones de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente a al menos un primer epítipo y que comprende al menos una región de bucles estructurales;
- 5 - modificar al menos un resto nucleotídico de al menos una de dichas regiones de bucles codificadas por dicho ácido nucleico;
- transferir dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión;
- hacer que se exprese dicha inmunoglobulina modificada;
- hacer que la inmunoglobulina modificada expresada entre en contacto con dicho al menos un segundo epítipo; y
- 10 - determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente al segundo epítipo.

El método de acuerdo con la invención se refiere preferiblemente a al menos una modificación en al menos una región de bucles estructurales de dicha inmunoglobulina y a la determinación de la unión específica de dicha al menos una región de bucles con al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en antígenos de la superficie celular, en que la inmunoglobulina que contiene una región de bucles estructurales no modificada no se une específicamente a dicha al menos una molécula.

El término "inmunoglobulina", como aquí se utiliza, incluye inmunoglobulinas o partes o fragmentos o derivados de inmunoglobulinas. Por lo tanto, incluye un "péptido de dominio inmunoglobulínico" que se va a modificar de acuerdo con la presente invención (como aquí se usan, los términos "inmunoglobulina" y "anticuerpo" son intercambiables) así como dominios inmunoglobulínicos o partes de los mismos que contienen un bucle estructural, o un bucle estructural de dichos dominios, tal como un minidominio. Las inmunoglobulinas se pueden usar como péptidos aislados o como moléculas de combinación con otros péptidos. En ciertos casos, es preferible utilizar un bucle estructural modificado definido o una región de bucles estructurales, o partes de los mismos, como moléculas aisladas para fines de unión o combinación. El "dominio inmunoglobulínico", como aquí se define, contiene dichos polipéptidos o péptidos de dominio inmunoglobulínico que pueden presentar características de unión específicas tras modificación y alteración. Los péptidos son homólogos a secuencias de dominio inmunoglobulínico, tienen preferiblemente una longitud de al menos 5 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de al menos 10 o incluso al menos 50 ó 100 aminoácidos, y constituyen al menos parcialmente un bucle estructural o la región de bucles estructurales, o la región de bucles no CDR del dominio. Preferiblemente, los péptidos excluyen aquellas inserciones que son consideradas aminoácidos no funcionales, regiones de tipo CDR o regiones CDR híbridas o quiméricas y/o estructuras canónicas de regiones CDR. Las características de unión se refieren a la unión, la afinidad y la avidéz epitópicas específicas.

Un derivado de una inmunoglobulina de acuerdo con la invención es cualquier combinación de una o más inmunoglobulinas de la invención y/o una proteína de fusión en que cualquier dominio o minidominio de la inmunoglobulina de la invención puede estar fusionado en cualquier posición de una o más proteínas distintas (tales como otras inmunoglobulinas, ligandos, proteínas andamio, enzimas, toxinas y similares). También se puede obtener un derivado de la inmunoglobulina de la invención por técnicas de recombinación o por unión a otras sustancias mediante diversas técnicas químicas tales como copulación covalente, interacción electrostática, enlace por disulfuros, etc.

Las otras sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas, o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). Un derivado es también una inmunoglobulina con la misma secuencia de aminoácidos pero preparada completa o parcialmente a partir de aminoácidos artificiales o químicamente modificados.

Las moléculas alteradas de acuerdo con la presente invención serán útiles como proteínas independientes y también como derivados o proteínas de fusión, muy normalmente fusionadas de tal modo que sean parte de estructuras de anticuerpo más grandes o moléculas de anticuerpo completas, o partes de las mismas tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc, fragmentos Fv y otros. Será posible usar las proteínas alteradas para producir moléculas que sean biespecíficas y trispecíficas y que quizás porten incluso más especificidades al mismo tiempo, y será posible al mismo tiempo controlar y preseleccionar la valencia de unión al mismo tiempo de acuerdo con los requisitos del uso planeado de dichas moléculas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una inmunoglobulina con al menos una región de bucles, caracterizada por que dicha al menos una región de bucles comprende al menos una modificación de aminoácido que forma al menos una región de bucles modificada, en que dicha al menos una región de bucles modificada se une específicamente a al menos un epítipo de un antígeno.

Se prefiere combinar molecularmente al menos un dominio de anticuerpo modificado, que se une a su pareja específica a través de las secuencias no variables o un bucle estructural, con al menos otra molécula ligante que puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un receptor soluble, un ligando u otro dominio de anticuerpo modificado.

La molécula que actúa como parte de un par ligante que es específicamente reconocido por la inmunoglobulina de

acuerdo con la invención es preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en moléculas proteicas, ácidos nucleicos y carbohidratos.

Las regiones de bucles de las inmunoglobulinas modificadas se pueden unir específicamente a cualquier clase de estructuras o moléculas ligantes, en particular a antígenos, moléculas proteicas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glicanos, carbohidratos, lípidos, moléculas orgánicas pequeñas, moléculas inorgánicas o combinaciones o fusiones de los mismos. Por supuesto, las inmunoglobulinas modificadas pueden comprender al menos dos bucles o regiones de bucles, por lo que cada uno de los bucles o las regiones de bucles se puede unir específicamente a epítopos o moléculas diferentes.

De acuerdo con la presente invención, en un bucle estructural de una estructura de anticuerpo dada se pueden introducir regiones ligantes para antígenos o sitios ligantes de antígeno de todas las clases de antígenos de superficie celular.

De acuerdo con la presente invención, el término "antígeno" significará moléculas o estructuras conocidas por interactuar o ser capaces de interactuar con la región de bucles de CDR de inmunoglobulinas. Las regiones de bucles estructurales de la técnica previa que se refieren a anticuerpos nativos no interactúan con antígenos sino que contribuyen más bien a la estructura global y/o a la unión a moléculas efectoras. Sólo tras una alteración de acuerdo con la invención los bucles estructurales pueden formar cavidades ligantes de antígenos sin implicación de bucles de CDR ni de la región CDR.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "antígenos de la superficie celular" incluirá todos los antígenos que pueden ser reconocidos por una estructura de anticuerpo en la superficie de una célula, y fragmentos de tales moléculas. Los "antígenos de la superficie celular" preferidos son aquellos antígenos que ya han demostrado ser o que pueden ser inmunológica o terapéuticamente relevantes, especialmente aquellos en los que se ha examinado su eficacia preclínica o clínica. Para la finalidad de la presente invención, son específicamente relevantes las moléculas de la superficie celular que median en una actividad de muerte celular. Tras la unión de la inmunoglobulina de acuerdo con la invención a al menos dos de esas moléculas de la superficie celular, el sistema inmune proporciona citólisis o muerte celular; de este modo, se puede proporcionar un medio potente para luchar contra células humanas.

Preferiblemente, el antígeno es seleccionado de entre antígenos de la superficie celular, incluyendo receptores, en particular del grupo que consiste en tirosina cinasas de receptores erbB (tales como EGFR, HER2, HER3 y HER4, pero sin limitarse a estos), moléculas de la superfamilia de receptores de TNF, tales como el receptor de Apo-1, TNFR1, TNFR2, receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR; del inglés, nerve growth factor receptor), CD40, moléculas de la superficie de células T, receptores de células T, antígeno OX40 de células T, receptor TACI, BCMA, Apo-3, DR4, DR5, DR6, receptores señuelo, tales como DcR1, DcR2, CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1 y TNFL1, pero sin limitarse a estas moléculas, antígenos de la superficie de células B, tales como CD10, CD19, CD20, CD21 y CD22, antígenos o marcadores de tumores sólidos o células hematológicas cancerosas, células de linfoma o leucemia, y otras células sanguíneas incluyendo las plaquetas sanguíneas, pero sin limitarse a estas moléculas.

De acuerdo con otra realización preferida, el antígeno o la molécula que se une a la región de bucles estructurales modificada es seleccionada del grupo que consiste en antígenos asociados con tumores, en particular EpCAM, glicoproteína 72 asociada con tumores (TAG-72; del inglés, tumor assoiated glycoprotein-72), antígeno CA 125 asociado con tumores, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA; del inglés, prostate specific membrane antigen), antígeno de alto peso molecular asociado con melanomas (HMW-MAA; del inglés, high molecular weight melanoma-assoiated antigen), carbohidrato relacionado con el antígeno Lewis Y asociado con tumores, antígeno carcinoembrionario (CEA; del inglés, carcinoembrionic antigen), CEACAM5, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18 y el antígeno citoqueratínico asociado con tumores, antígenos bacterianos, antígenos víricos, alérgenos, moléculas de IgE relacionadas con la alergia, cKIT y el receptor I de Fc épsilon, IRp60, receptor de IL-5, CCR3, receptor de glóbulos rojos (CR1), albúmina sérica humana, albúmina sérica de ratón, albúmina sérica de rata, el receptor neonatal FcRn de Fc gamma, los receptores Fc-gamma RI, Fc-gamma-RII y Fc-gamma-RIII de Fc gamma, receptores de Fc alfa, receptores de Fc épsilon, fluoresceína, lisozima, receptor 9 de tipo Toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD64, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, LIF, OSM, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, TNF alfa, TNF beta2, TNF alfa, TNF alfa, TNF alfa, TNF alfa, TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, receptor 1 de TRAIL, receptor A1 de adenosina, receptor de la linfotoxina beta, TACI, BAFF-R, EPO, LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta 1, integrina beta 2, integrina alfa 4/beta 7, integrina alfa 2, integrina alfa 3, integrina alfa 4, integrina alfa 5, integrina alfa 6, integrina alfa V, integrina alfa V/beta 3, FGFR-3, factor de crecimiento de queratinocitos, GM-CSF, M-CSF, RANKL, VLA-1, VLA-4, selectina L, anti-Id, selectina E, HLA- HLA-DR, CTLA-4, receptor de células T, B7-1, B7-2, integrina VNR, TGF beta 1, TGF beta 2, eotaxina 1, estimulador de linfocitos B (BLyS; del inglés, B-Lymphocyte Stimulator), complemento C5, IgE, IgA, IgD, IgM, IgG, factor VII, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptor de endotelinas, VLA-4, carbohidratos tales como antígenos de grupos sanguíneos y carbohidratos relacionados, glicosilación de Galili, gastrina, receptores de

gastrina, carbohidratos asociados con tumores, hapteno NP-cap o NIP-cap, receptor alfa/beta de células T, selectina E, glicoproteína P, MRP3, MRP5, glutatión S-transferasa pi (proteínas de resistencia a múltiples fármacos), proteína 140 de membrana de los gránulos alfa (GMP 140; del inglés, alpha-granule membrane protein 140), digoxina, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP; del inglés, placental alkaline phosphatase) y fosfatasa alcalina testicular de tipo PLAP, receptor de transferrina, heparanasa I, miosina cardiaca humana, glicoproteína IIb/IIIa (gpIIb/IIIa), glicoproteína H (gH) de la envoltura del citomegalovirus humano (HCMV; del inglés, human cytomegalovirus), gp120 de HIV, HCMV, virus respiratorio sincitial (RSV; del inglés, respiratory syncytial virus) F, gpF del RSVF, integrina VNR, gp120 del virus de la hepatitis B, CMV, gpIIb/IIIa, bucle V3 de la gp120 del HIV IIIB, gpF del virus respiratorio sincitial (RSV), glicoproteína D (gD) del virus herpes simple (HSV; del inglés, herpes simplex virus), glicoproteína B (gB) del HSV, glicoproteína B (gB) de la envoltura del HCMV, toxina de *Clostridium perfringens* y fragmentos de los mismos.

A las subestructuras de antígenos se hace generalmente referencia como "epítomos" (por ejemplo, epítomos de células B y epítomos de células T), con tal de que sean inmunológicamente relevantes, es decir, que también sean reconocibles por anticuerpos naturales o monoclonales. De acuerdo con la presente invención, el término "epítomo" significará una estructura molecular que puede completar totalmente una pareja ligante específica o ser parte de una pareja ligante específica para el dominio ligante o la inmunoglobulina de la presente invención.

Químicamente, un epítomo puede estar compuesto de un carbohidrato, un péptido, un ácido graso, una sustancia inorgánica o derivados de los mismos, y cualesquier combinaciones de los mismos. Si un epítomo es un péptido o polipéptido, habrá normalmente al menos 3 aminoácidos, preferiblemente de 8 a 50 aminoácidos, y más preferiblemente de entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos, incluidos en el péptido. No hay un límite superior crítico para la longitud del péptido, el cual podría comprender casi la longitud completa de la secuencia polipeptídica. Los epítomos pueden ser epítomos lineales o conformacionales. Un epítomo lineal consta de un solo segmento de una secuencia primaria de una cadena polipeptídica. Los epítomos lineales pueden ser contiguos o solapantes. Los epítomos conformacionales constan de aminoácidos juntados por la plegadura del polipéptido para formar una estructura terciaria, y los aminoácidos no están necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal.

Específicamente, los epítomos son al menos parte de moléculas diagnósticamente relevantes; es decir, la ausencia o presencia de un epítomo en una muestra se correlaciona cualitativa o cuantitativamente con una enfermedad o con el estado de salud o con un estado de procesamiento en la fabricación o con un estado ambiental y alimentario. Los epítomos también pueden ser al menos parte de moléculas terapéuticamente relevantes, es decir, moléculas a las que se puede dirigir el dominio ligante específico que cambia el curso de la enfermedad.

Preferiblemente, los nuevos sitios ligantes de antígeno de los bucles estructurales se introducen por sustitución, supresión y/o inserción de uno o más elementos en la secuencia de la inmunoglobulina, en particular de la secuencia de nucleótidos.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la modificación de al menos un nucleótido da lugar a una sustitución, supresión y/o inserción de la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina codificada por dicho ácido nucleico.

La modificación de la al menos una región de bucles puede dar lugar a una sustitución, supresión y/o inserción de 1 o más nucleótidos o aminoácidos, preferiblemente una mutación puntual, o incluso el intercambio de bucles completos, más preferiblemente el cambio de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 y hasta 30 aminoácidos. Por ello, la secuencia modificada comprende aminoácidos no incluidos en las regiones conservadas de los bucles estructurales, estando presentes en la naturaleza los aminoácidos recién introducidos, aunque extraños para el sitio de la modificación, o siendo sustitutos de aminoácidos presentes en la naturaleza. Cuando el aminoácido extraño es seleccionado de un grupo específico de aminoácidos, tales como aminoácidos con una polaridad o hidrofobia específica, se puede obtener de acuerdo con la invención un banco enriquecido en el grupo específico de aminoácidos en las posiciones aleatorizadas. Dichos bancos son también llamados bancos "enfocados".

La molécula de ácido nucleico aleatoriamente modificada puede comprender las unidades repetitivas aquí identificadas, que codifican todos los aminoácidos presentes en la naturaleza conocidos o un subconjunto de los mismos. Los bancos que contienen secuencias modificadas en que se usa un subconjunto específico de aminoácidos con fines de modificación son llamados bancos "enfocados". El miembro de dichos bancos tiene una probabilidad aumentada de un aminoácido de dicho subconjunto en la posición modificada, que es al menos dos veces mayor que la habitual, preferiblemente al menos 3 veces o incluso al menos 4 veces mayor. Dichos bancos también tienen un número limitado o inferior de miembros, de modo que el número de miembros reales del banco alcance el número de miembros teóricos del banco. En ciertos casos, el número de miembros de un banco enfocado no es inferior a  $10^3$  veces el número teórico, preferiblemente no inferior a  $10^2$  veces, muy preferiblemente no inferior a 10 veces.

Un banco de acuerdo con la invención puede ser diseñado como un banco particular que contiene al menos 50 % de formatos específicos, preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al

menos 80 %, más preferiblemente al menos 90 %, o aquellos que consisten principalmente en formatos de anticuerpo específicos. Se prefieren los formatos de anticuerpo específicos, de modo que el banco preferido de acuerdo con la invención es seleccionado del grupo que consiste en un banco de VH, un banco de VHH, un banco de V kappa, un banco de V lambda, un banco de Fab, un banco de CH1/CL y un banco de CH3. Se prefieren especialmente los bancos caracterizados por un contenido de moléculas compuestas que contienen más de un dominio de anticuerpo, tal como un banco de IgG o un banco de Fc. Otros bancos preferidos son aquellos que contienen receptores de células T, formando bancos de receptores de células T. Otros bancos preferidos son los bancos de epítomos, en que la proteína de fusión comprende una molécula con una variante de un epítomo, lo que también permite la selección de moléculas competitivas que tienen una función ligante similar pero una funcionalidad diferente. Un banco ejemplar es un banco de TNF alfa, en que se presentan trímeros de la proteína de fusión de TNF alfa mediante un único conjunto genético.

