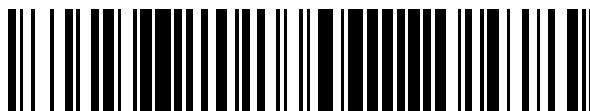


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 807**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2008 E 08753864 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2164868**

54 Título: **Dominios variables de anticuerpos de conejo modificados por ingeniería genética y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**04.05.2007 US 916226 P**

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

**13.07.2015**

73 Titular/es:

**TECHNOPHAGE, INVESTIGAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO EM BIOTECNOLOGIA, SA  
(100.0%)**

**Avenida Professor Egas Moniz Edificio Egas  
Moniz Piso 2 Sala A8  
1649-028 Lisboa, PT**

72 Inventor/es:

**BRAZ GONCALVES, JOÃO MANUEL y  
CASTANHEIRA AIRES DA SILVA, FREDERICO  
NUNO**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 540 807 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

Dominios variables de anticuerpos de conejo modificados por ingeniería genética y usos de los mismos

## 1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para seleccionar y producir polipéptidos que se unen  
 inmunoespecíficamente a un antígeno, polipéptidos que comprenden dominios de unión que se derivan de  
 inmunoglobulina de conejo. Usando armazones de cadena pesada o cadena ligera de anticuerpos de conejo, los  
 métodos de la invención permiten la identificación de regiones de entramado y bucles de CDR novedosos y que  
 confieren estabilidad y/o afinidad potenciada con respecto a dominios variables de inmunoglobulina aislados, en  
 particular, en relación con los derivados de anticuerpos de ratón. La estabilidad y/o afinidad potenciadas de los  
 10 dominios variables de la invención permiten su uso en la producción de herramientas de investigación y polipéptidos  
 terapéuticos que presentan inmunoespecificidad por un antígeno de interés, incluyendo polipéptidos de un solo  
 dominio de unión, es decir, anticuerpos de un solo dominio que comprenden uno de un dominio  $V_H$  o  $V_L$ .

## 2. Antecedentes

15 Los anticuerpos están compuestos por dos cadenas denominadas cadenas ligera y pesada. La cadena ligera  
 contiene un dominio variable amino terminal (dominio VL) y un dominio constante carboxilo terminal (CL). La cadena  
 pesada está compuesta por un dominio variable amino terminal (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2, CH3).  
 El sitio de unión del anticuerpo está ubicado en los dominios VL y VH y está constituido por seis bucles  
 hipervariables que representan las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Tanto las regiones VL  
 como las VH contienen tres bucles de CDR (CDR1, CDR2 y CDR3), que están conectados a una región de  
 20 entramado de lámina beta conservada estructuralmente.

Con el desarrollo de la tecnología de hibridomas, se hizo posible producir una sola población de anticuerpos, o  
 anticuerpos monoclonales (AcM), que se dirigen específicamente a un solo epítipo abriendo una revolución en el  
 campo de descubrimiento de fármacos. Sin embargo, problemas con la producción de anticuerpos y las respuestas  
*in vivo*, incluyendo inmunogenicidad y efectos secundarios asociados con citocinas, han conducido a la investigación  
 25 de la alteración de la estructura y/o la función de los anticuerpos al mismo tiempo que todavía se conserva la unión  
 inmunoespecífica. Estudios han intentado reducir el anticuerpo a su forma funcional más pequeña, sin cambiar  
 significativamente el reconocimiento del antígeno y la afinidad por el mismo. La identificación del fragmento de  
 anticuerpo más pequeño que puede unirse al antígeno ha evolucionado desde moléculas de anticuerpo completas o  
 IgG hasta fragmentos Fab y Fv de cadena sencilla recombinantes.

30 Debido al progreso de la recombinación génica en la década de 1980, fue posible la generación rápida y fácil de  
 dominios variables recombinantes. Usando la reacción en cadena de la polimerasa, se clonaron diversos repertorios  
 de genes que codifican para dominios VH y VL a partir del ADN genómico de animales inmunizados, permitiendo la  
 caracterización de funcionalidades y actividades de unión múltiples contra varios antígenos. No obstante, los  
 fragmentos de dominios variables aislados inicialmente eran escasamente solubles y difíciles de producir.

35 Los problemas en la producción se abordaron con la caracterización de anticuerpos de camélidos, que son  
 moléculas dimericas que comprenden sólo cadenas pesadas. No sólo el descubrimiento de la molécula dimerica  
 abordaba muchas cuestiones con respecto a la producción de anticuerpos recombinantes, sino que la molécula  
 también resaltó la posibilidad de que la cadena pesada de moléculas de inmunoglobulina pudiese dirigir la unión  
 inmunoespecífica en ausencia de una cadena ligera. Actualmente está ampliamente aceptado que las cadenas  
 40 pesadas de Ig pueden conservar una capacidad de unión al antígeno significativa en ausencia de una cadena ligera.  
 También hay evidencias a partir de estudios estructurales de que la región CDR3 del dominio  $V_H$  es el más  
 significativo de los dominios de CDR con respecto a la inmunoespecificidad. Esto se basa en los hallazgos de que  
 los residuos de aminoácido de HCDR3 proporcionan la mayor parte del área de contacto de superficie y son  
 cruciales en la interacción molecular con el antígeno. Por consiguiente, puede ser posible una reducción adicional  
 45 del tamaño de la proteína de unión a antígeno hasta proteínas de unión de un solo dominio basándose en dominios  
 $V_H$  de inmunoglobulina.

## 2.1 Anticuerpos de conejo

El repertorio de anticuerpos de conejo, que en forma de anticuerpos policlonales se ha utilizado durante décadas, es  
 una fuente extraordinaria de anticuerpos que muestran fuerte afinidad y alta especificidad (Mage *et al.*, 2006).  
 50 Además, los conejos, que pertenecen al orden Lagomorpha, están distanciados evolutivamente de ratones y ratas,  
 que pertenecen al orden Rodentia. En consecuencia, epítopos conservados entre antígenos humanos y de roedor  
 que son invisibles para AcM de roedor (y también AcM humanos generados a partir de ratones transgénicos con  
 genes de inmunoglobulina humanos) pueden reconocerse a menudo por anticuerpos policlonales de conejo.

Los AcM de conejo generados mediante presentación en fago ofrecen ventajas adicionales debido al hecho de que el fenotipo y el genotipo se seleccionan al mismo tiempo. El conocimiento de la secuencia de AcM de conejo permite la generación fácil de una variedad de formatos de AcM, incluyendo anticuerpos de un solo dominio, scFv, Fab e IgG, y, de manera más importante, humanización y maduración por afinidad (Rader *et al.*, 2000; Steinberger *et al.*, 2000; Rader, 2001). En consecuencia, los AcM de conejo generados mediante presentación en fago han llegado a ser reactivos prometedores para aplicaciones terapéuticas en seres humanos.

En conejos normales, el 70-90% de las moléculas de Ig y células B portan los alotipos VH $\alpha$  debido al uso del segmento génico de VH D-proximal, VH1, en transposiciones génicas VDJ. En conejos parecen producirse transposiciones de una variedad de segmentos génicos Vk y V $\lambda$ , puesto que se ha encontrado una variedad de diferentes secuencias de VL entre las secuencias de ADNc expresadas.

El repertorio de células B que se desarrolla en médula ósea de conejo está limitado por el pequeño número de segmentos génicos de VH usados en transposiciones génicas VDJ. Mientras que se transponen segmentos génicos Vk múltiples en células del linaje B de la médula ósea, la mayoría de las células del linaje B transponen el mismo gen de VH, VH1, que codifica para las secuencias alotípicas de VH $\alpha$ . El repertorio también está limitado por el uso de un pequeño número de segmentos génicos JH y D en transposiciones VDJ. Se encuentra JH4 en el 80% de las transposiciones génicas VDJ y JH2 en el otro 20%; los otros tres segmentos génicos JH funcionales se usan pocas veces. Además, a partir del total de 12 segmentos génicos D, la mayoría de las transposiciones génicas VDJ usan D2a (D9), D2b (Df), D3 o D5; D4 y D6 se utilizan pocas veces. Aunque el uso limitado de segmentos génicos de VH, D y JH daría como resultado un repertorio de VDJ limitado, se encuentran nucleótidos N en esencialmente todas las uniones VD y DJ desde las primeras transposiciones durante la diferenciación celular. La alta diversidad de regiones N entre transposiciones génicas VDJ da como resultado un repertorio mucho más grande que el esperado a partir de transposiciones de un número limitado de segmentos génicos V, D y J. El tamaño de este repertorio no se ha estimado. Sin embargo, dado que esencialmente todos los genes de VDJ están diversificados de manera somática en la periferia después de que las células B abandonen la médula ósea y otros sitios primarios de linfopoyesis B, es concebible que el repertorio que se desarrolla en los sitios primarios de desarrollo de células B sea funcionalmente insuficiente.

Después de que se produzcan transposiciones génicas de Ig en células B en sitios tales como la médula ósea de conejos jóvenes, células B con IgM inmaduras experimentan una diversificación adicional del repertorio de Ig en el apéndice y otros tejidos linfoides asociados al intestino. Estos sitios parecen promover el desarrollo de un repertorio preinmunitario primario.

Se encuentra conversión génica de secuencias de cadena pesada y ligera transpuestas en el apéndice de conejo a las 3-4 semanas de edad. Se produce hipermutación somática en las regiones D y J, que carecen de donadores de conversión génica conocidos. La región JH también se diversifica mediante hipermutación somática y por tanto es probable que se produzca también hipermutación somática en los segmentos génicos de VH transpuestos.

Se producen conversión génica e hipermutación somática no sólo en centros germinales del apéndice de conejo joven, sino que también se usan para la diversificación durante respuestas inmunitarias en tejidos linfoides secundarios tales como bazo y ganglios linfáticos.

Cuando se comparan las secuencias de genes de cadena pesada y ligera transpuestos en clones de bazo y de apéndice en desarrollo durante respuestas inmunitarias específicas, los patrones de diversificación en los clones del apéndice son sorprendentemente diferentes de los encontrados en el bazo, donde un antígeno de inmunización estaba dirigiendo el proceso de expansión y selección hacia alta afinidad. Células B del apéndice relacionadas clonalmente desarrollaban diferentes secuencias de aminoácidos en cada región determinante de complementariedad (CDR), incluyendo CDR3, mientras que clones dominantes del bazo experimentaban pocos cambios en CDR3.

Los datos también indican una tasa de hipermutación superior en conejo durante respuestas inmunitarias en centros germinales esplénicos, de manera que el equilibrio entre hipermutación y selección tiende más hacia la mutación y menos hacia la selección en conejo en comparación con ratón.

Los centros germinales (CG) en órganos linfoides secundarios son estructuras especializadas dentro de las cuales se produce la diversificación somática de genes V transpuestos que conduce a la maduración por afinidad de Ac en respuestas inmunitarias frente a Ag dependientes de células T.

A diferencia de ratones y seres humanos, los conejos transponen sólo unos cuantos genes de la región V de cadena pesada (VH), de modo que la diversidad generada por mecanismos combinatorios es limitada. El patrón global es uno de células precursoras esplénicas cuyas secuencias de línea germinal o casi de línea germinal cambiaron tanto por conversión génica como por mutaciones puntuales durante divisiones tempranas y en gran medida por mutaciones puntuales durante divisiones posteriores. Es posible que dentro de las mismas poblaciones clonales en

expansión, se produzca una considerable diversificación de secuencias de cadena ligera en paralelo con los cambios en las secuencias de VH, estos acontecimientos pueden producir las diversas secuencias que sirven como sustratos para la maduración por afinidad adicional mediante selección o bien dentro de CTG o bien posteriormente entre células emigrantes en sitios tales como la médula ósea.

- 5 El limitado repertorio de VHDHJH de cadena pesada debido al uso preferente del segmento génico VH1 se compensa mediante un repertorio diverso de VkJk de cadena ligera en células B desarrolladas en la médula ósea. Este repertorio se expande enormemente tanto en GALT por conversión génica e hipermutación somática, como posteriormente, en centros germinales de bazo y ganglios linfáticos tras inmunización.

10 Tal como se comentó anteriormente, los anticuerpos de conejo se someten a maduración por evolución mediante hipermutación somática, y no dependen de conversión génica para aumentar su afinidad y unión hacia un antígeno dado. Además del reconocimiento, otra propiedad importante de los anticuerpos de un solo dominio aislados es su estabilidad estructural inherente. Debido a que los anticuerpos de conejo evolucionan por hipermutación somática, la estabilidad de VH y VL de anticuerpos de conejo no depende de las propiedades inherentes de una sola familia de VH o VL, sino de una propiedad que puede someterse a evolución. La estabilidad del anticuerpo es importante para  
15 sólo para promover una buena conformación de las CDR para el reconocimiento del antígeno, sino también para aplicaciones posteriores tales como producción y semivida en suero. Además, puesto que la presente invención aísla dominios proteicos VH y VL, puede concebirse que la superficie de contacto hidrófoba pueda promover la agregación de proteínas. Por este motivo, el presente método de selección de dominios VH y VL aislados que son inherentemente estables proporciona la posibilidad de identificar anticuerpos de dominio pequeño novedosos con  
20 propiedades originales y diferentes de los existentes actualmente.

## 2.2 Otros enfoques

Otros enfoques han incluido los siguientes:

25 El documento WO 2001/031065 A1 (The Scripps Research Institute) publicado el 3 de mayo de 2001 por Carlos F. Barbas, III y Christoph Rader ("Barbas I"); y se refiere a la humanización de anticuerpos de mamíferos no humanos. Específicamente, Barbas I propone un procedimiento de humanización de anticuerpos de mamíferos no humanos que combina según se dice tecnología de presentación para expresar bibliotecas de dominios de anticuerpos con ajuste fino de las regiones de dominios variables. También se proponen anticuerpos humanizados producidos mediante el procedimiento.

30 El documento WO 2001/030393 A2 (Ludwig Institute for Cancer Research, *et al.*) publicado el 3 de mayo de 2001 por Carlos F. Barbas, III, Christoph Rader, Gerd Ritter, Sydney Welt, y Lloyd J. Old ("Barbas II"); y se refiere a métodos para reducir los efectos de cánceres que expresan el antígeno A33 usando productos de inmunoglobulina específicos del antígeno A33. Específicamente, Barbas II propone métodos de reducción de los efectos del cáncer en un sujeto administrando a dicho sujeto un agente según se dice anticancerígeno conjugado con un producto de inmunoglobina, que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad y regiones de entramado.

35 El documento WO 2004/016740 A2 (Epitomics, Inc.) publicado el 26 de febrero de 2004 por Dongxiao Zhang, Guoliang Yu, Robert Pytela, y Fernando Jose Rebelo Do Couto ("Zhang I"); y se refiere a anticuerpos de conejo humanizados. Específicamente, Zhang I propone métodos para producir un ácido nucleico modificado que codifica para un anticuerpo de conejo modificado de modo que el anticuerpo de conejo modificado sea menos inmunogénico en un huésped distinto de conejo que un anticuerpo de conejo original no modificado. Zhang I propone además  
40 ácidos nucleicos modificados preparados mediante estos métodos, así como vectores y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos, y métodos para producir los anticuerpos modificados codificados. También se proponen anticuerpos de conejo modificados codificados por los ácidos nucleicos objeto, y composiciones que contienen los mismos. Zhang I propone además kits para llevar a cabo los métodos objeto.

45 El documento US 2006/0216293 A1 de Fernando Jose Rebelo Do Couto, Kristin Bet Hendricks y Stacey Ellen Wallace, publicado el 28 de septiembre de 2006 ("Couto I"); y se refiere a anticuerpos neutralizantes frente a TNF $\alpha$ . Específicamente, Couto I propone anticuerpos monoclonales que según se dice neutralizan la actividad de TNF-alfa. Los anticuerpos monoclonales pueden ser anticuerpos de conejo monoclonales o anticuerpos monoclonales que tienen regiones CDR derivadas de esos anticuerpos de conejo monoclonales. Los anticuerpos monoclonales también pueden estar humanizados. También se proponen métodos de uso de los anticuerpos objetos para inhibir  
50 según se dice la actividad de TNF-alfa, métodos de tratamiento usando esos anticuerpos y kits que contienen los mismos. Couto I propone además usos en una variedad de aplicaciones de investigación y médicas.

55 El documento US 2005/0048578 A1, de Dongxiao Zhang, publicado el 3 de marzo de 2005 ("Zhang II"); y se refiere a métodos de selección de anticuerpos monoclonales con actividad deseable. Específicamente, Zhang II propone métodos para seleccionar un anticuerpo monoclonal con una actividad deseable. Los métodos implican según se dice alterar un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo monoclonal humanizado original seleccionado para

preparar una biblioteca de ácidos nucleicos, introducir la biblioteca en células de mamífero de manera que se produzca una biblioteca de anticuerpos monoclonales sobre las superficies de las células de mamífero, y clasificar las células para aislar una célula que produce un anticuerpo monoclonal humanizado con una actividad deseable, por ejemplo, afinidad aumentada por una pareja de unión en comparación con el anticuerpo original. Esta célula aislada, según propone Zhang II, puede cultivarse y usarse para repetir el método. Zhang II también propone usos en una variedad de diferentes aplicaciones industriales, médicas y de investigación.

El documento WO 2006/073748 A2 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.) publicado el 13 de julio de 2006 por Katherine S. Bowdish, Anke Kretz-Rommel y Naveen Dakappagari ("Bowdish I"); y se refiere a anticuerpos contra células presentadoras de antígeno y a usos de los mismos. El documento WO 2004/091543 A2 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.) publicado el 28 de octubre de 2004 por Katherine S. Bowdish, Anke Kretz-Rommel y Naveen Dakappagari ("Bowdish II"); y se refiere a métodos de tratamiento de enfermedad autoinmunitaria induciendo la presentación de antígenos mediante células presentadoras de antígeno que inducen tolerancia. Específicamente, Bowdish I y II proponen anticuerpos frente a células presentadoras de antígeno que según se dice pueden utilizarse para interferir con la interacción de la célula presentadora de antígeno y células inmunitarias, incluyendo células T. Bowdish I y II también proponen que pueden unirse péptidos, preferiblemente péptidos asociados con autoinmunidad, a dichos anticuerpos, generando de ese modo según se dice una respuesta inmunitaria frente a tales péptidos.