Sin embargo, el número máximo de aminoácidos insertados en una región de bucles de una inmunoglobulina no puede exceder preferiblemente de 30, preferiblemente de 25, más preferiblemente de 20, aminoácidos a lo sumo. La sustitución y la inserción de los aminoácidos tiene preferiblemente lugar aleatoria o semialeatoriamente usando todos los aminoácidos posibles o una selección de aminoácidos preferidos con fines de aleatorización, mediante métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente solicitud de patente.

El sitio de modificación puede ser en un único bucle estructural específico o una región de bucles estructurales. Una región de bucles está normalmente compuesta de al menos dos, preferiblemente al menos 3 o al menos 4 bucles que están adyacentes entre sí y que pueden contribuir a la unión de un antígeno a través de la formación de un sitio ligante de antígenos o una cavidad ligante de antígenos. Se prefiere que el sitio o los sitios de modificación estén situados en la zona de 10 aminoácidos, más preferiblemente dentro de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta 100 aminoácidos, en particular dentro de una región estructural para formar una superficie o cavidad donde el antígeno pueda acceder estéricamente a las regiones de bucles.

La al menos una región de bucles es preferiblemente mutada o modificada para producir bancos, preferiblemente mediante métodos de mutagénesis aleatoria, semialeatoria o, en particular, aleatoria dirigida al sitio, en particular para suprimir, intercambiar o introducir insertos aleatoriamente generados en bucles estructurales. Alternativamente, se prefiere el uso de planteamientos combinatorios. Se puede emplear cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, entre ellos la mutagénesis en casete. Estos métodos pueden ser usados para hacer modificaciones de aminoácidos en posiciones deseadas de la inmunoglobulina de la presente invención. En ciertos casos, las posiciones se escogen aleatoriamente, por ejemplo, con cualquiera de los aminoácidos posibles o con una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar secuencias de bucles, o se realizan cambios de aminoácidos usando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los restos pueden ser preferiblemente mutados por aminoácidos específicos, tal como alanina, a lo que se hace referencia como barrido de aminoácidos o barrido de alaninas. Dichos métodos pueden ser acoplados a planteamientos de ingeniería más sofisticados en los que se emplean métodos de selección para explorar niveles más elevados de diversidad secuencial.

Un método preferido de acuerdo con la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aleatoriamente modificada que codifica una inmunoglobulina, un dominio inmunoglobulínico o una parte de los mismos, que comprende al menos una unidad repetitiva de nucleótidos dentro de una región de codificación de bucles estructurales que tiene la secuencia 5'-NNS-3', 5'-NNN-3', 5'-NNB-3' o 5'-NNK-3'. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico modificado comprende codones nucleotídicos seleccionados del grupo de TMT, WMT, BMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC, NNK, NNN, NNS o cualquier combinación de los mismos (la codificación es de acuerdo con la IUPAC).

La modificación de la molécula de ácido nucleico se puede llevar a cabo introduciendo oligonucleótidos sintéticos en un segmento más grande de ácido nucleico o mediante la síntesis *de novo* de una molécula de ácido nucleico completa. La síntesis de ácido nucleico se puede llevar a cabo con bloques de construcción trinucleotídicos que reducirán el número de combinaciones secuenciales sin sentido si se va a codificar un subconjunto de aminoácidos [por ejemplo, Yañez et al., *Nucleic Acids Res.* (2004) 32: e158; Virnekas et al., *Nucleic Acids Res.* (1994) 22: 5600-5607].

La molécula de ácido nucleico aleatoriamente modificada puede comprender las unidades repetitivas anteriormente identificadas, que codifican todos los aminoácidos presentes en la naturaleza conocidos.

Como es bien sabido en la técnica, hay diversas tecnologías de selección que se pueden utilizar para la identificación y el aislamiento de proteínas con ciertas afinidades y características ligantes, incluyendo, por ejemplo, tecnologías de presentación tales como presentación en fagos, presentación en ribosomas, presentación en la superficie celular y similares, como se describe más adelante. Los métodos para la producción y exploración de variantes de anticuerpo son bien conocidos en la técnica. En *Antibody Engineering*, redactado por Duebel y Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; Hayhurst y Georgiou, 2001, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 683-689; y Maynard y Georgiou, 2000, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2: 339-76, se describen métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación y exploración de anticuerpos.

De acuerdo con la presente invención, un "bucle estructural" o "bucle no de CDR" ha de entenderse del modo siguiente: las inmunoglobulinas están hechas de dominios con un llamado "pliegue inmunoglobulínico". En esencia, hojas beta antiparalelas están conectadas por bucles para formar un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, algunos de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión a un antígeno por el sitio ligante natural de un anticuerpo. Estos bucles son llamados "bucles de CDR". Los bucles de CDR están situados dentro de la región de bucles de CDR, que en algunos casos puede incluir también la región de armazón variable (llamada VFR; del inglés, *variable framework region*) adyacente a los bucles de CDR. Se sabe que las VFRs pueden contribuir a la cavidad ligante de antígenos de un anticuerpo, lo que generalmente viene principalmente determinado por los bucles de CDR. De este modo, las VFRs son consideradas parte de la región de bucles de CDR y no serían apropiadamente usadas para la finalidad de la invención. Contrariamente a las VFRs situadas dentro de la región de bucles de CDR o próximas a los bucles de CDR, otras VFRs de dominios variables serían particularmente adecuadas para ser utilizadas de acuerdo con la invención. Ésas son los bucles estructurales de las VFRs situadas enfrente de la región de bucles de CDR o en el lado C-terminal de un dominio inmunoglobulínico variable.

Todos los demás bucles de dominios de anticuerpo contribuyen más bien a la estructura de la molécula y/o a la función efectora. Estos bucles son aquí definidos como "bucles estructurales" o "bucles no de CDR", lo que también excluiría las VFRs de la región de bucles de CDR.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las inmunoglobulinas modificadas (y siempre incluidos más adelante por toda la memoria descriptiva: derivados o fragmentos inmunoglobulínicos) pueden ser clonadas en células huésped, hechas expresar y examinadas en cuanto a sus especificidades ligantes. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos bien conocidos y, en "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", 3ª edición (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), y "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley and Sons), se describe diversos métodos que pueden ser útiles en la presente invención. Los ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se pueden incorporar a un vector de expresión con objeto de que se expresen dichas inmunoglobulinas. Los vectores de expresión comprenden normalmente una inmunoglobulina operativamente enlazada, que está situada en una relación funcional, con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualesquier parejas de fusión y/o elementos adicionales. Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se pueden producir al cultivar una célula huésped transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene el ácido nucleico que codifica las inmunoglobulinas modificadas, bajo las condiciones apropiadas para provocar o causar la expresión de las inmunoglobulinas modificadas. Los métodos para introducir moléculas de ácido nucleico exógenas en un huésped son bien conocidos en la técnica y variarán con el huésped usado. Por supuesto, para la expresión de inmunoglobulinas modificadas también se pueden emplear sistemas de expresión acelulares o exentos de células.

La expresión "sistema de expresión" se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias de control en conexión operativa, de modo que los huéspedes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Con objeto de efectuar la transformación, se puede incluir el sistema de expresión en un vector; sin embargo, también se puede integrar luego el DNA relevante en el cromosoma del huésped.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el sistema de expresión comprende un vector. Para este fin, cualquier vector de expresión conocido en la técnica puede ser apropiadamente utilizado.

La inmunoglobulina modificada se expresa preferiblemente en un huésped, preferiblemente en una célula bacteriana, una levadura, una célula vegetal, una célula animal, una planta o un animal.

Para que se exprese la inmunoglobulina modificada, se puede utilizar una gran variedad de células huésped apropiadas, incluyendo, pero sin limitarse a, células de mamífero (células animales), células vegetales, bacterias (por ejemplo, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*), células de insecto y levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris* y *Sacharomyces cerevisiae*). Por ejemplo, en el catálogo de líneas celulares ATCC, obtenible de la American Type Culture Collection, se describe diversas líneas celulares que pueden resultar útiles en la presente invención. Además, también se pueden utilizar plantas y animales como huéspedes para la expresión de la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención. La expresión, así como los casetes o vectores de transfección, se pueden seleccionar de acuerdo con el huésped utilizado.

Por supuesto, también se pueden utilizar sistemas de expresión proteica acelulares o exentos de células. Las plataformas para expresión proteica por transcripción/traducción in vitro que producen suficientes cantidades de proteína ofrecen muchas de las ventajas de una expresión proteica exenta de células, eliminando la necesidad de laboriosas operaciones hacia arriba y hacia abajo (por ejemplo, transformación de células huésped, cultivo y lisis) normalmente asociadas con los sistemas de expresión basados en células.

En una realización preferida de la presente invención, las inmunoglobulinas modificadas son purificadas o aisladas después de la expresión. Las inmunoglobulinas modificadas pueden ser aisladas o purificadas de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación estándares incluyen técnicas cromatográficas,

incluyendo cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico o hidrófoba, técnicas electroforéticas, técnicas inmunológicas, precipitación, diálisis, filtración, concentración y técnicas de cromatoenfoque. La purificación es a menudo permitida por una pareja de fusión particular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser purificados usando una resina de glutatión si se emplea una fusión de GST, una cromatografía de afinidad con Ni<sup>2+</sup> si se emplea una etiqueta de His, o un anticuerpo anti-etiqueta inmovilizado si se utiliza una etiqueta FLAG. Para una guía general sobre técnicas de purificación adecuadas, véase "Antibody Purification: Principles and Practice", 3ª edición, Scopes, Springer-Verlag, New York, 1994. Por supuesto, también es posible hacer que se expresen las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención en la superficie de un huésped, en particular en la superficie de una célula bacteriana, de insecto o de levadura o en la superficie de fagos o virus.

Las inmunoglobulinas modificadas pueden ser exploradas utilizando diversos métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos que se usan en ensayos in vitro, ensayos in vivo y de base celular, y tecnologías de selección. En los procedimientos de exploración se pueden utilizar tecnologías de automatización y de exploración de alto rendimiento. En la exploración se puede emplear una etiqueta o una pareja de fusión, tal como, por ejemplo, una enzima, una etiqueta inmune, una etiqueta isotópica o una pequeña etiqueta molecular tal como un colorante fluorescente o colorimétrico o una molécula luminiscente.

En una realización preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las inmunoglobulinas son exploradas en un ensayo in vitro. En una realización preferida el anticuerpo es explorado en cuanto a su funcionalidad, por ejemplo, en cuanto a su capacidad para catalizar una reacción o a su afinidad ligante por su diana.

En los ensayos se puede emplear diversos métodos de detección, incluyendo, pero sin limitarse a, etiquetas cromógenas, fluorescentes, luminiscentes e isotópicas.

Como es sabido en la técnica, un subconjunto de métodos de exploración es aquel que permite seleccionar miembros favorables de un banco. A los métodos se hace aquí referencia como "métodos de selección", y estos métodos resultan útiles en la presente invención para explorar inmunoglobulinas modificadas. Cuando se exploran bancos de inmunoglobulinas utilizando un método de selección, sólo se propagan, aíslan y/o observan los miembros de un banco que son favorables, es decir, los que satisfacen ciertos criterios de selección. Como se apreciará, puesto que sólo se observan las variantes más idóneas, dichos métodos permiten la exploración de bancos que son más grandes que los explorables mediante métodos con los que se ensaya individualmente la idoneidad de miembros del banco. La selección viene habilitada por cualquier método, técnica o pareja de fusión que une, covalente o no covalentemente, el fenotipo de las inmunoglobulinas con su genotipo, es decir, la función de un anticuerpo con el ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, el uso de la presentación en fago como un método de selección viene habilitado por la fusión de miembros del banco con la proteína del gen III. De este modo, la selección o el aislamiento de inmunoglobulinas modificadas que satisfacen ciertos criterios, por ejemplo, la afinidad ligante por la diana de la inmunoglobulina, también permite seleccionar o aislar el ácido nucleico que la codifica. Una vez aislado(s), el gen o los genes que codifican inmunoglobulinas modificadas pueden ser luego multiplicados. Este proceso de aislamiento y multiplicación, al que se hace referencia como "panning", puede ser repetido, lo que permite el enriquecimiento en variantes de anticuerpo favorables del banco. La secuenciación del ácido nucleico fijado permite finalmente la identificación génica.

En la técnica se conocen diversos métodos de selección que pueden resultar útiles en la presente invención para explorar bancos de inmunoglobulinas. Estos incluyen, pero no se limitan a, presentación en fago ("Phage display of peptides and antibodies: A laboratory manual", Kay et al., 1996, Academic Press, San Diego, California, 1996; Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10.832-10.838; Smith, 1985, Science 228: 1315-1317) y sus derivados, tales como infección selectiva con fagos (Malmborg et al., 1997, J. Mol. Biol. 273: 544-551), fago selectivamente infectivo (Krebber et al., 1997, J. Mol. Biol. 268: 619-630) y panning por infectividad retardada (Benhar et al., 2000, J. Mol. Biol. 301: 893-904), presentación en la superficie celular (Wittrup, 2001, Curr. Opin. Biotechnol. 12: 395-399), tal como la presentación en bacterias (Georgiou et al., 1997, Nat. Biotechnol. 15: 29-34; Georgiou et al., 1993, Trends Biotechnol. 11: 6-10; Lee et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18: 645-648; Jun et al., 1998, Nat. Biotechnol. 16: 576-80), levaduras (Boder y Wittrup, 2000, Methods Enzymol. 328: 430-44; Boder y Wittrup, 1997, Nat. Biotechnol. 15: 553-557) y células de mamífero (Whitehorn et al., 1995, Bio/Technology 13: 1215-1219), así como tecnologías de presentación in vitro (Amstutz et al., 2001, Curr. Opin. Biotechnol. 12: 400-405) tales como presentación en polisomas (Mattheakis et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9022-9026), presentación en ribosomas (Hanes et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937-4942), presentación en mRNA (Roberts y Szostak, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12.297-12.302; Nemoto et al., 1997, FEBS Lett. 414: 405-408) y sistema de presentación con inactivación de ribosomas (Zhou et al., 2002, J. Am. Chem. Soc. 124: 538-543).

Otros métodos de selección que pueden resultar útiles en la presente invención incluyen métodos que no se basan en presentación, tales como métodos in vivo que incluyen, pero no se limitan a, expresión periplásmica y exploración citométrica (Chen et al., 2001, Nat. Biotechnol. 19: 537-542), el ensayo de complementación de fragmentos de anticuerpo (Johnsson y Varshavsky, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10.340-10.344; Pelletier et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12.141-12.146) y la exploración con dos híbridos de levadura (Fields y Song, 1989, Nature 340: 245-246) usada en modo de selección (Visintin et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11.723-11.728). En una realización alterna, la selección es habilitada por una pareja de fusión que se une a una secuencia específica en

el vector de expresión, uniéndose así covalente o no covalentemente la pareja de fusión y el miembro variante de Fc asociado del banco con el ácido nucleico que les codifica.

En una realización alternativa, puede tener lugar una selección in vivo si la expresión del anticuerpo imparte a la célula cierta ventaja en cuanto a crecimiento, reproducción o supervivencia.

5 Un subconjunto de métodos de selección a los que se hace referencia como métodos de "evolución dirigida" es aquél que incluye el cruce o desarrollo de secuencias favorables durante la selección, a veces con la incorporación de nuevas mutaciones. Como apreciarán los expertos en la técnica, los métodos de evolución dirigida pueden facilitar la identificación de las secuencias más favorables de un banco y pueden aumentar la diversidad de las  
10 secuencias que se exploran. En la técnica se conocen diversos métodos de evolución dirigida que pueden resultar útiles en la presente invención para explorar variantes de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, barajadura de DNA (Documentos PCT WO 00/42561 A3 y PCT WO 01/70947 A3), barajadura de exones (Patente de EE.UU. nº 6.365.377; Kolkman y Stemmer, 2001, Nat. Biotechnol. 19: 423-428), barajadura de familias (Crameri et al., 1998, Nature 391: 288-291; Patente de EE.UU. nº 6.376.246), RACHITT™ (Coco et al., 2001, Nat. Biotechnol. 19: 354-359; Documento PCT WO 02/06469), STEP y cebado aleatorio de recombinación in vitro (Zhao et al., 1998, Nat. Biotechnol. 16: 258-261; Shao et al., 1998, Nucleic Acids Res. 26: 681-683), ensambladura génica mediada por exonucleasas (Patente de EE.UU. nº 6.352.842; Patente de EE.UU. nº 6.361.974), Mutagénesis por Saturación de Sitios Génicos™ (Patente de EE.UU. nº 6.358.709), Rensambladura Génica™ (Patente de EE.UU. nº 6.358.709), SCRATCHY (Lutz et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 11.248-11.253), métodos de fragmentación de DNA (Kikuchi et al., Gene 236: 159-167), barajadura de DNA de cadena sencilla (Kikuchi et al., 2000, Gene 243: 133-137) y tecnología AMEsystem™ para generación de anticuerpos por evolución dirigida (Applied Molecular Evolution) (Patente de EE.UU. nº 5.824.514; Patente de EE.UU. nº 5.817.483; Patente de EE.UU. nº 5.814.476; Patente de EE.UU. nº 5.763.192; Patente de EE.UU. nº 5.723.323).