El documento WO 2005/016950 (Epitomics, Inc.) publicado el 24 de febrero de 2005 por Fernando Jose Rebelo Do Couto ("Couto II"); y se refiere a métodos para humanizar anticuerpos monoclonales de conejo. Específicamente, Couto II propone un método para humanizar un anticuerpo monoclonal de conejo que implica comparar las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de conejo original con las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo humano similar, y alterar las secuencias de aminoácidos del anticuerpo de conejo original de manera que sus regiones de entramado sean según se dice más similares en secuencia a las regiones de entramado equivalentes del anticuerpo humano similar. En muchos casos, Couto II propone que no se modifiquen aminoácidos en el anticuerpo de conejo original que no sean residuos de contacto con CDR, residuos de contacto entre cadenas o residuos enterrados. Couto II propone además ácidos nucleicos que codifican para los anticuerpos objeto, así como vectores y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos, y métodos para producir un anticuerpo objeto. Los anticuerpos, composiciones de ácido nucleico y kits objeto encuentran uso según se dice en una variedad de aplicaciones, incluyendo diagnóstico y tratamiento terapéutico e investigación de estados y enfermedades.

Rader C. *et al.*, "The Rabbit Antibody Repertoire as a Novel Source for the Generation of Therapeutic Human Antibodies", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, páginas 13668-13676 (2000) ("Rader") trata de un repertorio de anticuerpos de conejo en forma de anticuerpos policlonales, que se ha usado en aplicaciones de diagnóstico durante décadas. Rader propone que el repertorio sería una fuente atractiva para la generación de anticuerpos humanos terapéuticos. Sin embargo, Rader indica que la humanización de anticuerpos de conejo no se había notificado. Rader propone el uso de la tecnología de presentación en fago para seleccionar y humanizar anticuerpos de conejos que se inmunizaron con antígeno A33 humano, un antígeno diana para la inmunoterapia de cáncer de colon. Rader seleccionó en primer lugar anticuerpos de conejo que según se dice se unen a un epítipo de superficie celular de antígeno A33 humano con una afinidad en el intervalo de 1 nM. Para la humanización de anticuerpos de conejo, Rader usó entonces una estrategia de selección que según se dice combina el injerto de las regiones determinantes de complementariedad con un ajuste fino de las regiones de entramado. Se encontró que los anticuerpos humanizados resultantes según se dice conservan tanto la alta especificidad como la afinidad por el antígeno A33 humano.

da Silva *et al.*, "Camelized Rabbit-derived VH Single-domain Intrabodies Against Vif Strongly Neutralize HIV-1 Infectivity", *Journal of Molecular Biology*, vol. 340, n.º 3, págs. 525-542, (2004) ("da Silva") trata del desarrollo de un anticuerpo de cadena sencilla específico para conejos inmunizados frente a proteína Vif de VIH-1 que se expresó de manera intracelular e inhibió la transcripción inversa y la replicación viral. da Silva propone un fragmento VH de armazón mínimo con propiedades de intracuerpo derivado de anticuerpo de cadena sencilla anti-Vif, modificado por ingeniería genética para imitar dominios de anticuerpo de camélido. Los resultados de da Silva demuestran según se dice que dominios individuales VH anti-Vif conservan la actividad de unión a antígeno y la especificidad en ausencia del dominio VL original; y además que los dominios más altamente camelizados tenían altos niveles de expresión intracelular. Los resultados, según da Silva, demuestran una excelente correlación entre las mejoras en la solubilidad de la proteína con la camelización gradualmente creciente.

Robben J. *et al.*, "An *Escherichia coli* plasmid vector system for high-level production and purification of heterologous peptides fused to active chloramphenicol acetyltransferase", *Gene*, vol. 126, páginas 109-113 (1993) ("Robben") describen un sistema de vector de plásmido pequeño según se dice para la construcción y producción de alto nivel de proteínas de fusión de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) C-terminales en *Escherichia coli*. Según Robben, los únicos elementos funcionales del plásmido son una región mínima del origen de replicación del ADN *ColE1* y el gen *Tn9 cat*, ambos bajo el control de un promotor *tac*. Puesto que la fusión C-terminal a CAT no interfiere según se dice con la resistencia a cloranfenicol (Cm), se describe que los plásmidos se mantienen bajo selección con Cm. Debido al pequeño tamaño (1392 pb), continúa Robben, el sistema es conveniente para construir y expresar genes sintéticos genes y fragmentos de genes. Robben propone utilizar este concepto para generar una fusión con un gen

sintético que codifica para el fragmento de múltiples epítomos de la proteína de membrana E1 del virus de la rubeola.

5 Marchesini M.I. *et al.*, "N-terminal-capturing screening system for the isolation of *Brucella abortus* genes encoding surface exposed and secreted proteins", *Microbial Pathogenesis*, vol. 37, páginas 95-105 (2004) ("Marchesini") describen la construcción de un sistema de captura de proteína N-terminal y su uso según se dice para aislar genes S2308 de *Brucella abortus* que codifican para supuestas proteínas secretadas o expuestas en la superficie. Para este fin, se construyó un vector de clonación que genera según se dice fusiones génicas con un sitio de unión al ribosoma y un gen indicador de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) deficiente en el codón de iniciación y se introdujo la biblioteca resultante en las cepas mutantes S2308 y *virB* de *B. abortus*. Se identificaron según se dice fusiones traduccionales secretadas determinando la actividad de CAT en sobrenadantes de cultivo.

10 El documento WO 2008/004834 A1 (Isu Abxis Co. Ltd) publicado el 10 de enero de 2008 por Seung Chul Jun, Dae-Hee Kim, Hyun Hee Park, Jeong Eun Kim, Jae Min Jeong, June-Key Chung y Byeong-Cheol Kang ("Jun"); y se refiere a anticuerpos monoclonales humanizados frente al receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Específicamente, Jun propone un anticuerpo humanizado que tienen estabilidad y capacidad de unión a EGFR o, más precisamente, un anticuerpo humanizado compuesto por regiones determinantes de complementariedad (CDR) 15 originadas en conejos inmunizados y regiones de entramado (FR) originadas en inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de Jun tiene según se dice una alta capacidad de unión a EGFR, de modo que inhibe según se dice la unión de EGF, así como también tiene una estabilidad aumentada, de modo que da como resultado según se dice efectos supresores de tumores *in vivo*. Además, según Jun, el anticuerpo humanizado minimiza la respuesta inmunitaria de modo que puede usarse según se dice para el diagnóstico y tratamiento de cáncer que sobreexpresa 20 EGFR.

Sin embargo, el presente método abarca la identificación de anticuerpos de conejo de un solo dominio distintivos, con propiedades únicas en comparación con anticuerpos humanos, de ratón y de camello, y que presentan alta afinidad, especificidad y estabilidad.

### 3. Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere a métodos de producción de polipéptidos inmuno-específicos que comprenden secuencias derivadas de dominios variables de inmunoglobulina de conejo, a polipéptidos que comprenden tales secuencias y a polipéptidos producidos mediante tales métodos. En particular, la invención abarca métodos para el aislamiento y el uso de dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  de conejo y/o CDR y regiones de entramado novedosas derivadas de los mismos. La invención proporciona además la identificación de secuencias de aminoácidos novedosas (incluyendo 30 residuos de aminoácido novedosos en posiciones definidas) dentro de dominios  $V_H$  y  $V_L$  de conejo aislados para su uso como "armazón" o secuencias estructurales en el contexto de bucles de CDR y/o regiones de entramado en polipéptidos inmuno-específicos recombinantes. Las secuencias de armazón de conejo (incluyendo residuos de armazón) o secuencias de CDR/entramado novedosas de la invención potencian la estabilidad y/o afinidad del/de los dominio(s) variable(s) y/o polipéptidos inmuno-específicos (por ejemplo, anticuerpos) que los contienen, en particular, en relación con anticuerpos de roedor, permitiendo la producción y/o el uso de inmunopéptidos de un solo 35 dominio, altamente específicos, por ejemplo, anticuerpos de un solo dominio.