25 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la unión específica de la inmunoglobulina modificada con la molécula se determina mediante un ensayo de unión seleccionado del grupo que consiste en ensayos inmunológicos, preferiblemente ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, enzyme-linked immunosorbent assays), ensayos de resonancia de plasmones superficiales, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación, espectroscopía de resonancia magnética nuclear NOE de transferencia (trNOE), ensayos de competición, ensayos de unión a tejidos, ensayos de unión a células vivas y ensayos con extractos celulares.

Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo usando diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos basados en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET; del inglés, fluorescence resonance energy transfer) y la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET; del inglés, bioluminescence resonance energy transfer), AlphaScreen™ (ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada), ensayo de proximidad de centelleo, ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), resonancia de plasmones superficiales (SPR; del inglés, surface plasmon resonance; también conocida como BIACORE™), calorimetría isotérmica de titulación, calorimetría diferencial de barrido, electroforesis en gel y cromatografía, incluyendo la filtración en gel. Estos y otros métodos se pueden aprovechar de alguna etiqueta o  
35 pareja de fusión.

La inmunoglobulina modificada es preferiblemente conjugada con una etiqueta o una molécula informadora, seleccionadas del grupo que consiste en moléculas orgánicas, etiquetas enzimáticas, etiquetas radiactivas, etiquetas coloreadas, etiquetas fluorescentes, etiquetas cromógenas, etiquetas luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos. Las inmunoglobulinas modificadas conjugadas con etiquetas o moléculas informadoras se pueden usar, por ejemplo, en métodos diagnósticos.

La inmunoglobulina modificada se puede conjugar con otras moléculas que permitan una detección sencilla de dicho producto de conjugación en, por ejemplo, ensayos de unión (por ejemplo, ELISA) y estudios de unión.

En una realización preferida, se exploran variantes de anticuerpo usando uno o más ensayos de base celular o in vivo. Normalmente, para dichos ensayos, se añaden exógenamente inmunoglobulinas modificadas purificadas o no purificadas de modo que las células resulten expuestas a inmunoglobulinas individuales o a colecciones de  
55 inmunoglobulinas pertenecientes a un banco. Estos ensayos se basan normalmente, aunque no siempre, en la función de la inmunoglobulina; es decir, en la capacidad del anticuerpo para unirse a su diana y mediar en cierto proceso bioquímico, tal como, por ejemplo, una función efectora, inhibición de la unión ligando/receptor, apoptosis y similares. Dichos ensayos a menudo acarrear controlan la respuesta de las células al anticuerpo, tal como, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, un cambio en la morfología celular, o una activación transcripcional tal como la expresión celular de un gen natural o un gen informador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden permitir medir la capacidad de variantes de anticuerpo para provocar ADCC, ADCP o CDC. Para ciertos ensayos, puede que sea necesario añadir células o componentes adicionales, es decir, además de las células diana, tales como, por ejemplo, complemento sérico o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMCs; del inglés, peripheral blood monocytes), células NK, macrófagos y similares. Dichas células adicionales pueden proceder de cualquier organismo, preferiblemente de seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Las  
65 inmunoglobulinas pueden causar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar en

el ataque a células diana por células inmunes que han sido añadidas al ensayo. Los métodos para controlar la muerte o la viabilidad celulares son conocidos en la técnica e incluyen el uso de colorantes y reactivos inmunoquímicos, citoquímicos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos con tinción de caspasas pueden permitir la medición de la apoptosis, y la incorporación o liberación de sustratos radiactivos o colorantes fluorescentes, tal como Azul Alamar, puede permitir el control del crecimiento o la activación celulares.

En una realización preferida, se puede usar el ensayo de citotoxicidad DELFIA® basado en EuTDA (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.). Alternativamente, se pueden controlar las células diana muertas o dañadas midiendo la liberación de uno o más componentes intracelulares naturales, tal como, por ejemplo, lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para examinar la función en ensayos de base celular. En este caso, se puede controlar la respuesta examinando inmunoglobulinas o genes naturales que puedan ser suprarregulados; por ejemplo, se puede medir la liberación de ciertas interleucinas o, alternativamente, la lectura puede ser a través de una construcción informadora. Los ensayos de base celular pueden implicar además la medición de cambios morfológicos de células como respuesta a la presencia de inmunoglobulinas modificadas. Los tipos celulares para dichos ensayos pueden ser procarionóticos o eucarióticos, y se puede emplear diversas líneas celulares que son conocidas en la técnica. Alternativamente, las exploraciones de base celular se llevan a cabo usando células que han sido transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Es decir, no se añaden exógenamente variantes de anticuerpo a las células. Por ejemplo, en una realización, en la exploración de base celular se utiliza presentación en la superficie celular. Se puede emplear una pareja de fusión que permita la presentación de inmunoglobulinas modificadas en la superficie de células (Wittrup, 2001, Curr. Opin. Biotechnol. 12: 395-399).

En una realización preferida, se puede determinar experimentalmente la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas modificadas usando uno o más ensayos de base celular. En una realización preferida, se usan ensayos de activación de células T ex vivo para cuantificar experimentalmente la inmunogenicidad. En este método, se estimulan células presentadoras de antígenos y células T naïfs de donantes coincidentes con un péptido o un anticuerpo completo de interés una o más veces. A continuación, se puede detectar la activación de células T usando diversos métodos, tal como, por ejemplo, determinando la producción de citocinas o midiendo la incorporación de timidina tritiada. En la realización más preferida, se determina la producción de interferón gamma usando ensayos Elispot (Schmittel et al., 2000, J. Immunol. Meth. 24: 17-24).

Las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden ser caracterizadas ex vivo en experimentos con células, tejidos, y organismos completos. Como se sabe en la técnica, a menudo se ensayan fármacos in vivo en animales, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, con objeto de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad o un modelo morbozo o para medir la farmacocinética, la farmacodinámica, la toxicidad y otras propiedades de un fármaco. A los animales se puede hacer referencia como modelos morbosos. A menudo se ensayan productos terapéuticos en ratones, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones atímicos, ratones SCID, ratones con xenoinjertos y ratones transgénicos (incluyendo operativos e inoperantes). Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo para ser utilizado como un agente terapéutico con la semivida, función efectora, actividad apoptótica, y actividad citotóxica o citolítica apropiadas. Para el ensayo se puede utilizar cualquier organismo, preferiblemente mamíferos. Por ejemplo, a causa de su similitud genética con los seres humanos, primates, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y, por lo tanto, pueden ser utilizados para ensayar la eficacia, toxicidad, farmacocinética, farmacodinámica, semivida u otra propiedad de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. Se requieren finalmente ensayos de las sustancias en seres humanos para la aprobación como fármacos y, por lo tanto, evidentemente se contemplan estos experimentos. De este modo, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden ser ensayadas en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética y/o otras propiedades clínicas. Especialmente, las inmunoglobulinas multivalentes de acuerdo con la invención que se unen a una sola célula a través de al menos dos antígenos superficiales, que se unen preferiblemente a al menos tres estructuras que entrecruzan células diana, serían consideradas preapoptóticas y ejercerían una actividad apoptótica tras la dirección y el entrecruzamiento celulares. La unión multivalente proporciona una asociación relativamente grande de parejas ligantes, también llamada entrecruzamiento, que es un requisito previo para la apoptosis.

Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden resultar útiles en una gran variedad de productos de anticuerpos. En una realización, la variante de anticuerpo de la presente invención se utiliza para terapia o profilaxis, por ejemplo, como una inmunoterapia activa o pasiva, para uso preparativo, industrial o analítico, como un agente diagnóstico, un compuesto industrial o un reactivo para investigación, preferiblemente un agente terapéutico. La variante de anticuerpo o inmunoglobulina modificada puede resultar útil en una composición de anticuerpo que sea monoclonal o policlonal. En una realización preferida, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para capturar o matar células diana que llevan el antígeno diana, por ejemplo, células cancerosas. En una realización alterna, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se usan para bloquear el antígeno diana o actuar como antagonistas o agonistas de él, por ejemplo, actuando como antagonistas de una citocina o un receptor de citocina.

En una realización alternamente preferida, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se usan para

bloquear factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento o actuar como antagonistas o agonistas de ellos y, de este modo, mediar en la muerte de las células diana que llevan o necesitan el antígeno diana.

En una realización alternativamente preferida, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se usan para bloquear enzimas y sustratos de enzimas o actuar como antagonistas o agonistas de ellos.

5 Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se pueden usar con diversos fines terapéuticos, preferiblemente para inmunoterapia activa o pasiva.

10 Específicamente, la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención u obtenible mediante un método de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para la preparación de una vacuna para inmunización activa. Para ello, la inmunoglobulina es usada como una sustancia antigénica farmacológica para formular una vacuna o es usada para pescar o capturar estructuras antigénicas ex vivo o in vivo para uso en una formulación de vacuna.

15 En una realización preferida, un anticuerpo que comprende las inmunoglobulinas modificadas es administrado a un paciente para tratar un trastorno específico. Para los fines de la presente invención, un "paciente" incluye tanto seres humanos como otros animales, preferiblemente mamíferos y muy preferiblemente seres humanos. Por "trastorno específico" se quiere aquí significar un trastorno que puede ser mejorado mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención.

20 En una realización, una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Alternativamente, la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de cinasas, agentes antiangiogénicos, agentes cardioprotectores y otros  
25 agentes terapéuticos. Las inmunoglobulinas modificadas se pueden administrar concomitantemente con uno o más regímenes terapéuticos distintos. Por ejemplo, se puede administrar una variante de anticuerpo de la presente invención al paciente junto con quimioterapia, radioterapia, o tanto quimioterapia como radioterapia. En una realización, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se pueden administrar junto con uno o más anticuerpos, que pueden comprender o no una variante de anticuerpo de la presente invención. De acuerdo con otra  
30 realización de la invención, se emplean las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y una o más terapias anticancerosas distintas para tratar células cancerosas ex vivo. Se contempla que dicho tratamiento ex vivo pueda ser útil en el trasplante de médula ósea y, particularmente, el trasplante de médula ósea autóloga. Por supuesto, se contempla que los anticuerpos de la invención puedan ser empleados en combinación con aún otras técnicas terapéuticas tales como la cirugía.

35 Otros diversos agentes terapéuticos puede resultar útil para administración con las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. En una realización, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente antiangiogénico, que es un compuesto que bloquea, o interfiere en cierto grado en, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o una proteína, tal como, por  
40 ejemplo, un anticuerpo, una molécula de fusión de Fc o una citocina, que se une a un factor de crecimiento o un receptor de factor de crecimiento implicado en la activación de la angiogénesis. El factor antiangiogénico aquí preferido es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; del inglés, vascular endothelial growth factor). En una realización alterna, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente terapéutico que provoca o potencia una respuesta inmune adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo que se dirige a  
45 CTLA-4. En una realización alterna, la inmunoglobulina modificada se administra con un inhibidor de tirosina cinasa, que es una molécula que inhibe en cierto grado la actividad tirosina cinasa de una tirosina cinasa. En una realización alterna, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se administran con una citocina. Por "citocina", como aquí se usa, se quiere significar un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares, incluyendo las quimiocinas.

50 Se contemplan composiciones farmacéuticas en que se formulan inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y uno o más agentes terapéuticamente activos. Se preparan formulaciones estables de las variantes de anticuerpo de la presente invención para almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales  
55 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, redactado por A. Osol, 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que se van a utilizar para administración in vivo son preferiblemente estériles. Esto se lleva fácilmente a cabo por filtración a través de membranas filtrantes estériles o por otros métodos. Las inmunoglobulinas modificadas y demás agentes terapéuticamente activos aquí descritos se pueden también formular como inmunoliposomas y/o se pueden encerrar en microcápsulas.

60 La administración de la composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención, preferiblemente en forma de una solución acuosa estéril, se puede realizar de diversos modos, incluyendo, pero sin limitarse a, oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóptica, transdérmica, mucosa, tópica (por ejemplo, geles, ungüentos, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (por ejemplo, la  
65 tecnología AERx™ para inhalación, comercialmente asequible de Aradigm, o el sistema Inhance™ para distribución pulmonar, comercialmente asequible de Inhale Therapeutics), vaginal, parenteral, rectal o intraocularmente.

Como aquí se usa, la expresión "se une específicamente" se refiere a una reacción de unión que es determinante del ligando afin de interés en una población heterogénea de moléculas. De este modo, bajo las condiciones determinadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo en el caso de una inmunoglobulina), el anticuerpo especificado se une a su "diana" particular y no se une en cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. Comparablemente a las CDRs de anticuerpos, las regiones de bucles estructurales modificadas son componentes proteicos ligantes de antígenos, estructuras o moléculas y no antígenos en sí.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para fabricar una inmunoglobulina o una preparación farmacéutica de la misma que comprende al menos una modificación en una región de bucles estructurales de dicha inmunoglobulina y determinar la unión de dicha inmunoglobulina a un epítipo de un antígeno, en que la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo, que comprende las operaciones de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región de bucles;
- modificar al menos un resto nucleotídico de al menos una de dichas regiones de bucles;
- transferir dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión;
- hacer que se exprese dicha inmunoglobulina modificada;
- hacer que la inmunoglobulina modificada expresada entre en contacto con un epítipo;
- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une a dicho epítipo; y
- proporcionar la inmunoglobulina modificada que se une a dicho epítipo y, opcionalmente, rematarla en una preparación farmacéutica.

En una realización preferida, la inmunoglobulina de acuerdo con la invención es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo de cadena única biespecífico. Se prefiere además que la inmunoglobulina comprenda un dominio biespecífico o una parte del mismo que incluya un minidominio.

En particular, la presente invención se refiere a un método para fabricar una inmunoglobulina multiespecífica que se une específicamente a al menos una primera molécula, o una preparación farmacéutica de la misma, que comprende al menos una modificación en al menos una región de bucles estructurales de dicha inmunoglobulina, y determinar la unión específica de dicha al menos una región de bucles a al menos una segunda molécula, que es un antígeno tal como el seleccionado del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados con tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales, en que la inmunoglobulina que contiene una región de bucles estructurales no modificada no se une específicamente a dicha al menos una segunda molécula, que comprende las operaciones de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente a al menos una primera molécula que comprende al menos una región de bucles estructurales;
- modificar al menos un resto nucleotídico de al menos una de dichas regiones de bucles codificadas por dicho ácido nucleico;
- transferir dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión;
- hacer que se exprese dicha inmunoglobulina modificada;
- hacer que la inmunoglobulina modificada expresada entre en contacto con dicha al menos una segunda molécula;
- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente a la segunda molécula; y
- proporcionar la inmunoglobulina modificada que se une específicamente a dicha al menos una segunda molécula y, opcionalmente, rematarla en una preparación farmacéutica.

Se prefiere la alteración de más de una especificidad en un miembro de un par ligante específico (Kufer et al., 2004, Trends in Biotechnology, volumen 22, páginas 238-244).

Se han realizado numerosos intentos para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpo monoclonales multiespecíficos, por ejemplo, biespecíficos. Un problema en la producción de anticuerpos biespecíficos compuestos de dos cadenas polipeptídicas diferentes (cadenas pesada y ligera) es la necesidad de que se expresen cuatro cadenas diferentes (dos cadenas pesadas y dos ligeras) en una célula, lo que da lugar a un número de diversas combinaciones de moléculas que han de ser separadas de la molécula biespecífica deseada en la mezcla. Debido a su similitud, la separación de estas moléculas es difícil y costosa. Se han empleado diversas técnicas para minimizar la presencia de dichos apareamientos indeseados (Carter, 2001, Journal of Immunological Methods, volumen 248, páginas 7-15).

Una solución al problema es la producción de una cadena polipeptídica con dos especificidades, tal como, por ejemplo, dos scFvs enlazados entre sí, o la producción de los llamados diacuerpos. Se ha mostrado que dichas moléculas están muy alejadas del pliegue de una molécula natural y su producción es de notoria dificultad (Le-Gall et al., 2004, Protein Engineering, Design & Selection, volumen 17, páginas 357-366).