La presente invención abarca la producción de dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo novedosos con especificidad por un antígeno dado, o epítomo del mismo. En particular, la invención proporciona un método de producción de dominios 40  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, comprendiendo dicho método: (a) seleccionar de una biblioteca de expresión en fago un conjunto de secuencias de ADN que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo que se unen inmuno-específicamente a un antígeno deseado o epítomo del mismo (también conocido como "cribado" de fagos) y (b) expresar el conjunto de secuencias, o un subconjunto de las mismas, en bacterias como una proteína de fusión con cloranfenicol acetiltransferasa ("CAT") y seleccionar bacterias que tienen resistencia a cloranfenicol en virtud de la expresión de CAT. En realizaciones alternativas, la presente invención proporciona un método de producción de dominios  $V_H$  o  $V_L$  45 de conejo, comprendiendo dicho método (a) expresar secuencias de ADN o ADNc que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de inmunoglobulinas de conejo en bacterias como una proteína de fusión con CAT, (b) seleccionar bacterias que tienen resistencia a cloranfenicol en virtud de la expresión de CAT y obtener el conjunto de secuencias de ADN que codifican para los dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo a partir de las bacterias seleccionadas, y (c) preparar una biblioteca de expresión en fago a partir del conjunto de secuencias de ADN obtenido en la etapa (b) y seleccionar secuencias 50 de ADN que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  que se unen inmuno-específicamente a un antígeno deseado o epítomo del mismo (es decir, cribado de la biblioteca para detectar unión inmuno-específica al antígeno o epítomo). En determinadas realizaciones, la presente invención abarca métodos para la producción de un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de conejo en el que la etapa de cribado de fagos se repite una o más veces. En realizaciones relacionadas, la etapa de cribado de fagos puede repetirse o no secuencialmente. La biblioteca de expresión en fago para su uso según la presente invención puede obtenerse comercialmente o prepararse mediante cualquier método descrito en el 55 presente documento y/o conocido en la técnica. La expresión de secuencias de ADN o ADNc en bacterias como proteínas de fusión se conoce bien y puede realizarse mediante cualquier método descrito en el presente documento o conocido en la técnica, por ejemplo, clonando la secuencia de ADN o ADNc que codifica para el dominio  $V_H$  o  $V_L$  en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para CAT y una secuencia

promotora que dirige la expresión de la proteína de fusión.

La expresión de CAT en bacterias como una proteína de fusión con péptidos insolubles confiere una resistencia significativamente inferior a cloranfenicol que la expresión como una proteína de fusión con un péptido soluble (por ejemplo, un péptido que está al menos parcialmente plegado y no agregado cuando se expresa en bacterias). Por consiguiente, la selección de resistencia a cloranfenicol en bacterias transformadas con secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas de fusión que comprenden dominios  $V_H$  o  $V_L$  y CAT seleccionará las secuencias que pueden expresarse de manera recombinante plegadas apropiadamente y/o en formas no agregadas. En determinadas realizaciones, la presente invención abarca métodos que comprenden cultivar dichas bacterias transformadas en medios selectivos que comprenden cloranfenicol al menos 0,1 mM, al menos 0,2 mM, al menos 0,4 mM, al menos 0,6 mM, al menos 0,8 mM, al menos 1,0 mM, al menos 1,2 mM, al menos 1,4 mM, al menos 1,6 mM, al menos 1,8 mM, al menos 2,0 mM, al menos 2,5 mM, al menos 3,0 mM, al menos 5,0 mM, al menos 10 mM, al menos 15 mM o al menos 20 mM. La selección de secuencias que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  mediante el ensayo de fusión de CAT descrito en el presente documento selecciona según la estabilidad de la proteína. La invención abarca además el uso de cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en el presente documento para evaluar los dominios  $V_H$  o  $V_L$  de la invención, incluyendo ensayos de estabilidad térmica y/o cinética (por ejemplo, determinaciones de temperatura de fusión de la proteína ("T<sub>m</sub>") o energía libre de Gibbs del plegado ( $\Delta G_{N-U}$ )). En determinadas realizaciones, los dominios  $V_H$  o  $V_L$  de la invención tienen una temperatura de fusión de al menos aproximadamente 40°C, al menos aproximadamente 45°C, al menos aproximadamente 50°C, al menos aproximadamente 54°C, o aproximadamente 55°C o mayor.

La invención se refiere a polipéptidos que comprenden dominios  $V_H$  o  $V_L$ , o residuos o secuencias de aminoácidos, derivados de y/o identificados en inmunoglobulinas de conejo, polipéptidos que se unen inmunoespecíficamente a antígenos deseados, o epítomos de los mismos, tal como se determina mediante cualquier método convencional conocido en la técnica para evaluar las especificidades de antígeno/proteína de unión. Los ensayos para determinar la especificidad de unión de un polipéptido inmunoespecífico, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, para un antígeno o epítomo incluyen, pero no se limitan a ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, BIAcore) y radioinmunoensayo. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para evaluar la especificidad de unión de polipéptidos para identificar polipéptidos de la invención que presentan una K<sub>d</sub> de más de 0,001 nM pero no más de 5 nM, no más de 10 nM, no más de 15 nM, no más de 20 nM, no más de 25 nM, no más de 30 nM, no más de 35 nM, no más de 40 nM, no más de 45 nM o no más de 50 nM. En determinadas realizaciones, los dominios  $V_H$  o  $V_L$  aislados de la invención muestran una K<sub>d</sub> de no más de 5 nM, no más de 10 nM, no más de 15 nM, no más de 20 nM, no más de 25 nM, no más de 30 nM, no más de 35 nM, no más de 40 nM, no más de 45 nM, o no más de 50 nM tal como se determina mediante el ensayo BIAcore.

Las secuencias de nucleótidos que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de inmunoglobulina pueden obtenerse de conejos sin tratamiento previo o conejos que se han inmunizado previamente con un antígeno. La inmunización de conejos y el aislamiento de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, ADNc) que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo pueden realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento. En determinadas realizaciones, pueden obtenerse secuencias de nucleótidos que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  a partir de cualquier tejido del conejo sin tratamiento previo o inmunizado, pero preferiblemente se obtienen a partir de una fuente de tejido rica en células plasmáticas, por ejemplo, células B. En determinadas realizaciones, el tejido de conejo que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  es médula ósea. En otras realizaciones, el tejido de conejo que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  es tejido de apéndice. En aún otras realizaciones, el tejido de conejo que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  es tejido linfóide; en un ejemplo específico según esta realización el tejido linfóide es bazo o tejido de ganglios linfáticos.

La presente invención abarca además polipéptidos inmunoespecíficos, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden los dominios  $V_H$  o  $V_L$  aislados, identificados o construidos mediante los métodos descritos en el presente documento. En realizaciones alternativas, la invención abarca polipéptidos inmunoespecíficos, por ejemplo, anticuerpos, que comprenden secuencias de aminoácidos de armazón novedosas (en relación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de especies distintas de conejo), residuos de aminoácido novedosos en determinadas posiciones en el dominio  $V_H$  o  $V_L$  (por ejemplo, tal como se determina según la posición en la secuencia de alineación de  $V_H$  y  $V_L$  de conejo presentada en la figura 3A y la figura 4, respectivamente), o secuencias novedosas de bucles de CDR identificadas mediante los métodos de la invención. En determinadas realizaciones, los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención son anticuerpos monoclonales, anticuerpos multispecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id frente a anticuerpos de la invención), diacuerpos, minicuerpos, nanocuerpos o fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores, incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv biespecíficos unidos por puentes disulfuro (sdFv) e intracuerpos. En determinadas realizaciones, los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención son biespecíficos o multispecíficos. Pueden formarse moléculas bi- o multispecíficas de la invención usando métodos

bien conocidos en la técnica, por ejemplo, conjugación química de una o más moléculas de la invención entre sí y/o con polipéptidos de unión a epítipo diferentes, en los que los dominios de unión de la molécula bi- o multispecifica muestran afinidad por al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo, el polipéptido inmunoespecífico de la invención puede comprender un primer y un segundo dominio  $V_L$ , o un primer y un segundo dominio  $V_H$ , en los que dicho primer y segundo dominio tienen especificidades de unión diferentes (es decir, se unen a antígenos diferentes). En otras realizaciones, los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención comprenden un dominio  $V_L$ , o un dominio  $V_H$ , y un polipéptido de unión a antígeno, en el que el dominio  $V_L$ , o dominio  $V_H$ , y dicho polipéptido presentan especificidades de unión diferentes. En determinadas realizaciones de la invención, al menos un dominio de unión a antígeno de la molécula bi- o multispecifica de la invención se une inmunoespecíficamente a albúmina. En otras realizaciones de la invención, al menos un dominio de unión a antígeno de la molécula bi- o multispecifica de la invención se une inmunoespecíficamente a fibronectina.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, no comprenden un dominio  $CH_1$ . En otras realizaciones, los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención, o fragmentos de unión a epítipo de los mismos, no comprenden uno o más de un dominio  $CH_1$ , dominio  $CH_2$ , dominio  $CL$ , dominio  $CH_3$  o dominio  $H$ , o no comprenden ninguno de un dominio  $CH_1$ , dominio  $CH_2$ , dominio  $CL$ , dominio  $CH_3$  o dominio  $H$ . En todavía otras realizaciones, los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención, o fragmentos de unión a epítipo de los mismos, comprenden uno de un dominio  $CH_1$ , dominio  $H$ , dominio  $CH_2$ , dominio  $CL$  o dominio  $CH_3$ , y no comprenden ningún otro dominio constante o región de bisagra derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, en determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención o fragmento del mismo comprende un dominio  $CH_1$ , pero no comprende ninguno de un dominio  $H$ , un dominio  $CH_2$  o un dominio  $CH_3$ ; o comprende un dominio  $CH_2$ , pero no comprende ninguno de un dominio  $CH_1$ , dominio  $H$  o un dominio  $CH_3$ , etc.).

En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende uno o más de un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$ , y/o un dominio CDR3 de  $V_L$ . En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende cada uno de un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  y/o un dominio CDR3 de  $V_L$ .

En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende uno de un dominio CDR1 de  $V_H$ , dominio CDR2 de  $V_H$ , dominio CDR3 de  $V_H$ , dominio CDR1 de  $V_L$ , dominio CDR2 de  $V_L$  o dominio CDR3 de  $V_L$ , pero no comprende ningún otro dominio CDR, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención (por ejemplo, en determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , pero no comprende un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR2 de  $V_H$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR3 de  $V_H$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR1 de  $V_L$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR2 de  $V_L$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR3 de  $V_L$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$  o un dominio CDR2 de  $V_L$ ).

En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende dos cualesquiera de un dominio CDR1 de  $V_H$ , dominio CDR2 de  $V_H$ , dominio CDR3 de  $V_H$ , dominios CDR1 de  $V_L$ , dominio CDR2 de  $V_L$  o dominio CDR3 de  $V_L$ , pero no comprende ningún otro dominio CDR, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención (por ejemplo, en determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende un dominio CDR1 de  $V_H$  y un dominio CDR2 de  $V_H$ , pero no comprende un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR2 de  $V_H$  y un dominio CDR3 de  $V_H$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR1 de  $V_H$  y un dominio CDR3 de  $V_H$ , pero no comprende un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR1 de  $V_L$  y un dominio CDR2 de  $V_L$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR1 de  $V_L$  y un dominio CDR3 de  $V_L$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$  o un dominio CDR2 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR2 de  $V_L$  y un dominio CDR3 de  $V_L$ , pero no comprende un dominio CDR1 de  $V_H$ , un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$  o un dominio CDR1 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR1 de  $V_H$  y un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$ , un dominio CDR2 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR1 de  $V_H$  y un dominio CDR2 de  $V_L$ , pero no comprende un dominio CDR2 de  $V_H$ , un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$  o un dominio CDR3 de  $V_L$ ; o comprende un dominio CDR1 de  $V_H$  y un dominio CDR3 de  $V_H$ , un dominio CDR1 de  $V_L$  o un dominio CDR2 de  $V_L$ ).



de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR2 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR2 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR2 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR3 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR3 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR3 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>; o comprende dos dominios CDR3 de V<sub>H</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende dos dominios CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>, etc.).

En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende tres cualesquiera de un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o dominio CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende ningún otro dominio CDR, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención (por ejemplo, en determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>; o comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> y un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, pero no comprende un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende dos dominios CDR3 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; etc.).

En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende cuatro cualesquiera de un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o dominio CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende ningún otro dominio CDR, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención (por ejemplo, en determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, o un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> y un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR3 de V<sub>H</sub> o un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>L</sub> y un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub> o un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>; o comprende dos dominios CDR3 de V<sub>H</sub> y dos dominios CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> o un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>; etc.).

En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende cinco cualesquiera de un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, dominio CDR2 de V<sub>L</sub> o dominio CDR3 de V<sub>L</sub>, pero no comprende ningún otro dominio CDR, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención, en el que dichos dominios CDR se han aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención (por ejemplo, en determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, un dominio CDR1 de V<sub>L</sub> y un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>, pero no comprende un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>; o comprende un dominio CDR1 de V<sub>L</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>L</sub>, un dominio CDR3 de V<sub>L</sub>, un dominio CDR2 de V<sub>H</sub> y un dominio CDR3 de V<sub>H</sub>, pero no comprende un dominio CDR1 de V<sub>H</sub>; etc.).

En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención comprende uno o más de los dominios de entramado aislados y/o identificados mediante los métodos de la invención. En realizaciones específicas, el polipéptido inmunoespecífico de la presente invención comprende los dominios de entramado identificados en el presente documento con secuencias de CDR heterólogas injertadas en el mismo.

Los polipéptidos de la invención incluyen moléculas de inmunoglobulina que pueden derivarse de cualquier especie (por ejemplo, conejo, ratón, rata), pero son preferiblemente moléculas de inmunoglobulina humanas que pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) o subclase. Los polipéptidos inmunoespecíficos, por ejemplo, anticuerpos, de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo,

síntesis química o técnicas recombinantes.

En determinadas realizaciones, el polipéptido inmuno específico de la invención no comprende un dominio V<sub>H</sub>, por ejemplo, un dominio V<sub>H</sub> de conejo, y/o no comprende un dominio V<sub>H</sub> derivado de cualquier otra especie distinta de conejo. En otras realizaciones, el polipéptido inmuno específico de la invención no comprende un dominio V<sub>L</sub> y/o no comprende un dominio V<sub>L</sub> derivado de cualquier especie distinta de conejo. En realizaciones preferidas, el polipéptido inmuno específico de la invención comprende un dominio V<sub>H</sub> y no comprende un dominio V<sub>L</sub>. En otras realizaciones, el polipéptido inmuno específico de la invención comprende un dominio V<sub>L</sub> y no comprende un dominio V<sub>H</sub>. En realizaciones específicas, los polipéptidos inmuno específicos de la invención, por ejemplo, anticuerpos, comprenden uno o más de un dominio FR1 de V<sub>H</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTCTAS (SEQ ID NO: 57); un dominio FR2 de V<sub>H</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKLEWIG (SEQ ID NO: 69); un dominio FR3 de V<sub>H</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTATYYCAR (SEQ ID NO: 95); un dominio FR4 de V<sub>H</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 139); un dominio FR1 de V<sub>L</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos ELVLTQTPPSLSASVGETVIRIC (SEQ ID NO: 150) o ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 155); un dominio FR2 de V<sub>L</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos WYQQKPEKPTLLIS (SEQ ID NO: 174) o WYQQKPGQRPKLLIY (SEQ ID NO: 181); un dominio FR3 de V<sub>L</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos GVPFRFSGSGSDTYTLTIGGVQAEDVATYYC (SEQ ID NO: 183) o GVSSRFKSGSGTQFTLTISGVQCADAATYYC (SEQ ID NO: 205); o un dominio FR4 de V<sub>L</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos FGAGTNVEIK (SEQ ID NO: 206) o FAFGGGTELEIL (SEQ ID NO: 210). En otras realizaciones, los polipéptidos inmuno específicos de la invención, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, dominios variables individuales), comprenden uno o más de un dominio FR de V<sub>H</sub> de la tabla 3, un dominio FR2 de V<sub>H</sub> de la tabla 4, dominio FR3 de V<sub>H</sub> de la tabla 5, un dominio FR4 de V<sub>H</sub> de la tabla 6, un dominio FR1 de V<sub>L</sub> de la tabla 7, un dominio FR2 de V<sub>L</sub> de la tabla 8, un dominio FR3 de V<sub>L</sub> de la tabla 9 o un dominio FR4 de V<sub>L</sub> de la tabla 10 en la sección 6.1.2.

En realizaciones específicas adicionales, los polipéptidos inmuno específicos de la invención, por ejemplo, anticuerpos, comprenden uno o más residuos de armazón que mejoran la estabilidad y/o la afinidad de unión a antígeno de los péptidos. En determinadas realizaciones, los polipéptidos inmuno específicos de la invención comprenden uno o más de una fenilalanina en la posición 46 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>; un ácido glutámico en la posición 53 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>; una arginina en la posición 54 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>; una glicina en la posición 56 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>; una alanina en la posición 58 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>; una cisteína en la posición 44 en el dominio CDR1 de V<sub>H</sub>; una cisteína en la posición 59 en el dominio CDR2 de V<sub>H</sub>; una arginina en la posición 126 en el dominio FR4 de V<sub>H</sub>; una fenilalanina o una tirosina en la posición 39 en el dominio FR2 de V<sub>L</sub>; una lisina en la posición 45 en el dominio FR2 de V<sub>L</sub>; o una cisteína en la posición 91 en el dominio FR3 de V<sub>L</sub>, en los que dichas posiciones son según las alineaciones de secuencias de aminoácidos del dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> presentadas en las figuras 3 y 4, respectivamente.

La presente invención también abarca el uso de polipéptidos inmuno específicos o fragmentos de los mismos que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios variables, CDR, secuencias de aminoácidos de armazón (por ejemplo, dominios de entramado tales como los enumerados en las tablas 3-10 en la sección 6.1.2), o residuos de aminoácidos de armazón de la invención con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en cualquiera de los anteriores. En ejemplos específicos según esta realización, la presente invención abarca polipéptidos inmuno específicos que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos, en la que dichas sustituciones dan como resultado uno o más de, en la posición 46 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una fenilalanina; en la posición 53 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, un ácido glutámico; en la posición 54 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una arginina; en la posición 56 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una glicina; en la posición 58 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una alanina; en la posición 44 en el dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 59 en el dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 126 en el dominio FR4 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 39 en el dominio FR2 de V<sub>L</sub>, una fenilalanina o una tirosina; en la posición 45 en el dominio FR2 de V<sub>L</sub>, una lisina; o en la posición 91 en el dominio FR3 de V<sub>L</sub>, una cisteína. Preferiblemente, mutaciones en estas regiones, dominios o residuos mantienen o potencian la avidéz y/o afinidad del polipéptido inmuno específico por el antígeno, es decir epítipo, al que se unen inmuno específicamente. Las posiciones mencionadas son según las alineaciones de secuencias de aminoácidos del dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> presentadas en las figuras 3 y 4, respectivamente.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen inmuno específicamente a un epítipo de un antígeno que es neutro inmunológicamente o no inmunogénico en ratones y/o ratas.