Otro problema del diseño actual de anticuerpos biespecíficos es el hecho de que, incluso si los anticuerpos parentales se unen bivalentemente a sus respectivas parejas ligantes (por ejemplo, IgG), el anticuerpo biespecífico

resultante es monovalente para cada una de las respectivas parejas ligantes.

Las moléculas multiespecíficas preferidas de la presente invención solucionan estos problemas: es posible la expresión de una molécula biespecífica como una cadena polipeptídica (un dominio de Ig modificado con dos especificidades ligantes; véase la sección de ejemplos), lo que es más fácil de llevar a cabo que la expresión de dos cadenas polipeptídicas de anticuerpo [Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984)].

También se puede producir como una molécula de tipo anticuerpo (es decir, compuesta de dos cadenas polipeptídicas, sean homodímeras o sean heterodímeras); debido al hecho de que la segunda especificidad está situada en la parte no variable de la molécula, no hay necesidad de dos cadenas pesadas diferentes ni dos cadenas ligeras diferentes. Por lo tanto, no existe la posibilidad de un apareamiento erróneo de las dos cadenas.

Un anticuerpo de la presente invención puede consistir en una cadena pesada y una cadena ligera que forman conjuntamente una región variable que se une a una pareja ligante específica por una primera especificidad. La segunda especificidad puede estar formada por un bucle modificado de cualquiera de los bucles estructurales de la cadena pesada o la cadena ligera. El sitio de unión puede estar también formado por más de un bucle no de CDR que puede estar estructuralmente contiguo (en la cadena pesada o en la cadena ligera o en ambas cadenas).

El anticuerpo modificado o el derivado pueden ser un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, CH2-CH3, Fc, con o sin la región bisagra).

Se puede unir monovalente o multivalentemente a parejas ligantes iguales o diferentes, o incluso con diferente valencia para las diferentes parejas ligantes, dependiendo del diseño.

Puesto que hay un número de diversos bucles disponibles para selección y diseño de un sitio ligante específico en las regiones no CDR de cadenas pesadas y ligeras, es posible diseñar derivados de anticuerpo con incluso más de dos especificidades sin los problemas anteriormente mencionados.

Los dominios ligantes específicos de una cadena polipeptídica pueden estar conectados con o sin un conector peptídico.

La región de bucles estructurales modificada de dicha inmunoglobulina de la invención puede estar dentro del dominio constante y/o el variable de dicha inmunoglobulina. En caso de que el bucle estructural modificado esté dentro del dominio constante, este está preferiblemente dentro de CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C o una parte del mismo.

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

Puesto que la inmunoglobulina modificada puede ser empleada con diversos fines, en particular en composiciones farmacéuticas, la inmunoglobulina es preferiblemente de origen humano o murino. Por supuesto, la inmunoglobulina modificada puede ser también una inmunoglobulina humanizada o quimérica.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la inmunoglobulina humana es seleccionada del grupo que consiste en IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM.

La inmunoglobulina murina es preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3 e IgM.

La inmunoglobulina modificada puede proceder de una de las clases inmunoglobulínicas anteriormente identificadas y ser luego estructuralmente cambiada.

La inmunoglobulina comprende preferiblemente una cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina o una parte de la misma. Para la finalidad de la invención se puede proporcionar preferiblemente una molécula heterodímera u homodímera, así como inmunoglobulinas monómeras.

La inmunoglobulina modificada puede comprender una cadena pesada y/o ligera y al menos un dominio variable y/o constante.

La inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente al menos un dominio constante y/o al menos un dominio variable de la inmunoglobulina o una parte del mismo que incluye un minidominio.

Un dominio constante es un pliegue inmunoglobulínico unitario de la parte constante de una molécula inmunoglobulínica, al que también se hace referencia como un dominio de la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4, Ck, Cl).

Un dominio variable es un pliegue inmunoglobulínico unitario de la parte variable de una inmunoglobulina, al que también se hace referencia como un dominio de la región variable (por ejemplo, Vh, Vk, VI, Vd).

5 Una inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención consiste en un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C e Igl-C, o una parte o combinaciones del mismo, incluyendo un minidominio, con al menos una región de bucles, y se caracteriza por que dicha al menos una región de bucles comprende al menos una modificación de aminoácido que forma al menos una región de bucles modificada, en que dicha al menos una región de bucles modificada se une específicamente a al menos un epítipo de un antígeno.

10 La inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más dominios constantes (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o diez dominios). Si está presente más de un dominio en la inmunoglobulina modificada, estos dominios pueden ser del mismo tipo o de tipos variables [por ejemplo, CH1-CH1-CH2, CH3-CH3, región Fc o (CH2)<sub>2</sub>-(CH3)<sub>2</sub>]. Por supuesto, también el orden de los dominios individuales puede ser de cualquier clase (por ejemplo, CH1-CH3-CH2 o CH4-CH1-CH3-CH2).

15 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, las regiones de bucles modificadas de CH1, CH2, CH3 y CH4 comprenden los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 y los aminoácidos 106 a 117.

20 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se modifican los restos de aminoácido de las posiciones 15 a 17, 29 a 34, 85.4 a 85.3, 92 a 94, 97 a 98 y/o 108 a 110 de CH3.

25 Las regiones de bucle de Igk-C e Igl-C de origen humano comprenden preferentemente los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117 y los aminoácidos 123 a 126.

30 Las regiones de bucle de Igk-C e Igl-C de origen humano comprenden preferentemente los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 26 a 36, los aminoácidos 43 a 79, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 90 a 101, los aminoácidos 108 a 116 y los aminoácidos 122 a 125.

35 De acuerdo con una realización específica la inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede contener una modificación dentro del dominio variable, que se selecciona del grupo de VH, Vkappa, Vlambda, VHH y combinaciones de los mismos. Más específicamente, comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 o los aminoácidos 106 a 117, en los que la numeración de la posición de aminoácido de los dominios es la del IMGT.

40 Otra inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención consiste en un dominio variable de una cadena pesada o ligera, o una parte del mismo incluyendo un minidominio, con al menos una región de bucle, preferentemente una región de bucle estructural, y se caracteriza porque dicha al menos una región de bucle comprende al menos una modificación de aminoácidos que forma al menos una región de bucle modificado, en la que dicha al menos una región de bucle modificado se une específicamente con al menos un epítipo de un antígeno.

45 En una realización alternativa, la inmunoglobulina de acuerdo con la invención se caracteriza porque las regiones de bucle de VH o Vkappa o Vlambda de origen humano comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76 y los aminoácidos 89 a 101, más preferentemente las posiciones de aminoácidos 12 a 17, las posiciones de aminoácidos 45 a 50, las posiciones de aminoácidos 69 a 75 y las posiciones de aminoácidos 93 a 98, en los que la numeración de la posición de aminoácido de los dominios es la del IMGT.

50 Las regiones de bucle estructural del dominio variable de la inmunoglobulina de origen humano, según sea posible seleccionadas para fines de modificación de acuerdo con la invención comprenden preferentemente los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76 y los aminoácidos 89 a 101.

55 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención las regiones de bucle estructural del dominio variable de la inmunoglobulina de origen murino según sea posible seleccionadas para fines de modificación de acuerdo con la invención comprenden los aminoácidos 6 a 20, los aminoácidos 44 a 52, los aminoácidos 67 a 76 y los aminoácidos 92 a 101.

60 La inmunoglobulina de acuerdo con la invención es preferentemente también de origen de camello. Los anticuerpos de camello comprenden solamente una cadena pesada y tienen la misma afinidad de antígeno como anticuerpos normales que consisten en cadenas ligeras y pesadas. En consecuencia los anticuerpos de camello son mucho más pequeños que, por ejemplo, anticuerpos humanos, lo que les permite penetrar en tejidos densos para alcanzar el antígeno, en los que proteínas mayores no pueden. Además, la simplicidad, alta afinidad y especificidad comparativas y el potencial para alcanzar e interaccionar con sitios activos, los anticuerpos de cadena pesada de camello presentan ventajas sobre los anticuerpos comunes en el diseño, la producción y la aplicación de

65

compuestos clínicamente valiosos.

5 La inmunoglobulina de origen de camello o camélido comprende preferentemente al menos un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en CH1, CH2 y CH3. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención las regiones de bucle de CH1, CH2 y CH3 de la inmunoglobulina de camello comprenden los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 24 a 39, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 82 a 85, los aminoácidos 91 a 103 y los aminoácidos 108 a 117.

10 Aún más específicamente, las regiones de bucle de inmunoglobulina de VH de origen murino comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 6 a 20, los aminoácidos 44 a 52, los aminoácidos 67 a 76 y los aminoácidos 92 a 101, en los que la numeración de la posición de aminoácido de los dominios es la del IMGT. Las regiones de bucles modificados de un VHH de origen de camélido preferentemente comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 7 a 18, los aminoácidos 43 a 55, los aminoácidos 68 a 75 y los aminoácidos 91 a 101, en los que la numeración de la posición de aminoácido de los dominios es la del IMGT.

15 Las regiones de aminoácidos identificadas anteriormente de las inmunoglobulinas respectivas son regiones de bucle que se ha especificado que son adecuadas para fines de modificación de acuerdo con la invención.

20 Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para unir y/o detectar específicamente una molécula, que comprende las operaciones de:

- 25 (a) poner una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada obtenible mediante un método de acuerdo con la presente invención en contacto con una muestra de ensayo de la que se sospecha que contiene dicha molécula, y  
(b) detectar la posible formación de un complejo específico de inmunoglobulina/molécula.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para aislar específicamente una molécula, que comprende las operaciones de:

- 30 (a) poner una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada obtenible mediante un método de acuerdo con la presente invención en contacto con una muestra que contiene dicha molécula,  
(b) separar el complejo específico de inmunoglobulina/molécula formado, y  
35 (c) aislar opcionalmente la molécula de dicho complejo.

Las inmunoglobulinas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para aislar específicamente moléculas de una muestra. Si se usan inmunoglobulinas multiespecíficas, se puede aislar más de una molécula de una muestra. Es especialmente ventajoso utilizar inmunoglobulinas modificadas en dichos métodos porque ello permite, por ejemplo, generar una matriz que tenga una superficie homogénea con cantidades definidas de parejas ligantes (es decir, inmunoglobulinas modificadas) inmovilizadas sobre ella que sean capaces de unirse a las moléculas que se van a aislar. Por contraste, si se usan parejas ligantes mono-específicas, no se puede generar una matriz homogénea porque las parejas ligantes individuales no se unen con la misma eficacia a la matriz.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para dirigir un compuesto a una diana, que comprende las operaciones de:

- (a) poner en contacto una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada obtenible mediante un método de acuerdo con la presente invención capaces de unirse específicamente a dicho compuesto, y  
50 (b) suministrar el complejo de inmunoglobulina/compuesto a la diana.

Las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para suministrar al menos un compuesto unido a las CDRs y/o regiones de bucles modificadas a una diana. Dichas inmunoglobulinas se pueden usar para dirigir sustancias terapéuticas a un sitio de acción preferido en el curso del tratamiento de una enfermedad.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención u obtenible mediante un método de acuerdo con la presente invención, para la preparación de un banco proteico de inmunoglobulinas. Otros bancos de acuerdo con la invención no sólo contienen diversas proteínas o proteínas de fusión y conjuntos genéticos, sino también precursores de proteínas, ácidos nucleicos, ribosomas, células, virus, fagos y otros sistemas de presentación que expresan información que codifica las proteínas, y/o las proteínas como tales.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un banco proteico que comprende una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención u obtenible mediante el método de acuerdo con la presente invención.

Los métodos preferidos para construir dicho banco se pueden hallar en la parte anterior y en los ejemplos. El banco de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para identificar inmunoglobulinas que se unen a una molécula definida.

5 En particular, la presente invención se refiere al uso de un banco proteico que comprende una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención u obtenible mediante el método de acuerdo con la presente invención, para el diseño de derivados inmunoglobulínicos.

10 Se puede cambiar una inmunoglobulina existente para introducir sitios ligantes de antígeno en cualquier dominio o minidominio usando un banco proteico del respectivo dominio de al menos 10, preferiblemente 100, más preferiblemente 1000, más preferiblemente 10.000, más preferiblemente 100.000, muy preferiblemente más de 1.000.000, dominios o minidominios variantes con al menos un bucle modificado, en particular uno o más bucles estructurales. El número de miembros de un banco puede ser incluso mayor, en la mayoría de los casos de hasta 10e12; con ciertos sistemas de presentación, tal como la presentación ribosómica, el número puede ser incluso superior a ése.

15 El banco es luego explorado en cuanto a la unión al antígeno específico. Después de la caracterización molecular en cuanto a las propiedades deseadas, el dominio o minidominio seleccionado es clonado en la inmunoglobulina original mediante técnicas de ingeniería genética para que sustituya a la región de tipo silvestre. Alternativamente, se puede intercambiar sólo el DNA que codifica los bucles o que codifica los aminoácidos mutados para obtener una inmunoglobulina con el sitio ligante adicional para el antígeno específico.

20 La elección del sitio para el bucle estructural antigénicamente específico mutado depende de la estructura de la inmunoglobulina original y de la finalidad del sitio ligante adicional. Por ejemplo, si la molécula original es una inmunoglobulina completa que ha de ser insertada en un sitio ligante de antígenos adicional sin perturbación de la función efectora, los bucles que se van a modificar son seleccionados entre dominios alejados de CH2 y CH3 que son las parejas ligantes naturales para moléculas efectoras de Fc. Si la inmunoglobulina original es un fragmento Fab, es posible la modificación de bucles en dominios constantes de las cadenas ligeras o las cadenas pesadas o los respectivos dominios variables. Para generar un banco, se pueden preparar bancos de moléculas originales mutantes que tengan mutaciones en uno o más bucles estructurales de uno o más dominios. La selección con moléculas originales mutadas completas puede tener ciertas ventajas ya que la selección de la unión antigénica con un bucle estructural modificado proporcionará las modificaciones estéricamente ventajosas si se examinan también las demás propiedades que la inmunoglobulina mutada debería mostrar. En particular, se prefiere un banco de Fc con, por ejemplo, sitios ligantes en la región de bucles C-terminal.

25 El requisito de un banco proteico de un dominio mutado o un mini dominio o una molécula de fusión de un dominio en cuanto al tamaño (es decir, el número de proteínas variantes) depende del cometido. En general, es necesario que un banco para generar un sitio ligante de antígenos *de novo* sea mayor que un banco usado para modificar adicionalmente un sitio ligante de antígenos alterado ya existente compuesto de un bucle estructural modificado (por ejemplo, para potenciar la afinidad o cambiar la especificidad fina hacia el antígeno).

30 La presente invención también se refiere a un banco inmunoglobulínico o un banco de ácido nucleico que comprende una pluralidad de inmunoglobulinas, por ejemplo, un dominio constante o variable, un minidominio y/o al menos una región de bucles estructurales contenida en un minidominio, o moléculas de ácido nucleico que codifican los mismos. El banco contiene miembros con diferentes modificaciones, en que la pluralidad viene definida por las modificaciones en la al menos una región de bucles estructurales. El banco de ácido nucleico incluye preferiblemente al menos 10 miembros diferentes con una diferencia en la secuencia de nucleótidos para obtener al menos un aminoácido diferente (que da lugar a un intercambio de aminoácido), e incluye más preferiblemente al menos 100, más preferiblemente 1000 ó 10.000 miembros diferentes (por ejemplo, diseñado mediante estrategias de aleatorización o técnicas combinatorias). También se prefieren números de miembros individuales aún más diversificados, tales como al menos 1.000.000 o al menos 10.000.000.

35 Un aspecto más de la invención es la combinación de dos inmunoglobulinas, dominios o minidominios diferentes seleccionados de al menos dos bancos de acuerdo con la invención con objeto de generar inmunoglobulinas multiespecíficas. Estas inmunoglobulinas específicas seleccionadas pueden ser combinadas entre sí y con otras moléculas, como si fueran bloques de construcción, para diseñar la disposición óptima de los dominios o minidominios para conseguir las propiedades deseadas. Por ejemplo, se puede usar una molécula basada en Fc como tal, con propiedades ligantes de antígeno, como un vehículo para otros motivos ligantes o como un bloque de construcción para construir una inmunoglobulina con dominios constantes o variables, o si no combinada solamente con dominios constantes, tales como moléculas de Fc multímeras, preferiblemente con 2, 3 ó 4 sitios ligantes de antígeno.

40 Además, se pueden introducir una o más inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la invención en diversos, o todos los, sitios diferentes de una posible proteína sin destrucción de la estructura de la proteína. Mediante dicha técnica de "barajadura de dominios", se crean nuevos bancos que pueden ser de nuevo seleccionados en cuanto a las propiedades deseadas.

Preferiblemente, la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención está compuesta de al menos dos dominios inmunoglobulínicos, o una parte de los mismos que incluye un minidominio, y cada dominio contiene al menos un sitio ligante de antígenos.

5 También se prefiere una inmunoglobulina de acuerdo con la invención que comprende al menos un dominio de la región constante y/o al menos un dominio de la región variable de la inmunoglobulina, o una parte de los mismos que incluye un minidominio. De este modo, un dominio variable que, por ejemplo, está modificado en la región C-terminal, o el dominio variable enlazado con una región de CH1 modificada, por ejemplo un minidominio CH1 modificado, es una de las realizaciones preferidas.

El banco preferido contiene inmunoglobulinas de acuerdo con la invención seleccionadas del grupo que consiste en dominios de una inmunoglobulina, minidominios y derivados de los mismos.

15 Una realización preferida de la presente invención es una molécula ligante para un antígeno (molécula ligante de antígeno), que comprende al menos un dominio inmunoglobulínico y una región de bucles estructurales modificada de acuerdo con la presente invención para que se una al antígeno, en que dicha molécula ligante no comprende dominios variables de un anticuerpo. Puede comprender otras partes útiles para actividades de anticuerpo [tales como, por ejemplo, regiones (secuencias) efectoras naturales o modificadas]; sin embargo carece de la región ligante "natural" de los anticuerpos, es decir, los dominios variables o los bucles de CDR, incluyendo bucles de VFR de la región CDR, en su posición presente en la naturaleza. Estas moléculas ligantes de antígeno de acuerdo con la presente invención tienen las ventajas anteriormente descritas para las moléculas presentes aunque sin la actividad ligante específica de los anticuerpos mediada por bucles de CDR y, sin embargo, con una actividad ligante específica recién introducida en la región de bucles estructurales.

25 Preferiblemente, estas moléculas ligantes de antígeno de acuerdo con la presente invención comprenden CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C Igl-C y combinaciones de los mismos, comprendiendo dichas combinaciones al menos dos, preferiblemente al menos cuatro, especialmente al menos seis, dominios constantes y al menos un bucle estructural o una región de bucles modificados de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, estas regiones de bucles estructurales están conectadas a través de una región de bucles estructurales modificada de acuerdo con la presente invención o los bucles estructurales que están naturalmente presentes entre dichos dos dominios constantes. Una realización de estas moléculas ligantes de antígeno de acuerdo con la presente invención consiste en la región Fc de un anticuerpo con al menos una modificación en un bucle estructural de acuerdo con la presente invención. Además, para las moléculas ligantes de antígeno de acuerdo con la presente invención, se prefiere que los nuevos sitios ligantes de antígeno de los bucles estructurales se introduzcan mediante tecnologías de aleatorización, es decir, intercambiando uno o más restos de aminoácido del bucle mediante técnicas de aleatorización o introduciendo insertos aleatoriamente generados en dichos bucles estructurales. Alternativamente, se prefiere el uso de planteamientos conminatorios. Preferiblemente, los sitios ligantes de antígeno de los bucles estructurales modificados son seleccionados de bancos adecuados.

40 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a una inmunoglobulina modificada que tiene un sitio ligante de antígenos para proporcionar una especificidad extraña para la inmunoglobulina no modificada y que está incorporada a uno o más bucles estructurales. El término "extraño" significa que el antígeno no es reconocido por la región ligante específica de CDR ni por otras regiones ligantes naturales o intrínsecas de la inmunoglobulina. De esta manera, una pareja ligante extraña, pero no la pareja ligante natural de una inmunoglobulina, puede resultar unida por el sitio ligante de antígenos recién formado de un bucle estructural. Esto significa que no se considera que una pareja ligante natural, tal como un receptor de Fc o un agente efector del sistema inmune, resulte unida por el sitio ligante de antígenos extraño para la inmunoglobulina no modificada.

50 Las inmunoglobulinas preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden al menos dos sitios ligantes de antígeno, uniéndose el primer sitio a un primer epítipo y uniéndose el segundo sitio a un segundo epítipo.

De acuerdo con una realización preferida, la inmunoglobulina presente comprende al menos dos regiones de bucles, uniéndose la primera región de bucles a un primer epítipo y uniéndose la segunda región de bucles a un segundo epítipo. La al menos primera región de bucles o la al menos segunda región de bucles, o ambas, pueden contener un bucle estructural. Las inmunoglobulinas de acuerdo con la presente invención incluyen los fragmentos de las mismas, conocidos en la técnica por ser funcionales, que contienen los elementos esenciales de acuerdo con la presente invención: el bucle estructural o la región de bucles estructurales modificados de acuerdo con la presente invención.

60 La inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención comprende un dominio que tiene una homología de al menos 50 % con el dominio no modificado.

65 El término "homología" indica que los polipéptidos tienen restos iguales o conservados en una región correspondiente de su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término también abarca dos o más secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos homólogos.

"Dominio inmunoglobulínico homólogo" significa un dominio inmunoglobulínico de acuerdo con la invención que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 50 % con respecto a una secuencia de dominio inmunoglobulínico nativo de longitud completa o cualquier otro fragmento de una secuencia de dominio inmunoglobulínico de longitud completa como el aquí descrito. Preferiblemente, un dominio inmunoglobulínico homólogo tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 50 %, preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 55 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 60 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 65 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 70 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 75 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 85 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 %, con respecto a una secuencia de dominio inmunoglobulínico nativo o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de dominio inmunoglobulínico de longitud completa como la aquí descrita.

El "porcentaje ( %) de identidad de una secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de dominio inmunoglobulínico aquí identificadas se define como el porcentaje de restos de aminoácido de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido de la secuencia de dominio inmunoglobulínico específica, después de alinear la secuencia e introducir huecos, si fuera necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede ser llevado a cabo de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, tal como, por ejemplo, usando un software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento por todo lo largo de las secuencias que se comparan.

El porcentaje ( %) de los valores de identidad de secuencias de aminoácidos se puede obtener de la manera descrita más adelante utilizando el programa informático WU-BLAST-2 [Altschul et al., Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)]. La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se establecen con los valores por omisión. Aquellos que no se establecen con los valores por omisión, es decir, los parámetros ajustables, se establecen con los valores siguientes: tramo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11 y matriz de calificación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina el % del valor de identidad de secuencias de aminoácidos dividiendo (a) el número de restos de aminoácido idénticos por apareamiento entre la secuencia de aminoácidos del dominio inmunoglobulínico de interés que tiene una secuencia procedente del dominio inmunoglobulínico nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia con que se compara el dominio inmunoglobulínico de interés, que puede ser el dominio inmunoglobulínico no modificado), según se determina mediante WU-BLAST-2, por (b) el número total de restos de aminoácido de las partes no aleatorizadas del dominio inmunoglobulínico de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un polipéptido que comprende una secuencia A de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 80 % con la secuencia B de aminoácidos", la secuencia A de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés, y la secuencia B de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos del dominio inmunoglobulínico de interés.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de parejas ligantes que contiene:

- (a) una inmunoglobulina modificada que tiene un sitio ligante de antígenos extraño para la inmunoglobulina, incorporado a uno o más bucles estructurales, y
- (b) una molécula ligante que contiene un epítipo de dicho antígeno.

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

Como aquí se define, la potencia es la propiedad ligante de la molécula modificada con respecto a su antígeno. La unión puede ser cuantitativa y/o cualitativamente determinada en términos de especificidad y/o afinidad y/o aidez, como se utilizan con fines de control de calidad.

Las propiedades ligantes de las moléculas de acuerdo con la invención obtenidas tras modificación pueden ser adicionalmente afinadas mediante técnicas estándares, tal como la maduración de la afinidad. Por ello, la secuencia de nucleótidos dentro de, o que rodea, el sitio ligante de antígenos es adicionalmente cambiada para modular las propiedades ligantes.

Además, la molécula ligante de un kit de acuerdo con la presente invención puede ser usada para seleccionar la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención con la potencia apropiada de un banco que consiste en al menos 10, preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos 10.000, especialmente al menos 100.000, inmunoglobulinas con diferentes modificaciones en los bucles estructurales.

Ciertos ejemplos han mostrado que una de las características esenciales es alterar los dominios o regiones inmunoglobulínicas que no están normalmente implicados en las deseables funciones intrínsecas de un anticuerpo, tal como la unión a antígenos. De este modo, la modificación en regiones distintas de la región CDR, incluyendo los bucles adyacentes a los bucles de CDR, de un anticuerpo mantendría su función de unión a antígenos. Se ha observado que el pliegue específico de dominios inmunoglobulínicos permite la introducción de mutaciones aleatorias en regiones que son estructuralmente análogas a las CDRs pero diferentes en cuanto a posición y secuencia. Las regiones identificadas mediante la presente invención son, como las CDRs, regiones de bucles que conectan las hebras beta del pliegue inmunoglobulínico.

Más específicamente, se describe aquí que al introducir mutaciones, por ejemplo, mutaciones aleatorias en los bucles que conectan las hebras beta A-B y E-F de un dominio CH3 de IgG1 humana, se seleccionaron dominios CH3 mutados que se unen específicamente al péptido receptor 9 de tipo Toll (TLR-9; del inglés, Toll-like receptor 9) o a la lisozima de huevo de gallina, que son un péptido y una proteína, respectivamente, que no son normalmente reconocidos por dominios CH3 humanos de IgG1 ni se unen a ellos. Las mutaciones introducidas por nosotros incluyen mutaciones en que se sustituyeron restos de aminoácido seleccionados de la secuencia de tipo silvestre por restos aleatoriamente escogidos, y también incluyen inserciones de restos de aminoácido extra en los bucles anteriormente mencionados.

Por analogía, los dominios inmunoglobulínicos de cualquier clase de inmunoglobulinas y de inmunoglobulinas de cualquier especie son sensibles a este tipo de alteración. Además, no sólo se pueden manipular los bucles específicos a los que se dirige la presente invención sino que, del mismo modo, se puede manipular cualquier bucle que conecte hebras beta de dominios inmunoglobulínicos.

Se pueden producir dominios inmunoglobulínicos alterados de cualquier organismo y de cualquier clase de inmunoglobulina, de acuerdo con la presente invención, como tales (como dominios individuales) o como parte de una molécula más grande. Por ejemplo, pueden ser parte de una inmunoglobulina intacta, la cual, en consecuencia, tendría su región ligante de antígenos "normal" formada por las 6 CDRs y la nueva región ligante de antígenos alterada. Así, se podría generar una inmunoglobulina multiespecífica, por ejemplo, biespecífica. Los dominios inmunoglobulínicos alterados pueden ser también parte de cualquier proteína de fusión. El uso de estos dominios inmunoglobulínicos alterados está en el campo general del uso de inmunoglobulinas.

Salvo donde se indica otra cosa, toda la numeración de las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas es de acuerdo con el esquema de numeración del sistema de información internacional ImMunoGeneTics (IMGT, [system@imgt.cines.fr](mailto:system@imgt.cines.fr); <http://imgt.cines.fr>; Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212; Ruiz et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28: 219-221; Lefranc et al., 2001, Nucleic Acids Res. 29: 207-209; Lefranc et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31: 307-310; Lefranc et al., 2005, Dev. Comp. Immunol. 29: 185-203).

SEC ID N° 1

**PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG  
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGKAAA**

SEC ID N° 2

**ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgtgac gagctcnnsn nsnnscagt  
cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag  
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaage  
ttaccgtgnn snnsnnsagg tggnsnnsnsg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca  
caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctccgggt aaagcgccg ca  
//**

SEC ID N° 3

**MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDG  
DGSFFFLYSKLTVXXXRWXXGNVFSQSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGKAAA**

SEC ID N° 4

**cttgccatgg cccccgaga accacaggtg tac**

SEC ID Nº 5  
**agtcgagctc gtcacgggat gggggcaggg**

5 SEC ID Nº 6  
**gtacgagctc nnñnsnñsc aagtcagcct gacctgcctg g**

SEC ID Nº 7  
**tgccaagctt gctgtagagg aagaaggagc cg**

10 SEC ID Nº 8  
**tgccaagctt accgtgnñsn nñsnñsaggtg gñsnñnsggg aacgtcttct catgctccg**

15 SEC ID Nº 9  
**agttgcggcc gctttaccgc gagacagggg gag**

SEC ID Nº 10  
**MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK  
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXRWXXGNVFSCSV  
 MHEALHNHYTQKLSLSLSPGKAAA**

20 SEC ID Nº 11  
**ccatggcccc cggagaacca caggtgtaca ccttgcccc atcccgtagc gagctcññsn nñññscaagt  
 cagcctgacc tgcctggtea aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag  
 cgggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact cggacggctc cttcttctc tacagcaagc  
 ttaccgtgnñ sññññññññ nññññññññ gññññññññ gaaagctctc tcatgctccg tgatgcatga  
 ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg tctccgggta aagcggccgc a**

SEC ID Nº 12  
**tgccaagctt accgtgnñsn nññññññññ sññññññññ aagtggtgg nññññññññ aagctcttctc  
 atgctccg**

25 SEC ID Nº 13  
**MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK  
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXRWXXGNVFSCSV  
 MHEALHNHYTQKLSLSLSPGKAAA**

30 SEC ID Nº 14  
**ccatggcccc cggagaacca caggtgtaca ccttgcccc atcccgtagc gagctcññsn nñññscaagt  
 cagcctgacc tgcctggtea aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag  
 cgggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact cggacggctc cttcttctc tacagcaagc  
 ttaccgtgnñ sññññññññ nññññññññ nsaggtggññ sñññgggaac gtctctctcat gctccgtgat  
 gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaagc ggccgca**

SEC ID Nº 15  
**tgccaagctt accgtgnñsn nññññññññ sññññññññ aagtggnñsn nsgggaacgt  
 cttctctatgc tccg**

35 Ejemplo 1: Construcción del banco de CH3 y presentación en la superficie de fagos

Para facilitar el diseño del dominio CH3 mutado, se usó la estructura cristalina de un fragmento Fc de IgG1, que está publicada en la base de datos Brookhaven como entrada 1OQO.pdb.

40 La secuencia que se utilizó como base para la construcción del banco de CH3 se proporciona en la ID. SEC. nº 1. En esta secuencia, el primer aminoácido corresponde a la prolina 343 de la cadena A de la entrada 1oqo.pdb de la base de datos Brookhaven. El último resto contenido en 1oqo.pdb es la serina 102 de la ID. SEC. nº 1. Después del análisis detallado de la estructura de 1oqo.pdb y la inspección visual de los restos que forman los bucles que conectan las hebras beta, se decidió aleatorizar los restos 17, 18 y 19, que son parte del bucle que conecta la hebra beta A-B, así como los 71, 72, 73, 76 y 77, que son parte del bucle que conecta la hebra beta E-F de la ID. SEC. nº 1. Se produjo el gen alterado mediante una serie de reacciones PCR seguida de la ligación de los productos de PCR resultantes. Para facilitar la ligación, algunos de los codones de la secuencia de nucleótidos que codifica la ID. SEC.

nº 1 fueron modificados para producir sitios de restricción sin cambiar las secuencias de aminoácidos (mutaciones silenciosas). Para la inserción en el vector de clonación pHEN1 [Nucleic Acids Res., 11 de agosto de 1991, 19 (15): 4133-7, "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains", H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson y G. Winter] en marco con la señal de secreción pelB, se fijaron restos de nucleótidos extra que codifican Met-Ala al extremo 5' de la secuencia para crear un sitio de restricción para *NcoI*. Para los restos aleatorizados, se escogió el codón NNS (código de la IUPAC, en que S significa C o G), que codifica los 20 aminoácidos presentes en la naturaleza pero evita 2 de 3 codones de parada. La secuencia alterada se proporciona como una secuencia de nucleótidos en la ID. SEC. nº 2 y como una secuencia de aminoácidos en la ID. SEC. nº 3. En la ID. SEC. nº 3, la letra X significa restos de aminoácido aleatorizados. Las ID. SEC. números 4 a 9 proporcionan las secuencias de los cebadores de PCR usados para la ensambladura del dominio CH3 mutado.