La presente invención también abarca polipéptidos inmuno específicos de la invención que se han modificado mediante cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento que se sabe que aumenta o mejora la semivida en suero de polipéptidos terapéuticos. Los ejemplos no limitativos de tales modificaciones incluyen pegilación, acetilación y el uso de aminoácidos no naturales. En determinadas realizaciones, la semivida en suero del polipéptido inmuno específico puede aumentarse o mejorarse incluyendo en el polipéptido un dominio de unión a antígeno adicional, dominio que se une inmuno específicamente a albúmina o fibronectina.

Los métodos de la invención también abarcan polinucleótidos que codifican para los polipéptidos inmuno-específicos de la invención. En una realización, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica para un dominio  $V_H$  o  $V_L$  identificado o construido mediante los métodos descritos en el presente documento. La invención abarca además polinucleótidos que codifican para polipéptidos inmuno-específicos, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden secuencias de aminoácidos de armazón novedosas (en relación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de especies distintas de conejo), residuos de aminoácido novedosos en posiciones particulares de la secuencia de aminoácidos de  $V_H$  o  $V_L$ , o secuencias de aminoácidos novedosas de bucles de CDR identificadas mediante los métodos descritos en el presente documento. La invención se refiere además a un vector que comprende dicho ácido nucleico. En realizaciones específicas en las que el polipéptido inmuno-específico de la invención comprende tanto un dominio  $V_H$  como uno  $V_L$  identificado, aislado o construido mediante los métodos de la invención, la invención proporciona un vector que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica para dicho dominio  $V_H$  y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica para dicho dominio  $V_L$ , seleccionándose dichos dominios  $V_H$  y  $V_L$  de manera independiente o simultánea para la unión inmuno-específica al mismo antígeno y/o epítipo. En una realización específica, dicho vector es un vector de expresión. La invención proporciona además células huésped que contienen los vectores de polinucleótidos que codifican para los polipéptidos de la invención.

La presente invención abarca polipéptidos inmuno-específicos, por ejemplo, anticuerpos, fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a agentes terapéuticos o dominios de unión a antígeno adicionales, por ejemplo, polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o parte del mismo, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. No es necesario que la fusión sea necesariamente directa, sino que puede producirse a través de secuencias ligadoras o a través de conjugación química. Los polipéptidos inmuno-específicos de la invención pueden usarse por ejemplo para dirigir el agente terapéutico a tipos de células particulares, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, fusionando o conjugando el agente con los polipéptidos inmuno-específicos de la presente invención que son específicos para receptores de la superficie celular particulares. En otras realizaciones, los dominios de unión a antígeno adicionales pueden usarse para unir los polipéptidos inmuno-específicos de la invención a albúmina o fibronectina, mejorando de ese modo la semivida en suero (véase, por ejemplo, Holt *et al.*, 2008, Protein Eng Des Sel 21:283-288 y Stork *et al.*, 2007, Protein Eng Des Sci 20:569-576). Las fusiones de agente terapéutico/polipéptido inmuno-específico de la invención pueden usarse también en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, la publicación PCT número WO 93/2 1232; el documento EP 439.095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett., 39:91-99, 1994; la patente estadounidense número 5.474.981; Gillies *et al.*, PNAS, 89:1428-1432, 1992; y Fell *et al.*, J. Immunol., 146:2446-2452, 1991. No debe interpretarse que los agentes terapéuticos para su uso según los métodos de la invención se limitan a agentes terapéuticos químicos clásicos (por ejemplo, agentes quimioterápicos), sino que pueden incluir péptidos que pueden o no modificar o alterar respuestas biológicas, restos farmacológicos, materiales radiactivos, quelantes macrocíclicos y ARNip. En ejemplos no limitativos, tales polipéptidos como agentes terapéuticos pueden incluir albúmina, protamina, proteínas que interaccionan con albúmina (por ejemplo, gp60, gp30, gp18), proteína A, una proteína G, dominios de transducción de proteínas (véase por ejemplo, Bogoyevitch *et al.*, 2002, DNA Cell Biol 12:879-894), toxinas, citotoxinas o partes de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, dominio Fc, dominio  $CH_1$ , dominio  $CH_2$ , dominio  $CH_3$ , dominio CL, etc.); tales radionúclidos pueden incluir radionúclidos (por ejemplo, emisores alfa, beta, gamma, etc.) conocidos en la técnica para marcar (es decir, producir una señal detectable *in vivo* o *in vitro*) y/o producir un efecto terapéutico (por ejemplo,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{14}C$ , etc.); tales quelantes macrocíclicos incluyen los conocidos en la técnica para conjugar iones radiometálicos (por ejemplo, DOTA).

En determinadas realizaciones, las regiones CDR y/o de entramado de los polipéptidos inmuno-específicos de la invención se derivan de regiones  $V_H$  o  $V_L$  de conejo identificadas o aisladas mediante los métodos descritos en el presente documento. En otras realizaciones, las regiones CDR y/o de entramado de los polipéptidos inmuno-específicos de la invención no se derivan de regiones  $V_H$  o  $V_L$  de conejo identificadas o aisladas mediante los métodos descritos en el presente documento, sino que comprenden secuencias de aminoácidos de armazón novedosas y/o residuos de aminoácido novedosos en determinadas posiciones de la secuencia de aminoácidos de los dominios  $V_H$  o  $V_L$  identificados mediante los métodos de la invención. En algunas realizaciones, los polipéptidos inmuno-específicos de la invención descritos en el presente documento comprenden alteraciones adicionales, incluyendo, pero sin limitarse a, deleciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos, de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  aisladas e identificadas en el presente documento.

Preferiblemente, los polipéptidos inmuno-específicos, por ejemplo anticuerpos, de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son monoclonales (es decir, se unen al mismo epítipo de un antígeno), y en determinadas realizaciones pueden estar humanizados.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende (i), y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas para su uso según los

métodos de la invención, comprendiendo dichas composiciones farmacéuticas una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido inmunoespecífico de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

### 3.1 Definiciones

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "análogo" en el contexto de agentes proteínicos (por ejemplo, proteínas, polipéptidos y anticuerpos) se refiere a un agente proteínico que presenta una función similar o idéntica que un segundo agente proteínico pero que no comprende necesariamente una secuencia de aminoácidos similar o idéntica del segundo agente proteínico, o presenta una estructura similar o idéntica del segundo agente proteínico. Un agente proteínico que tiene una secuencia de aminoácidos similar se refiere a un segundo agente proteínico que  
 10 satisface al menos uno de los siguientes: (a) un agente proteínico que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de un segundo agente proteínico; (b) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica para un segundo agente proteínico de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 residuos de aminoácido contiguos, al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos o al menos 150 residuos de aminoácido contiguos; y (c) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% a la secuencia de nucleótidos que codifica para un segundo agente proteínico. Un agente proteínico con estructura similar a un segundo agente proteínico se refiere a un agente proteínico que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar al segundo agente proteínico. La estructura de un polipéptido puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, secuenciación de péptidos, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular y microscopía electrónica  
 30 cristalográfica.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácido nucleico para la alineación óptima con un segundo aminoácido o secuencia de ácido nucleico; véanse, por ejemplo, las figuras 3-4). Entonces se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones solapantes idénticas/número total de posiciones. veces.100%). En una realización, las dos secuencias son de la misma longitud.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Se incorpora un algoritmo de este tipo en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos en BLAST con los parámetros del programa de nucleótidos NBLAST fijados, por ejemplo, para una puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de la presente invención. Pueden realizarse búsquedas de proteínas en BLAST con los parámetros del programa XBLAST fijados, por ejemplo, a una puntuación de 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente invención. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, puede usarse PSI-BLAST para realizar una búsqueda repetida que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defectos de los respectivos programas (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, el sitio web de NCBI). Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Se incorpora un algoritmo de este tipo en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, pueden usarse una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o no huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, normalmente sólo se cuentan las coincidencias exactas.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “análogo” en el contexto de un agente no proteínico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que presenta una función similar o idéntica que una primera molécula orgánica o inorgánica y que es estructuralmente similar a la primera molécula orgánica o inorgánica.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “derivado” en el contexto de polipéptidos o proteínas, incluyendo polipéptidos inmuno-específicos (por ejemplo, anticuerpos), se refiere a un polipéptido o una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácido. El término “derivado” tal como se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido o una proteína que se ha modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o la proteína. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un polipéptido inmuno-específico de la invención puede modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede producirse un derivado de polipéptido o proteína mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de polipéptido o proteína presenta una función similar o idéntica que el polipéptido o la proteína del que se derivó.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” se refiere a una región en una molécula de antígeno a la que un anticuerpo se une específicamente. Las moléculas de antígeno pueden comprender epítopos individuales o múltiples.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 residuos de aminoácido contiguos, al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, al menos 200 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido conserva al menos una función del polipéptido. Preferiblemente, fragmentos de los polipéptidos inmuno-específicos de la invención son fragmentos de unión a antígeno (en particular, fragmentos de unión a epítipo).