Como molde para las reacciones PCR se usó cDNA de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3D6 [M. Felgenhauer, J. Kohl y F. Rücker, "Nucleotide Sequences of the cDNAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody específico to HIV-1-gp41", Nucleic Acids Res., 25 de agosto de 1990, 18 (16): 4927]. Los 3 productos de PCR fueron respectivamente digeridos con *SacI* y/o *HindIII* y fueron ligados entre sí. El producto de ligación fue adicionalmente digerido con *NcoI* y *NotI* y fue ligado en el vector fagómico pHen1 para presentación superficial, que había sido previamente digerido con *NcoI* y *NotI*. Se controlaron diversos clones seleccionados mediante análisis de restricción y secuenciación de DNA y se halló que contenían el inserto como se había planeado, incluyendo las secuencias aleatorizadas correctamente insertadas. Para las siguientes operaciones de la preparación del fago se siguieron protocolos estándares. En resumen, se transformaron células *E. coli* TG1 con la mezcla de ligación mediante electroporación. Posteriormente, las partículas de fago fueron rescatadas de las células *E. coli* TG1 con el fago auxiliar M13-KO7. Las partículas de fago fueron luego precipitadas del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en dos etapas, disueltas en agua y usadas para selección mediante "panning" o, alternativamente, almacenadas a -80 °C.

Ejemplo 2: Construcción del banco de CH3+3

Este banco se construyó y clonó de la misma forma que el banco de CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción se proporciona en la ID. SEC. nº 10 y la correspondiente secuencia de nucleótidos en la ID. SEC. nº 11, y los cebadores usados para la construcción fueron las ID. SEC. números 4-7, la ID. SEC. nº 9 y la ID. SEC. nº 12.

Ejemplo 3: Construcción del banco de CH3+5

El banco fue construido y clonado del mismo modo que el banco de CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción se proporciona en la ID. SEC. nº 13 y la correspondiente secuencia de nucleótidos en la ID. SEC. nº 14, y los cebadores utilizados para la construcción fueron las ID. SEC. números 4-7, la ID. SEC. nº 9 y la ID. SEC. nº 15.

Ejemplo 4: Construcción de un banco de CH1

En el banco de CH1 de IgG1 humana, se aleatorizaron Ser93, Ser94, Ser95, Gly98, Thr99 y Gln100 y se insertaron adicionalmente 3 restos aleatorios utilizando mutagénesis aleatoria dirigida al sitio. No se mutó Leu96. En otro banco de CH1 de IgG1 humana, se aleatorizaron Pro92, Ser93, Ser94, Ser95, Leu96, Thr101, Gly98, Thr99 y Gln100 y se insertaron adicionalmente 3 restos aleatorios utilizando mutagénesis aleatoria dirigida al sitio. Los genes que codificaban los bancos fueron clonados en marco con la secuencia líder pelB en el extremo N y en marco con la proteína III del fago fd en el extremo C usando los sitios de restricción *NcoI* y *NotI* del vector fagómico pHEN1. La preparación de partículas de fago, el panning y la selección de clones específicamente ligantes se llevaron a cabo usando procedimientos estándares.

Secuencias del banco:

Secuencia de nucleótidos del primer banco de CH1:

```

1 GCCTCCACCA AGGCCCCATC GGTCTCCCC CTGGCACCCT CCTCCAAGG CACCTCTGGG GGCACAGCG CCGTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC
101 CCGAACCCGGT GACGGTGTGC TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGGGTG CACACCTTCC CCGCTGTCTT ACAGTCTCTA GGACTCTACT CCTCAGCAG
201 CCGGGTGACC GTGCCCHNEN NSUNSTGIDN SNNNSNNNS NNNSNSACCT ACATCTGCAA CGTGAATCAC AAGCCACGA ACACCAAGGT GGACAAAGAA
301 GTTAGCCCCA AATCTGCGGC CGCA
    
```

Secuencia de aminoácidos del primer banco de CH1:

```

MKYLLPTAAGLLLLAAGPAAASTKGPSVFELAPSSKETSQGTAAALCLVEDYFPEPVTVSNHSEALTSQVNTFFAVLQSSGLYELSEVVVTVPPCKLXKXKXKTYICNVNHNKPSNTKVDK
KVEPKSAAA
    
```

Secuencia de nucleótidos del segundo banco de CH1:

```

1 GCCTCCACCA AGGCCCCATC GGTCTCCCC CTGGCACCCT CCTCCAAGG CACCTCTGGG GGCACAGCG CCGTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC
101 CCGAACCCGGT GACGGTGTGC TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGGGTG CACACCTTCC CCGCTGTCTT ACAGTCTCTA GGACTCTACT CCTCAGCAG
201 CCGGGTGACC GTGCCCHNEN NSUNSTGIDN SNNNSNNNS NNNSNSACCT ACATCTGCAA CGTGAATCAC AAGCCACGA ACACCAAGGT GGACAAAGAA
301 GTTAGCCCCA AATCTGCGGC CGCA
    
```

Secuencia de aminoácidos del segundo banco de CHI:

ASTKGFVFPPLAP55K875GGTAALGCLVXDYFPEPVTVSMNSGAL75GVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVAQOOOQOOOXXXYICNVNHHKPSHTKVDKIVKPKSAAA

Ejemplo 4: Construcción de un banco de CL

5 En el banco de CL de IgG1 humana, se aleatorizaron Ser92, Lys93, Ala94, Asp95, Glu97, Lys98 e His99 y se insertaron adicionalmente 3 restos aleatorios entre Ser16 y Gly17 utilizando mutagénesis aleatoria dirigida al sitio. Los genes que codificaban los bancos fueron clonados en marco con la secuencia líder pelB en el extremo N y en marco con la proteína III del fago fd en el extremo C usando los sitios de restricción *NcoI* y *NotI* del vector fagómico pHEN1. La preparación de partículas de fago, el panning y la selección de clones específicamente ligantes se llevaron a cabo usando procedimientos estándares.

Secuencia de nucleótidos del banco de CL:

1 GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTWNSNM NMSGGAAGTC CCTCTGTGTG GTCCCTGCTG AATACTICT  
101 ATCCAGAGA GGCAGAGTA CAGTGGAGG TGGATAACG CCTCCAACTG GGTAACTCC AGGAGAGTGT CACAGAGCG GACAGCAAGG ACAGCACCTA  
201 CAGCCTCAGG TCGACCTGA CCTGNSNM SWSNSHTAC NNSNSNNSA AAGTCTAGC CAGCAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCGTCACA  
301 AAQAGCTTCA ACAGGGGAGA G

Secuencia de aminoácidos del banco de CL:

VAAFSVTFPFSDEQLKNSXQKGTASVCLLNMFYPRKAVQNKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLASLTLTKKCKYKXKXVYACEVTRHQLGLESFVTKSENRRGE

Ejemplo 5: Panning del banco de CH3 - fago sobre el péptido Rp10-L

20 Se llevaron a cabo 3 ciclos de panning. Placas activadas con maleimida (Pierce) fueron revestidas con el péptido sintético Rp10-L, que representa un mimótopo del marcador molecular CD20 de células B [Perosa et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. (2005) 51: 672-83]. Su deducida secuencia de aminoácidos es la siguiente: ITPWPHWLERSS. Se añadieron 200 µl de la solución siguiente por pocillo: PBS, pH = 7,2, con las siguientes concentraciones de péptido disuelto:

- 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 100 µg/ml
- 2<sup>o</sup> ciclo de panning: 100 µg/ml
- 3<sup>er</sup> ciclo de panning: 50 µg/ml.

Se realizó una incubación durante la noche a 4 °C, lo que fue seguido de un bloqueo con 10 µg/ml de cisteína-HCl en PBS, con 200 µl por pocillo durante 2 horas a temperatura ambiental.

Luego se dejó que el banco de fago para presentación superficial, que contenía concentraciones iguales de fago de los bancos CH3, CH3+3, CH3+5 y CH3+7, reaccionara con el péptido unido añadiendo la suspensión de fago y BSA al 2 %-PBS hasta 200 µl, lo que fue seguido de una incubación durante 45 minutos con sacudimiento y 90 minutos sin sacudimiento a temperatura ambiental.

Las partículas de fago no unidas fueron separadas por lavado del modo siguiente:

- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 15 x 200 µl de T-PBS, 5 x 200 µl de T-PBS
- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 15 x 200 µl de T-PBS, 10 x 200 µl de T-PBS
- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 20 x 200 µl de T-PBS, 20 x 200 µl de T-PBS.

La elución de las partículas unidas se llevó a cabo añadiendo 200 µl de glicocola 0,1 M, pH = 2,2, por pocillo e incubando con sacudimiento durante 30 minutos a temperatura ambiental. Posteriormente, la suspensión de fago fue neutralizada mediante la adición de 60 µl de Tris base 2 M, lo que fue seguido de la infección de células *E. coli* TG1 por mezclamiento de 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se sembraron las bacterias infectadas en placas de medio TYE con glucosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 30 °C durante la noche.

**Resultados del panning del banco de CH3 - fago sobre el péptido Rp10-L**

Títulos de fago

| Ciclo de panning | Concentración de RP10-L | Entrada (fago/ml)     | Salida (fago/ml)     |
|------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1 <sup>o</sup>   | 100 µg/ml               | 2x10 <sup>14</sup>    | 2x10 <sup>10</sup>   |
| 2 <sup>o</sup>   | 100 µg/ml               | 3x10 <sup>17</sup>    | 3x10 <sup>10</sup>   |
| 3 <sup>o</sup>   | 50 µg/ml                | 6,02x10 <sup>14</sup> | 1,5x10 <sup>10</sup> |

Ejemplo 6: Clonación de clones seleccionados para expresión soluble

Las secuencias que codificaban el dominio CH3 alterado, contenidas dentro de partículas de fago eluidas, fueron discontinuamente multiplicadas por PCR. Después de una restricción con *NcoI* y *NotI*, fueron insertadas en pNOTBAD (vector pBAD de Invitrogen con el sitio *NotI* posteriormente insertado). Después de la transformación de *E. coli* E104 con ellas, se seleccionaron las células en medio TYE con glucosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina a 30 °C.

**Expresión soluble de clones seleccionados y exploración**

Se cultivaron 4 x 96 colonias resistentes a ampicilina en 200 µl de medio 2xYT con ampicilina en placas de microtitulación sobre un dispositivo sacudidor durante la noche a 30 °C. Luego fueron estimuladas con L-arabinosa añadida en una concentración final de 0,1 %. Después de otra incubación durante la noche, se recogieron las células por centrifugación durante 15 minutos a 2000 rpm y temperatura ambiental y se liberaron sus proteínas periplásmicas mediante resuspensión en 100 µl de tampón de borato sódico (borato sódico 160 mM, NaCl 200 mM, pH = 8,0) e incubación durante al menos 6 horas.

Para la exploración, 4 placas de maleimida fueron revestidas con 100 µg/ml de una solución de 50 µg/ml de péptido Rp10-L disuelto en PBS, pH = 7,2, durante la noche a 4 °C. Las placas fueron luego bloqueadas con 10 µg/ml de cisteína-HCl en PBS, con 200 µl por pocillo, durante 2 horas a temperatura ambiental.

Luego se dejó que la proteína periplásmica liberada reaccionase con el péptido unido añadiendo 50 µl de lisado y 50 µl de BSA al 2 %-PBS, lo que fue seguido de una incubación durante la noche a temperatura ambiental.

La unión de la proteína etiquetada con his fue revelada mediante una incubación de 90 minutos con 100 µl por pocillo de una solución de anticuerpos contra tetra-his (QIAgen), diluidos a 1:1000 en BSA al 1 %-PBS, y una incubación de 90 minutos con 100 µl por pocillo de una solución de anticuerpos anti-ratón generados en cabra y marcados con HRP (Sigma), diluidos a 1:1000 en BSA al 1 %-PBS. Se observaron señales después de la adición del sustrato OPD (3 mg/ml) en tampón de fosfato/citrato sódico, pH = 4,5, y 0,4 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25 M.

**Resultados de la exploración en cuanto a la unión de Rp10-L en un solo pocillo por clon**

| Clon     | A21   | A57   | B63   | B78   | C50   | C55   | D5    | D37   | D39   | D80   | D83   | D91   |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A492/620 | 0,395 | 0,039 | 0,063 | 0,075 | 0,190 | 0,045 | 0,644 | 0,071 | 0,448 | 0,077 | 0,426 | 0,142 |

Reacción de fondo

| Placa | A492/620 |
|-------|----------|
| A     | 0,027    |
| B     | 0,035    |
| C     | 0,037    |
| D     | 0,035    |

Los clones que revelaban una señal positiva fueron cultivados en 20 ml de 2xYT con ampicilina a 30 °C durante la noche. Luego se inocularon a 1:20 en medio fresco y, después de 3 horas a 30 °C, se estimularon con L-arabinosa en una concentración final de 0,1 %, y se dejó que expresaran el dominio CH3 recombinante durante la noche a 16 °C. Luego se lisó el periplasma de las células expresivas en 1 ml de tampón de borato sódico, pH = 8,0, durante un mínimo de 6 horas. Se dejó que el extracto periplásmico reaccionara con el péptido Rp10-L y se reveló la unión exactamente del modo anteriormente descrito.

**Resultados de la exploración en cuanto a la unión de Rp10-L**

| clon         | A21   | A57   | B63   | B78   | C50   | C55   | D5    | D37   | D39   | D80   | D83   | D91   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Rp10-L mg/ml |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| -            | 0,265 | 0,006 | 0,006 | 0,005 | 0,803 | 0,006 | 0,035 | 0,006 | 0,469 | 0,004 | 0,088 | 0,009 |

|      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0,81 | 0,362 | 0,005 | 0,007 | 0,006 | 1,202 | 0,008 | 0,052 | 0,008 | 0,660 | 0,007 | 0,106 | 0,009 |
| 1,63 | 0,383 | 0,006 | 0,007 | 0,006 | 1,308 | 0,014 | 0,050 | 0,014 | 0,719 | 0,008 | 0,129 | 0,005 |
| 3,13 | 0,352 | 0,008 | 0,010 | 0,005 | 1,453 | 0,006 | 0,060 | 0,006 | 0,719 | 0,008 | 0,210 | 0,006 |
| 6,25 | 0,343 | 0,005 | 0,008 | 0,006 | 1,516 | 0,007 | 0,057 | 0,007 | 0,694 | 0,006 | 0,114 | 0,008 |
| 12,5 | 0,315 | 0,007 | 0,009 | 0,006 | 1,495 | 0,007 | 0,064 | 0,007 | 0,770 | 0,007 | 0,130 | 0,009 |
| 25,0 | 0,335 | 0,008 | 0,010 | 0,008 | 1,603 | 0,009 | 0,063 | 0,009 | 0,868 | 0,008 | 0,120 | 0,007 |
| 50,0 | 0,398 | 0,009 | 0,011 | 0,009 | 1,632 | 0,009 | 0,070 | 0,009 | 0,765 | 0,008 | 0,125 | 0,008 |

**Clonación de clones seleccionados para expresión soluble en pET27b**

5 Las secuencias que codificaban el dominio CH3 alterado, contenidas dentro de clones que producían una señal significativa con respecto a la unión a Rp10-L, fueron multiplicadas por PCR. Después de una restricción con *NcoI* y *NotI*, fueron insertadas en pET27b (Novagen). Después de la transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con ellas, las células transformadas fueron seleccionadas en medio TYE con glucosa al 1 % y 50 µg/ml de kanamicina a 30 °C.

10 Los clones que revelaban una señal positiva fueron cultivados en 20 ml de medio M9ZB con glucosa al 2 % y kanamicina a 30 °C durante la noche. Luego se inocularon a 1:20 en medio fresco y, después de 3 horas a 30 °C, se estimularon con medio que contenía glicerol al 1 % en lugar de glucosa, kanamicina e IPTG 1 mM, y se dejó que expresaran el dominio CH3 recombinante durante la noche a 16 °C. Luego se lisó el periplasma de las células expresivas en 1 ml de tampón de borato sódico, pH = 8,0, durante un mínimo de 6 horas. Se analizó el extracto periplásmico en cuanto a la presencia de proteína recombinante mediante transferencia Western y detección con anticuerpos anti-tetra-his (QIAgen).

15

**Secuencias de nucleótidos y secuencias proteicas inferidas de clones que se unen a CD-20**

| Clon  | 1 <sup>er</sup> grupo | 2 <sup>o</sup> grupo | 3 <sup>er</sup> grupo | Banco fuente |
|-------|-----------------------|----------------------|-----------------------|--------------|
| A21   | VDG                   | PWGPRD               | WP                    | CH3+3        |
| C50 * | LTH                   | ALCRWF               | VQ                    | CH3+3        |
| D5    | ALR                   | FCGGVV               | GL                    | CH3+3        |
| D39   | GWW                   | QKPFPA               | TD                    | CH3+3        |
| D83   | APP                   | DLVHVA               | MV                    | CH3+3        |

\*una inserción de 2 nucleótidos en el 2<sup>o</sup> grupo de restos mutados provoca una inserción de G entre restos de otro modo constantes R y W que separan los grupos 2<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> de restos mutados.

20 Secuencia proteica del clon D83 del banco de CH3+3 específico de CD20 (numeración IMGT)

15-17

92-94

MAPREPQVYTLPPSRDELAPPQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DLV

97-98

HVARWVGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA

**Análisis de la unión de CD20, expresado en células, usando FACS**

25 Se lavaron aproximadamente 10<sup>5</sup> células Daudi con PBS (800 rpm, 5 minutos, temperatura ambiental) y se dejó que el dominio CH3 recombinante, en BSA al 1 %-PBS, se uniera durante 2 horas sobre hielo. Se lavaron de nuevo las células con PBS y se dejó que reaccionaran con 2 µg/ml de anticuerpo Alexa Fluor 488 anti-penta-His (QIAgen), diluido en BSA al 1 %-PBS, durante 30 minutos sobre hielo. Después del lavado, se analizaron las células por FACS. Como testigos, se usaron células no marcadas, el dominio CH3 de tipo silvestre y la línea celular K562.

30

**Ejemplo 7: Aislamiento de proteínas mutantes en CH1 que se unen al antígeno CD20**

Se llevaron a cabo 3 ciclos de panning. Placas activadas con maleimida (Pierce) fueron revestidas con un péptido sintético que representa un mimótopo del marcador molecular CD20 de células B. Se añadieron 200 µl de la solución siguiente por pocillo: PBS, pH = 7,2, con las siguientes concentraciones de péptido disuelto:

- 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 100 µg/ml
- 2<sup>o</sup> ciclo de panning: 100 µg/ml
- 3<sup>er</sup> ciclo de panning: 50 µg/ml.

Se realizó una incubación durante la noche a 4 °C, lo que fue seguido de un bloqueo con 10 µg/ml de cisteína-HCl en PBS, con 200 µl por pocillo durante 2 horas a temperatura ambiental.

Luego se dejó que el banco de fago para presentación superficial, que presentaba el dominio CH1 mutado, reaccionara con el péptido unido añadiendo la suspensión de fago y BSA al 2 %-PBS hasta 200 µl, lo que fue seguido de una incubación durante 45 minutos con sacudimiento y 90 minutos sin sacudimiento a temperatura ambiental.

Las partículas de fago no unidas fueron separadas por lavado del modo siguiente:

- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 10 x 200 µl de T-PBS, 5 x 200 µl de T-PBS
- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 15 x 200 µl de T-PBS, 10 x 200 µl de T-PBS
- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 20 x 200 µl de T-PBS, 20 x 200 µl de T-PBS.

La elución de las partículas unidas se llevó a cabo añadiendo 200 µl de glicocola 0,1 M, pH = 2,2, por pocillo e incubando con sacudimiento durante 30 minutos a temperatura ambiental. Posteriormente, la suspensión de fago fue neutralizada mediante la adición de 60 µl de Tris base 2 M, lo que fue seguido de la infección de células *E. coli* TG1 por mezclamiento de 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se sembraron las bacterias infectadas en placas de medio TYE con glucosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 30 °C durante la noche.

**Resultados del panning del banco de CH1 - fago sobre el péptido Rp10-L**

Títulos de fago

| Ciclo de panning | Concentración de RP10-L | Entrada (fago/ml)     | Salida (fago/ml)      |
|------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 <sup>o</sup>   | 100 µg/ml               | 5,6x10 <sup>13</sup>  | 1,6x10 <sup>10</sup>  |
| 2 <sup>o</sup>   | 100 µg/ml               | 4,04x10 <sup>14</sup> | 8,55x10 <sup>8</sup>  |
| 3 <sup>o</sup>   | 50 µg/ml                | 3,53x10 <sup>14</sup> | 1,19x10 <sup>12</sup> |

**Clonación de clones seleccionados para expresión soluble**

Las secuencias que codificaban el dominio CH1 alterado, contenidas dentro de partículas de fago eluidas, fueron discontinuamente multiplicadas por PCR. Después de una restricción con *NcoI* y *NotI*, fueron insertadas en pNOTBAD (vector pBAD de Invitrogen con el sitio *NotI* posteriormente insertado). Después de la transformación de *E. coli* E104 con ellas, se seleccionaron las células en medio TYE con glucosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina a 30 °C.

Expresión soluble de clones seleccionados y exploración

Se cultivaron 4 x 96 colonias resistentes a ampicilina en 200 µl de medio 2xYT con ampicilina en placas de microtitulación sobre un dispositivo sacudidor durante la noche a 30 °C. Luego fueron estimuladas con L-arabinosa añadida en una concentración final de 0,1 %. Después de otra incubación durante la noche, se recogieron las células por centrifugación durante 15 minutos a 2000 rpm y temperatura ambiental y se liberaron sus proteínas periplásmicas mediante resuspensión en 100 µl de tampón de borato sódico (borato sódico 160 mM, NaCl 200 mM, pH = 8,0) e incubación durante al menos 6 horas.

Para la exploración, 4 placas de maleimida fueron revestidas con 100 µg/ml de una solución de 50 µg/ml de péptido Rp10-L disuelto en PBS, pH = 7,2, durante la noche a 4 °C. Las placas fueron luego bloqueadas con 10 µg/ml de cisteína-HCl en PBS, con 200 µl por pocillo, durante 2 horas a temperatura ambiental.

## ES 2 539 593 T3

Luego se dejó que la proteína periplásmica liberada reaccionase con el péptido unido añadiendo 50 µl de lisado y 50 µl de BSA al 2 %-PBS, lo que fue seguido de una incubación durante la noche a temperatura ambiental.

5 La unión de la proteína etiquetada con his fue revelada mediante una incubación de 90 minutos con 100 µl por pocillo de una solución de anticuerpos contra tetra-his (QIAgen), diluidos a 1:1000 en BSA al 1 %-PBS, y una incubación de 90 minutos con 100 µl por pocillo de una solución de anticuerpos anti-ratón generados en cabra y marcados con HRP (Sigma), diluidos a 1:1000 en BSA al 1 %-PBS. Se observaron señales después de la adición del sustrato OPD (3 mg/ml) en tampón de fosfato/citrato sódico, pH = 4,5, y 0,4 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25 M.

10

### Resultados de la exploración en cuanto a la unión de Rp10-L en un solo pocillo por clon

|          |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Clon     | A13   | A79   | A96   | B6    | B17   | B19   | B21   | B23   |
| A492/620 | 0,027 | 0,353 | 0,023 | 0,038 | 0,036 | 0,037 | 0,032 | 0,035 |
| Clon     | C14   | C45   | C49   | C68   | C79   | C81   | D36   | D82   |
| A492/620 | 0,025 | 0,021 | 0,044 | 0,025 | 0,051 | 0,021 | 0,027 | 0,086 |

### Reacción de fondo

|       |                      |
|-------|----------------------|
| Placa | A <sub>492/620</sub> |
| A     | 0,008                |
| B     | 0,012                |
| C     | 0,015                |
| D     | 0,015                |

15

Los clones que revelaban una señal positiva fueron cultivados en 20 ml de 2xYT con ampicilina a 30 °C durante la noche. Luego se inocularon a 1:20 en medio fresco y, después de 3 horas a 30 °C, se estimularon con L-arabinosa en una concentración final de 0,1 %, y se dejó que expresaran el dominio CH1 recombinante durante la noche a 16 °C. Luego se lisó el periplasma de las células expresivas en 1 ml de tampón de borato sódico, pH = 8,0, durante un mínimo de 6 horas. Se dejó que el extracto periplásmico reaccionara con el péptido Rp10-L y se reveló la unión exactamente del modo anteriormente descrito.

20

### Resultados de la exploración en cuanto a la unión de Rp10-L

|      |        |        |      |       |        |
|------|--------|--------|------|-------|--------|
| Clon | +      | -      | Clon | +     | -      |
| A13  | -0,002 | -0,006 | C14  | 0,015 | 0,017  |
| A79  | 0,004  | 0,001  | C45  | 0,004 | 0,001  |
| A96  | 0,010  | 0,006  | C49  | 0,005 | -0,001 |
| B6   | 0,004  | 0,001  | C68  | 0,003 | 0,001  |
| B17  | 0,002  | 0,007  | C79  | 0,005 | 0,002  |
| B19  | -0,002 | 0,007  | C81  | 0,004 | 0,002  |
| B21  | 0,002  | 0,001  | D36  | 0,029 | 0,019  |
| B23  | 0,055  | 0,020  | D62  | 0,137 | 0,126  |

25

**Clonación de clones seleccionados para expresión soluble en pET27b**

Las secuencias que codificaban el dominio CH1 alterado, contenidas dentro de clones que producían una señal significativa con respecto a la unión a Rp10-L, fueron multiplicadas por PCR. Después de una restricción con *NcoI* y *NotI*, fueron insertadas en pET27b (Novagen). Después de la transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con ellas, las células transformadas fueron seleccionadas en medio TYE con glucosa al 1 % y 50 µg/ml de kanamicina a 30 °C. Los clones que revelaban una señal positiva fueron cultivados en 20 ml de medio M9ZB con glucosa al 2 % y kanamicina a 30 °C durante la noche. Luego se inocularon a 1:20 en medio fresco y, después de 3 horas a 30 °C, se estimularon con medio que contenía glicerol al 1 % en lugar de glucosa, kanamicina e IPTG 1 mM, y se dejó que expresaran el dominio CH1 recombinante durante la noche a 16 °C. Luego se lisó el periplasma de las células expresivas en 1 ml de tampón de borato sódico, pH = 8,0, durante un mínimo de 6 horas. Se analizó el extracto periplásmico en cuanto a la presencia de proteína recombinante mediante transferencia Western y detección con anticuerpos anti-tetra-his (QIAgen).

15 Secuencia de CH1 SMID específico de CD20, clone C45

```

LOCUS      C45      324 bp ds-DNA      SYN      4-JUL-2006
1  gctctccacca agggcccctc gttcttccc ctggcccct cctccaagag cactctggg
61  ggcacagcag cctgggcty cctggtcag gactactcc ccgaaccggt gacgggtgcg
121  tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacacctcc cggctgtect gcgctcctc
181  ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gggcccctc tgggtgttgg tgggcctctc
241  gtctgtact acatctgca egtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaaagaa
301  gtbtagccca aatctgcggc cgt

//
ENTRADA      C45
              5      10      15      20      25      30
1  A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K
31  D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V R T F P A V L Q S S
61  G L Y S L S S V V T V A P L G V G H L V L K Y I C N V N H
91  K P S N T K V D K K V E P K S A A A
    
```

20 **Análisis de la unión de CD20, expresado en células, usando FACS**

Se lavaron aproximadamente 10<sup>5</sup> células Daudi con PBS (800 rpm, 5 minutos, temperatura ambiental) y se dejó que el dominio CH3 recombinante, en BSA al 1 %-PBS, se uniera durante 2 horas sobre hielo. Se lavaron de nuevo las células con PBS y se dejó que reaccionaran con 2 µg/ml de anticuerpo Alexa Fluor 488 anti-penta-His (QIAgen), diluido en BSA al 1 %-PBS, durante 30 minutos sobre hielo. Después del lavado, se analizaron las células por FACS. Como testigos, se usaron células no marcadas, el dominio CH1 de tipo silvestre y la línea celular K562.

Ejemplo 8: Aislamiento de proteínas mutantes en CL que se unen al antígeno CD20

30 Se llevaron a cabo 3 ciclos de panning. Placas activadas con maleimida (Pierce) fueron revestidas con un péptido sintético que representa un mimótopo del marcador molecular CD20 de células B. Se añadieron 200 µl de la solución siguiente por pocillo: PBS, pH = 7,2, con las siguientes concentraciones de péptido disuelto:

- 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 100 µg/ml
- 2<sup>o</sup> ciclo de panning: 100 µg/ml
- 3<sup>er</sup> ciclo de panning: 50 µg/ml.

Se realizó una incubación durante la noche a 4 °C, lo que fue seguido de un bloqueo con 10 µg/ml de cisteína-HCl en PBS, con 200 µl por pocillo durante 2 horas a temperatura ambiental.

Luego se dejó que el banco de fago para presentación superficial, que presentaba el dominio CL mutado, reaccionara con el péptido unido añadiendo la suspensión de fago y BSA al 2 %-PBS hasta 200 µl, lo que fue seguido de una incubación durante 45 minutos con sacudimiento y 90 minutos sin sacudimiento a temperatura ambiental.

Las partículas de fago no unidas fueron separadas por lavado del modo siguiente:

- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 10 x 200 µl de T-PBS, 5 x 200 µl de T-PBS
- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 15 x 200 µl de T-PBS, 10 x 200 µl de T-PBS
- después del 1<sup>er</sup> ciclo de panning: 20 x 200 µl de T-PBS, 20 x 200 µl de T-PBS.

La elución de las partículas unidas se llevó a cabo añadiendo 200 µl de glicocola 0,1 M, pH = 2,2, por pocillo e incubando con sacudimiento durante 30 minutos a temperatura ambiental. Posteriormente, la suspensión de fago fue neutralizada mediante la adición de 60 µl de Tris base 2 M, lo que fue seguido de la infección de células *E. coli* TG1 por mezclamiento de 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se sembraron las bacterias infectadas en placas de medio TYE con glucosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 30 °C durante la noche.

**Resultados del panning del banco de CL - fago sobre el péptido Rp10-L**

Títulos de fago

| Ciclo de panning | Concentración de RP10-L | Entrada (fago/ml)     | Salida (fago/ml)      |
|------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1º               | 100 µg/ml               | 2,8x10 <sup>13</sup>  | 3,6x10 <sup>7</sup>   |
| 2º               | 100 µg/ml               | 4,29x10 <sup>14</sup> | 6,88x10 <sup>9</sup>  |
| 3º               | 50 µg/ml                | 1x10 <sup>15</sup>    | 6,54x10 <sup>11</sup> |

5

**Clonación de clones seleccionados para expresión soluble**

Las secuencias que codificaban el dominio CL alterado, contenidas dentro de partículas de fago eluidas, fueron discontinuamente multiplicadas por PCR. Después de una restricción con *NcoI* y *NotI*, fueron insertadas en pNOTBAD (vector pBAD de Invitrogen con el sitio *NotI* posteriormente insertado). Después de la transformación de *E. coli* E104 con ellas, se seleccionaron las células en medio TYE con glucosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina a 30 °C.

10

**Expresión soluble de clones seleccionados y exploración**

15

Se cultivaron 4 x 96 colonias resistentes a ampicilina en 200 µl de medio 2xYT con ampicilina en placas de microtitulación sobre un dispositivo sacudidor durante la noche a 30 °C. Luego fueron estimuladas con L-arabinosa añadida en una concentración final de 0,1 %. Después de otra incubación durante la noche, se recogieron las células por centrifugación durante 15 minutos a 2000 rpm y temperatura ambiental y se liberaron sus proteínas periplásmicas mediante resuspensión en 100 µl de tampón de borato sódico (borato sódico 160 mM, NaCl 200 mM, pH = 8,0) e incubación durante al menos 6 horas.

20

Para la exploración, 4 placas de maleimida fueron revestidas con 100 µg/ml de una solución de 50 µg/ml de péptido Rp10-L disuelto en PBS, pH = 7,2, durante la noche a 4 °C. Las placas fueron luego bloqueadas con 10 µg/ml de cisteína-HCl en PBS, con 200 µl por pocillo, durante 2 horas a temperatura ambiental.

25

Luego se dejó que la proteína periplásmica liberada reaccionase con el péptido unido añadiendo 50 µl de lisado y 50 µl de BSA al 2 %-PBS, lo que fue seguido de una incubación durante la noche a temperatura ambiental.

30

La unión de la proteína etiquetada con his fue revelada mediante una incubación de 90 minutos con 100 µl por pocillo de una solución de anticuerpos contra tetra-his (QIAgen), diluidos a 1:1000 en BSA al 1 %-PBS, y una incubación de 90 minutos con 100 µl por pocillo de una solución de anticuerpos anti-ratón generados en cabra y marcados con HRP (Sigma), diluidos a 1:1000 en BSA al 1 %-PBS. Se observaron señales después de la adición del sustrato OPD (3 mg/ml) en tampón de fosfato/citrato sódico, pH = 4,5, y 0,4 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25 M.