35 Tal como se usan en el presente documento, los términos “cadena pesada”, “cadena ligera”, “región variable”, “región de entramado”, “dominio constante”, y similares, tienen su significado habitual en la técnica de la inmunología y se refieren a dominios en inmunoglobulinas que se producen de manera natural y los dominios correspondientes de proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes) (por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de inmunoglobulinas que se producen de manera natural (por ejemplo, IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, expresadas habitualmente como una glicoproteína de aproximadamente 150.000 Da. La parte amino terminal (“N”) de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxilo terminal (“C”) de cada cadena define una región constante, con cadenas ligeras que tienen un solo dominio constante y cadenas pesadas que tienen habitualmente tres dominios constantes y una región de bisagra. Por tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, es n-V<sub>L</sub>--CL-c y la estructura de las cadenas pesadas de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, es n-V<sub>H</sub>--CH<sub>1</sub>-H--CH<sub>2</sub>--CH<sub>3</sub>-c (en la que H es la región de bisagra). Las regiones variables de los polipéptidos inmuno-específicos de la invención, por ejemplo, anticuerpos, consisten en las regiones determinantes de complementariedad (CDR), que contienen los residuos en contacto con antígeno y segmentos distintos de CDR, denominados segmentos de entramado, que en general mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los bucles de CDR (aunque determinados residuos de entramado también pueden entrar en contacto con el antígeno). Por tanto, los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> tienen la estructura n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c.

55 Tal como se usan en el presente documento, los términos “anticuerpo humanizado” o “polipéptido inmuno-específico humanizado” se refieren a un polipéptido que comprende al menos un dominio variable de inmunoglobulina que comprende una región de entramado humana y una o más CDR identificadas mediante los métodos de la invención. En algunas realizaciones, el polipéptido inmuno-específico de la invención no comprende una inmunoglobulina completa, o puede comprender un solo dominio variable de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>) y no comprende ningún otro dominio o región de inmunoglobulina (por ejemplo, Fc, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CL, etc.). El polipéptido inmuno-específico (por ejemplo, anticuerpo o dominio variable) que proporciona las CDR se denomina el

“donador” y la inmunoglobulina humana, o fragmento de la misma (por ejemplo, dominio variable) que proporciona el entramado se denomina el “ceptor”. No es necesario que estén presentes regiones constantes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, idénticas en al menos aproximadamente el 85-90%, de manera preferible aproximadamente el 95% o más. Por tanto, según las realizaciones en las que el polipéptido inmuno específico de la invención comprende una inmunoglobulina humanizada, todas las partes de dicha inmunoglobulina, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana naturales. En el contexto de polipéptidos inmuno específicos tal como se usan en el presente documento, es decir, polipéptidos que comprenden al menos un dominio variable (o fragmento de unión a epítipo del mismo), las moléculas humanizadas de la invención, por ejemplo, anticuerpos, no abarcan moléculas quiméricas de la invención porque, por ejemplo, toda la región variable de la molécula quimérica sería no humana. Se dice que la molécula donadora se ha “humanizado”, mediante el proceso de “humanización”, porque se espera que la molécula humanizada resultante se una al mismo antígeno que el anticuerpo donador que proporciona las CDR. Generalmente, moléculas inmuno específicas humanizadas son inmunoglobulinas humanas (o dominios variables y/o fragmentos de las mismas), la molécula receptora, en la que se reemplazan residuos de regiones hipervariables de receptor por residuos de regiones hipervariables de una especie no humana (anticuerpo donador; por ejemplo, CDR donadoras de un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de conejo) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de regiones de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana, o fragmento de la misma, por residuos no humanos correspondientes. Además, las moléculas humanizadas pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente la funcionalidad, por ejemplo, la inmunoespecificidad. En general, la molécula humanizada, por ejemplo, anticuerpo, comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana o dominio variable y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. La molécula humanizada también comprenderá opcionalmente en un dominio CL y/o  $CH_1$  y/o al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc). En algunas realizaciones, una molécula humanizada de la invención es un derivado. Una molécula humanizada de este tipo comprende sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácido en una o más de las CDR no humanas, por ejemplo, de conejo. El derivado de la molécula humanizada de la invención puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión o peor unión en comparación con una molécula humanizada no derivada de la invención. En realizaciones específicas, uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácido de las CDR identificadas y/o construidas según los métodos de la invención se han sustituido, delecionado o añadido (es decir, mutado). Para detalles adicionales sobre la humanización de anticuerpos, véanse las patentes europeas n.ºs EP 239.400, EP 592.106 y EP 519.596; las publicaciones internacionales n.ºs WO 91/09967 y WO 93/17105; las patentes estadounidenses n.ºs 5.225.539, 5.530.101, 5.565.332, 5.585.089, 5.766.886 y 6.407.213; y Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969-973; Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25; Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13:353-60; Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20:267-79; Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84; Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9:895-904; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (sup. 23): 5973s-5977s; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10; Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-329; y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. El término “humanización” también incluye métodos de modificación de la superficie de proteínas y/o anticuerpos tales como los dados a conocer en las patentes estadounidenses 5.770.196; 5.776.866; 5.821.123; y 5.896.619, cada una concedida a Studnicka *et al.*

Tal como se usan en el presente documento, los términos “se une inmuno específicamente”, “reconoce inmuno específicamente”, “se une específicamente”, “reconoce específicamente” y términos análogos se refieren a moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, epítipo o complejo inmunitario) y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menos afinidad tal como se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de manera cruzada con otras proteínas. Pueden identificarse moléculas que se unen específicamente a un antígeno, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “polipéptidos inmuno específicos” y “polipéptido inmuno específico” se refieren a polipéptidos, péptidos y/o proteínas que comprenden al menos uno de un dominio  $V_H$  o un dominio  $V_L$  y muestran unión inmuno específica tal como se determina mediante cualquier método conocido en la técnica para evaluar la especificidad antígeno/anticuerpo (por ejemplo, BIAcore). Los términos pueden referirse a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id frente a anticuerpos de la invención), diacuerpos (véanse por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.ºs 2007/0004909 y 2006/0210564, minicuerpos (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 5.837.821 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0003556, nanocuerpos (véase, por ejemplo, Revets *et al.*, 2005, *Expert Opin Biol Ther* 5:111-124, o fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de

los anteriores, incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv biespecíficos unidos por puentes disulfuro (sdFv) e intracuerpos. Los términos también incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno, y pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) o subclase. Los términos también pueden referirse a moléculas biespecíficas o multiespecíficas que comprenden dos o más moléculas de unión a antígeno, al menos una de las cuales es un dominio V<sub>H</sub> o un dominio V<sub>L</sub> determinado mediante los métodos de la invención, o al menos uno de los cuales comprende una región de entramado de dominio variable determinada mediante los métodos de la invención.

Cuando se hace referencia a polipéptidos inmuno-específicos de la invención, por ejemplo, anticuerpos, (tal como se definen ampliamente en el presente documento), la asignación de aminoácidos a cada dominio es según métodos bien conocidos en la técnica para la caracterización de dominios variables de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, dominios variables de dominios variables humanos, murinos y de conejo. Aminoácidos del dominio variable de conejo de cadenas pesadas y ligeras maduras aisladas e identificadas mediante los métodos de la presente invención se diseñan por su posición en las secuencias de alineación presentadas en la figura 3 para el dominio V<sub>H</sub> y en la figura 4 para el dominio V<sub>L</sub>. Por ejemplo, el dominio FR1 de un dominio V<sub>H</sub> de conejo aislado y/o identificado mediante los métodos de la invención comprende normalmente desde 24 hasta 31 residuos de aminoácido, cada uno de los cuales se designa por su posición en una secuencia de alineación basada en la secuencia de aminoácidos más larga para cada dominio (véase, por ejemplo, la figura 4). Por consiguiente, un dominio variable específico puede comprender o no un residuo en una posición particular de la secuencia de alineación. Las alineaciones presentadas en las figuras 3-4 y las determinaciones de dominios específicos de los polipéptidos de la invención se determinaron según métodos conocidos en la técnica para caracterizar y alinear secuencias basándose en moléculas de inmunoglobulina (por ejemplo, alineadas según Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, NH1, MD (1991)). Por tanto, tal como se presenta en la figura 3, en la secuencia de alineación del dominio V<sub>H</sub>, el FR1 consiste en las posiciones 1-31, el CDR1 en las posiciones 32-44, el FR2 en las posiciones 45-58, el CDR2 en las posiciones 59-69, el FR3 en las posiciones 70-110, el CDR3 en las posiciones 111-125 y el FR4 en las posiciones 126-136; y tal como se representa en la figura 4, en la secuencia de alineación del dominio V<sub>L</sub> el FR1 consiste en las posiciones 1 a 23, el CDR1 en las posiciones 24 a 37, el FR2 en las posiciones 38-52, el CDR2 en las posiciones 53 a 59, el FR3 en las posiciones 60 a 91, el FR4 en las posiciones 92-105 y el FR4 en las posiciones 106-116B.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas de ADN/ARN híbridas, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Tales análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, bases de inosina o tritiladas. Tales análogos pueden comprender también moléculas de ADN o ARN que comprenden estructuras principales modificadas que confieren atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasa o un aumento de la capacidad para cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener porciones tanto monocatenarias como bicatenarias, y pueden contener porciones tricatenarias, pero preferiblemente ADN bicatenario.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente que pueda usarse en la prevención de un trastorno, o la prevención de la recaída o propagación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la recaída o propagación de una enfermedad, la recaída o exacerbación de síntomas de una enfermedad, o la aparición de los mismos en un sujeto. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de una enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la invención significa la cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de una enfermedad.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994). En realizaciones específicas, los scFv incluyen scFv biespecíficos y scFv humanizados.