35

**Resultados de la exploración en cuanto a la unión de Rp10-L en un solo pocillo por clon**

|          |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Clon     | A2    | A51   | A57   | A64   | B21   | B23   | B44   | B92   |
| A492/620 | 0,048 | 0,083 | 0,035 | 0,032 | 0,037 | 0,036 | 0,041 | 0,154 |
| Clon     | C18   | C19   | C28   | C56   | C76   | D2    | D51   | D82   |
| A492/620 | 0,153 | 0,033 | 0,042 | 0,062 | 0,030 | 0,016 | 0,033 | 0,046 |

40

**Reacción de fondo**

|       |                      |
|-------|----------------------|
| Placa | A <sub>492/620</sub> |
| A     | 0,016                |
| B     | 0,016                |

|   |       |
|---|-------|
| C | 0,012 |
| D | 0,014 |

Los clones que revelaban una señal positiva fueron cultivados en 20 ml de 2xYT con ampicilina a 30 °C durante la noche. Luego se inocularon a 1:20 en medio fresco y, después de 3 horas a 30 °C, se estimularon con L-arabinosa en una concentración final de 0,1 %, y se dejó que expresaran el dominio CL recombinante durante la noche a 16 °C. Luego se lisó el periplasma de las células expresivas en 1 ml de tampón de borato sódico, pH = 8,0, durante un mínimo de 6 horas. Se dejó que el extracto periplásmico reaccionara con el péptido Rp10-L y se reveló la unión exactamente del modo anteriormente descrito.

#### Resultados de la exploración en cuanto a la unión de Rp10-L

| Clon | +     | -      | Clon | +     | -      |
|------|-------|--------|------|-------|--------|
| A2   | 0,002 | 0,001  | C18  | 0,025 | 0,041  |
| A57  | 0,006 | 0,004  | C19  | 0,006 | 0,003  |
| A62  | 0,016 | 0,005  | C28  | 0,010 | 0,003  |
| A64  | 0,006 | 0,006  | C56  | 0,026 | 0,010  |
| B21  | 0,005 | -0,002 | C76  | 0,075 | 0,034  |
| B23  | 0,004 | 0,004  | D2   | 0,003 | 0,002  |
| B44  | 0,007 | 0,002  | D82  | 0,007 | -0,007 |
| B92  | 0,038 | 0,017  |      |       |        |

#### Clonación de clones seleccionados para expresión soluble en pET27b

Las secuencias que codificaban el dominio CL alterado, contenidas dentro de clones que producían una señal significativa con respecto a la unión a Rp10-L, fueron multiplicadas por PCR. Después de una restricción con *NcoI* y *NotI*, fueron insertadas en pET27b (Novagen). Después de la transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con ellas, las células transformadas fueron seleccionadas en medio TYE con glucosa al 1 % y 50 µg/ml de kanamicina a 30 °C.

Los clones que revelaban una señal positiva fueron cultivados en 20 ml de medio M9ZB con glucosa al 2 % y kanamicina a 30 °C durante la noche. Luego se inocularon a 1:20 en medio fresco y, después de 3 horas a 30 °C, se estimularon con medio que contenía glicerol al 1 % en lugar de glucosa, kanamicina e IPTG 1 mM, y se dejó que expresaran el dominio CL recombinante durante la noche a 16 °C. Luego se lisó el periplasma de las células expresivas en 1 ml de tampón de borato sódico, pH = 8,0, durante un mínimo de 6 horas. Se analizó el extracto periplásmico en cuanto a la presencia de proteína recombinante mediante transferencia Western y detección con anticuerpos anti-tetra-his (QIAgen).

#### Ejemplo 9: Clonación, expresión y caracterización de un Fcab que se une a integrinas

El péptido CRGDCL potencialmente cíclico fue originalmente aislado por Koivunen et al. en 1993 (J. Biol. Chem., 25 de septiembre de 1993, 268 (27): 20.205-10) a partir de un banco de péptidos de 6 aminoácidos expresado en un fago filamentoso, y se mostró que inhibía la unión de un fago que expresa RGD a la integrina Vv31 o la fijación de células que expresan Vv31 a fibronectina. El péptido también inhibía la fijación celular mediada por las integrinas Vv31, Vv33 y Vv35.

Hemos insertado la secuencia GCRGDCL en el bucle estructural (el bucle "EF") del dominio CH3 de IgG1 humana. Con este fin, se mutaron los restos Asp92 y Lys93 (numeración IMGT) por Gly y Leu, respectivamente, y se insertaron los 5 restos CRGDC entre estos restos 92 y 93 mutados para crear el bucle con el motivo RGD ligante de integrinas, usando técnicas de clonación estándares. En el extremo C del inserto, la secuencia fue fusionada en marco con el sitio de clonación múltiple del vector de modo que la etiqueta de HSV y la etiqueta de His se fijaran C-terminalmente a la proteína recombinante. El nombre de esta proteína recombinante es Fcab-RGD4, o abreviadamente RGD4. A continuación se muestran la secuencia de DNA que codifica Fcab-RGD4 y la traducción en secuencia de aminoácidos.

```

I VLEVVVIVYCC LECLECCCEVC CECLECECEI EELCECELEC LCCLECECEC CCVECCCECE VLECCCVYGG CCEVECCCVY VIGLLECEVC VVVVCLVYCV
+3 N K A L T T B L Y V Y G P P T T Y V O B Y H V W Y E E K R C D K L H
TACITTAGTG ACGAGCGGTG GCGACGACGA CCAGACGACG AGGAGCGCGG GGTGCGCGCG TACCGGTACC GGCTCGGGTT TAGAACACTG TTTTGAGTGT

+3 T C P P T C P A E E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M T S R T P E
101 CATGCCACC GTGCCAGCA CTTGAACCTC TGGGGGACC GTCAGTCTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA
GTACGGGTGG CACGGGTCTT GGACTTGAGG ACCCCCTCGG CAGTCAGAAG GAGAAGGGGG GTTTTGGGTT CCTGTGGGAG TACTAGAGGG CCTGGGGACT

+3 V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K H
201 GGTCACTGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG
CCAGTGTACG CACCACCACC TGCACCTGGT GCTTCTGGGA CTCCAGTTCA AGTTGACCAT GCACCTGCCG CACCTCCAGC TATTACGGTT CTGTTTCCGG

+3 R E E O Y N S T Y R V V S V L T V L H O D W L N G R E Y K C K V S
301 GGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCCT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA
GCCCTCCTCG TCATGTTGTC GTGCATGGCA CACCAGTCGC AGGAGTGCCA GGACGTGGTC CTGACCGACT TACCGTTCTT CATGTTCCAG TTCCAGAGGT

+3 N K A L P A P I E K T I S K A K G O P R E P Q V Y T L P P S R D E H
401 ACAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAA CCATCTCAA AGCCAAAGG CAGCCCGAG AACACAGGT GTACACCTG CCCCCTCCG GGGATGAGCT
TGTTTCGGGA GGGTCGGGG TAGCTCTTTT GGTAGAGGTT TCGGTTTCCC GTCGGGGCTC TTGGTGTCCA CATGTGGGAC GGGGTAGGG CCTACTCGA

+3 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G O P E N N Y
501 GACCAAGAAC CAGGTACGCC TGACCTGCC TGTCAAAGGC GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGA GAACAATC
CTGGTTCTTG GTCCAGTCGG ACTGGACGGA CCAGTTTCCG AAGATAGGAT CGCTGTAGCG GCACCTCACC CTCCTGTTAC CCGTCGGCCT CTGTTGATG

+3 K T T P F V C D S D G S F F I Y S K L T V S S R W Q Q
601 AAGACCAGC CTCCCGTGT GACTCCGAC GGCTCCTCT CTCTTACAG CAAGCTTACC GTGGGTGGC GCGGTGATG TCTGAGCAGG TGGCAGCAGG
TCTGTGGCG GAGGGCAGCA CCGAGGCTG CCGAGGAAGA AGGAGATGTC TTCTGAATGG CACCCAACGG CGCCACTAC AGACTCTGTC ACCGTCTCC

+3 G N V F S C S V M H E A L H N H Y T O K S L S L S P G R A A A L E I
701 GGAAGCTCT CTGATGCTC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCCTCCGGT AAAGCGGGC CACTCGAGAT
CCTTGACGAA GAGTACGAGG CACTACGTAC TCCGAGACGT GTTGGTGATG TGGCTCTCT CCGAGAGGA CAGAGGCCA TTTCCGCCG GTGAGCTCTA

+3 K R A S O P E E T A N P R E A D P R E A G H V E
801 CAAACGGGCT AGCCAGCCAG AACTCGCCCC GGAAGACCCC GAGGATGTCC AGCACCACCA CCACCACCAC
GTTTCCCGA TCGGTGCGTC TTGAGCGGGG CCTTCTGGGG CTCTACAGC TCGTGGTGGT GGTGGTGGT
    
```

5 Las secuencias que codificaban Fcab-RGD4 y Fcab-wt fueron respectivamente introducidas en el vector de expresión pCEP4 de mamífero mediante técnicas de clonación convencionales. Se transfectaron transitoriamente células HEK 293 con estos plásmidos de expresión y, después de 3 días y después de una semana, se recolectó en medio de cultivo que contenía Fcab. Los Fcabs fueron purificados por medio de una columna de proteína A y una elución ácida de la columna, lo que fue seguido de una inmediata neutralización. Los Fcabs fueron sometidos a diálisis frente a PBS y fueron examinados mediante un ELISA para unión a la integrina VvB<sub>3</sub> humana (Chemicon).

10 Para el ELISA de integrinas, se revistieron placas Maxisorp con 1 µg/ml de integrina VvB<sub>3</sub> humana en PBS durante la noche y se bloquearon durante 1 hora con BSA en PBS que contenía Ca<sup>2+</sup> 1 mM. Se dejó que Fcab-RGD4 y Fcab-wt, respectivamente, se unieran durante 1 hora a la proteína purificada en diversas diluciones, empezando en 10 µg/ml. Se detectaron las Fcabs unidas, mediante proteína A marcada con HRP, y TMB como sustrato. La unión de RGD4 a la integrina (línea roja) dio lugar a señales significativas de la proteína, desde 10 µg/ml hasta 0,16 µg/ml. Como testigos negativos, no se unió RGD4 a la placa en ausencia de integrina (línea gris) ni se unió Fcab-wt a la placa revestida con integrina (línea verde). La unión del mAb comercial LM609 anti-integrina VvB<sub>3</sub> humana generado en ratón (Chemicon; línea azul) sirvió como testigo positivo.

| Concentración de proteína | Fcab-RGD4 | Fcab-wt  | Fcab-RGD4 blanco del revestimiento | LM609 (mAb anti-integrina) |
|---------------------------|-----------|----------|------------------------------------|----------------------------|
| µg/ml                     | DO a 450  | DO a 450 | DO a 450                           | DO a 450                   |
| 10                        | 3,4513    | 0,0485   | 0,0152                             | 0,6475                     |
| 2,500                     | 1,7446    | 0,0338   | 0,0127                             | 0,6443                     |
| 0,625                     | 0,7068    | 0,0337   | 0,0125                             | 0,6570                     |
| 0,156                     | 0,2384    | 0,0327   | 0,0123                             | 0,6257                     |
| 0,039                     | 0,0829    | 0,0295   | 0,0127                             | 0,3907                     |
| 0,010                     | 0,0388    | 0,0276   | 0,0103                             | 0,1567                     |
| 0,002                     | 0,0303    | 0,0273   | 0,0112                             | 0,0770                     |

20 Tabla: Datos de ELISA que demuestran la unión de RGD4 y LM609 a la α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> humana. Se examinaron las diversas proteínas en concentraciones como las indicadas en la primera columna, lo que dio lugar a las señales a 450 nm de las respectivas filas. En la segunda columna se muestran los valores de la unión de Fcab-RGD4 producido por HEK

y purificado con proteína A a la integrina, en la tercera el testigo negativo Fcab-wt, y en la cuarta el testigo blanco del revestimiento de Fcab-RGD4. En la última columna se muestran los valores para la unión del mAb LM609 anti-integrina  $\alpha_v\beta_3$  generado en ratón.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una inmunoglobulina multivalente o parte de la misma que se une específicamente a al menos dos moléculas de la superficie celular de una sola célula con al menos una modificación en al menos una región de bucles estructurales de dicha inmunoglobulina que determina la unión con un epítipo de dichas moléculas de superficie celular, en donde la región de bucles estructurales modificada está dentro de un dominio constante de dicha inmunoglobulina y la modificación es una delección, una sustitución, una inserción o una combinación de las mismas, y en donde la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo.
- 10 2. Inmunoglobulina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la región de bucles estructurales modificada está dentro de CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C, o una parte del mismo.
- 15 3. Inmunoglobulina de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que dicha región de bucles estructurales modificada comprende al menos 6 modificaciones de aminoácido.
- 20 4. Inmunoglobulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que las regiones de bucles modificadas de un CH1, un CH2, un CH3 o un CH4 de origen humano o murino comprenden al menos una modificación en los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 o los aminoácidos 106 a 117.
- 25 5. Inmunoglobulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que las regiones de bucles de Igk-C o Igl-C de origen humano comprenden al menos una modificación en los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117 o los aminoácidos 123 a 126.
- 30 6. Inmunoglobulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que las regiones de bucles de Igk-C o Igl-C de origen murino comprenden al menos una modificación en los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 26 a 36, los aminoácidos 43 a 79, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 90 a 101, los aminoácidos 108 a 116 o los aminoácidos 122 a 125.
- 35 7. Inmunoglobulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el dominio constante de inmunoglobulina es de origen camélido.
- 40 8. Inmunoglobulina de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que la inmunoglobulina comprende al menos un dominio constante modificado seleccionado del grupo que consiste en CH1, CH2 y CH3.
- 45 9. Inmunoglobulina de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que las regiones de bucles modificadas de un CH1, un CH2 y/o un CH3 comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 24 a 39, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 82 a 85, los aminoácidos 91 a 103 o los aminoácidos 108 a 117.
- 50 10. Inmunoglobulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que la inmunoglobulina modificada está además combinada con una o más inmunoglobulinas modificadas o con inmunoglobulinas no modificadas, o partes de las mismas, para obtener una inmunoglobulina de combinación.
- 55 11. Ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina o parte de la misma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 60 12. Método para alterar una inmunoglobulina multivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de:
- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región de bucles estructurales dentro de un dominio constante,
  - modificar al menos un resto nucleotídico de dicha región de bucles estructurales,
  - transferir dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión;
  - expresar dicha inmunoglobulina multivalente;
  - poner en contacto la inmunoglobulina multivalente expresada con un epítipo, y
- determinar si dicha inmunoglobulina multivalente se une a dicho epítipo.
- 65 13. Método para producir una inmunoglobulina multivalente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una preparación farmacéutica de la misma, y determinar la unión de dicha inmunoglobulina con un epítipo de un antígeno, en donde la inmunoglobulina no modificada no se une de forma significativa a dicho epítipo, que comprende las etapas de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región de bucles estructurales dentro de un dominio constante,
- modificar al menos un resto nucleotídico de al menos una de dichas regiones de bucles,
- transferir dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión;
- expresar dicha inmunoglobulina modificada;
- poner en contacto la inmunoglobulina modificada expresada con un epítipo,
- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une con dicho epítipo, y
- proporcionar la inmunoglobulina modificada que se une con dicho epítipo y opcionalmente terminarla en una preparación farmacéutica.

14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la inmunoglobulina se une específicamente a al menos una primera molécula y comprende al menos una modificación en al menos una región de bucles estructurales de dicha inmunoglobulina, y el método comprende determinar la unión específica de dicha al menos una región de bucles estructurales con al menos una segunda molécula, en donde la inmunoglobulina que contiene una región de bucles estructurales no modificada no se une específicamente a dicha al menos una segunda molécula, que comprende las etapas de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente a al menos una primera molécula que comprende al menos una región de bucles estructurales dentro de un dominio constante,
- modificar al menos un resto nucleotídico de al menos una de dichas regiones de bucles codificadas por dicho ácido nucleico,
- transferir dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión;
- expresar dicha inmunoglobulina modificada;
- poner en contacto la inmunoglobulina modificada expresada con dicha al menos una segunda molécula, y
- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente a la segunda molécula y
- proporcionar la inmunoglobulina modificada que se une específicamente a dicha al menos una segunda molécula y opcionalmente terminarla en una preparación farmacéutica.

15. Una inmunoglobulina multivalente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso como un medicamento.

16. Una inmunoglobulina multivalente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la que la inmunoglobulina multivalente es biespecífica.