Tal como se usa en el presente documento, el término "estable" en el contexto de una formulación que comprende un polipéptido inmuno-específico de la invención se refiere a una formulación en la que la proteína en la misma conserva esencialmente su estabilidad física y química e integridad tras almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug*

Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para una selección rápida, la formulación puede mantenerse a 40°C durante de 2 semanas a 1 mes, momento en el que se mide la estabilidad. Cuando la formulación va a almacenarse a 2-8°C, generalmente la formulación debe ser estable a 30°C o 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8°C durante al menos 2 años.

5 Cuando la formulación va a almacenarse a 30°C, generalmente la formulación debe ser estable durante al menos 2 años a 30°C y/o estable a 40°C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, puede usarse el grado de agregación tras liofilización y almacenamiento como indicador de la estabilidad de proteínas. Por ejemplo, una formulación "estable" puede ser una en la que menos de aproximadamente el 10% y preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de la proteína está presente como agregado en la formulación. En otras realizaciones, puede determinarse cualquier  
10 aumento en la formación de agregados tras liofilización y almacenamiento de la formulación liofilizada. Por ejemplo, una formulación liofilizada "estable" puede ser una en la que el aumento de agregados en la formulación liofilizada es inferior a aproximadamente el 5% y preferiblemente inferior a aproximadamente el 3%, cuando la formulación liofilizada se almacena a 2-8°C durante al menos un año. En otras realizaciones, la estabilidad de la formulación de proteínas puede medirse usando un ensayo de actividad biológica.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "estable" en el contexto de un polipéptido inmunoespecífico de la invención puede referirse a la estabilidad cinética de una proteína, o a la resistencia de una proteína al desplegamiento. La estabilidad cinética puede explicarse de la mejor manera ilustrando el proceso de desplegamiento como una simple reacción en equilibrio entre dos conformaciones de la proteína, el estado plegado nativo (N) y el estado desplegado (U), que normalmente está separado por un estado de transición de energía superior (TS). Puesto que la altura de la barrera de TS determina la velocidad de plegamiento y desplegamiento, las proteínas cinéticamente estables presentan un TS de energía inusualmente alto, lo que da como resultado  
20 velocidades de desplegamiento extremadamente bajas que prácticamente atrapan a la proteína en su estado nativo. Aun cuando el cambio global en energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) pueda ser favorable para el desplegamiento en condiciones de disolvente extremas, tales como altas concentraciones de agente desnaturante, la alta energía de activación del TS ralentiza significativamente la velocidad de desplegamiento de proteínas cinéticamente estables. Se conocen bien en la técnica métodos para evaluar la estabilidad de polipéptidos e incluyen, por ejemplo, espectroscopía de fuerza de una sola molécula, evaluación de la desnaturalización térmica, por ejemplo, monitorizada mediante dispersión dinámica de luz ("DLS"), y resistencia a la desnaturalización con SDS (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense 2006/0099647). La estabilidad también puede  
25 evaluarse mediante las características de expresión de proteínas en sistemas de expresión recombinante. Los polipéptidos que se pliegan fácilmente, y que son resistentes al desplegamiento, se expresarán como proteína soluble en tales sistemas, mientras que proteínas plegadas de manera inapropiada o sólo parcialmente interaccionan por medio de sus regiones hidrófobas formando cuerpos de inclusión. Los inventores han implementado adicionalmente un ensayo de estabilidad basado en la solubilidad de una proteína recombinante, en el que dicha proteína se expresa como una fusión con CAT y se evalúa la actividad de CAT de la fusión (véase más  
30 adelante en el presente documento).  
35

Tal como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto es preferiblemente un mamífero tal como un mamífero no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un mamífero primate (por ejemplo, mono y ser humano), lo más preferiblemente un ser humano.  
40

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente terapéutico de la invención suficiente para tratar o gestionar una enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar la aparición de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del  
45 agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfermedad, por ejemplo, suficiente para potenciar la eficacia terapéutica de una cantidad de agente terapéutico de la invención suficiente para tratar o gestionar una enfermedad.

#### 50 4. Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática de la posición de los cebadores en la secuencia de nucleótidos del dominio variable de cadena pesada.

Figura 2A-2B. Representación esquemática de la posición de los cebadores en la secuencia de nucleótidos del dominio variable de cadena ligera; (A) cadena  $\kappa$ ; (B) cadena  $\lambda$ .

55 Figura 3. Alineación a modo de ejemplo de secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada (dominios  $V_H$ ) seleccionados mediante los métodos de la invención.



Figura 4. Alineación a modo de ejemplo de secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena ligera (dominios  $V_L$ ) seleccionados mediante los métodos de la invención.

Figura 5. Representación esquemática del vector de expresión que permite la expresión de los dominios SDVL y/o SDVH como proteínas de fusión con CAT.

5 Figura 6A-B. Fluorescencia intrínseca de las curvas de transición de desplegamiento de un dominio SDVL representativo de la invención. (A) Desplegamiento inducido por calor; (B) desplegamiento inducido por GdmCl.

## 5. Descripción detallada

### 5.1 Polipéptidos inmuno-específicos

10 La presente invención se refiere polipéptidos inmuno-específicos diseñados por ingeniería genética, modificados, por ejemplo, anticuerpos, que tienen dominios  $V_H$  y/o  $V_L$ , o porciones de los mismos (por ejemplo, dominios CDR, dominios de entramado, etc.) derivados de conejos. En realizaciones preferidas, la presente invención abarca anticuerpos de un solo dominio derivados de dominios variables de inmunoglobulina de conejo y/o fragmentos de unión a epítipo de los mismos. Los presentes inventores han descubierto que dominios variables de conejo mantienen una estabilidad única y conservan una alta afinidad de unión cuando se expresan de manera recombinante como dominios individuales.

15 La presente invención abarca métodos para el aislamiento y el uso de dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  de conejo y/o regiones de entramado y CDR novedosas derivadas de los mismos. La invención proporciona además la identificación de secuencias de aminoácidos novedosas (que incluyen residuos de aminoácido novedosos en posiciones definidas) dentro de dominios  $V_H$  y  $V_L$  de conejo aislados para su uso como "armazón" o secuencias estructurales en el contexto de bucles de CDR y/o regiones de entramado en polipéptidos inmuno-específicos recombinantes. Las secuencias de armazón de conejo (incluyendo residuos de armazón) o secuencias de entramado/CDR novedosas de la invención potencian la estabilidad y/o afinidad del/de los dominio(s) variable(s) y/o polipéptidos inmuno-específicos (por ejemplo, anticuerpos) que las contienen, en particular, en relación con anticuerpos de roedor, que permiten la producción y/o el uso de inmunopéptidos de un solo dominio, altamente específicos, por ejemplo, anticuerpos de un solo dominio.

20 La presente invención abarca la producción de dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo novedosos con especificidad por un antígeno dado, o epítipo del mismo. En particular, la invención proporciona un método de producción de dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, comprendiendo dicho método: (a) seleccionar de una biblioteca de expresión en fago un conjunto de secuencias de ADN que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo que se unen inmuno-específicamente a un antígeno deseado o epítipo del mismo (también conocido como "cribado" de fagos) y (b) expresar el conjunto de secuencias, o un subconjunto del mismo, en bacterias como una proteína de fusión con cloranfenicol acetiltransferasa ("CAT") y seleccionar bacterias que tienen resistencia a cloranfenicol en virtud de la expresión de CAT. En realizaciones alternativas, la presente invención proporciona un método de producción de dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, comprendiendo dicho método (a) expresar secuencias de ADN o ADNc que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de inmunoglobulinas de conejo en bacterias como una proteína de fusión con CAT, (b) seleccionar bacterias que tienen resistencia a cloranfenicol en virtud de la expresión de CAT y obtener el conjunto de secuencias de ADN que codifican para los dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo a partir de las bacterias seleccionadas, y (c) preparar una biblioteca de expresión en fago a partir del conjunto de secuencias de ADN obtenido en la etapa (b) y seleccionar secuencias de ADN que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  que se unen inmuno-específicamente a un antígeno deseado o epítipo del mismo (es decir, cribado de la biblioteca para detectar unión inmuno-específica al antígeno o epítipo). En determinadas realizaciones, la presente invención abarca métodos para la producción de un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de conejo en los que la etapa de cribado de fagos se repite una o más veces. En realizaciones relacionadas, la etapa de cribado de fagos puede repetirse o no secuencialmente. La biblioteca de expresión en fago para su uso según la presente invención puede obtenerse comercialmente o prepararse mediante cualquier método descrito en el presente documento y/o conocido en la técnica. La expresión de secuencias de ADN o ADNc en bacterias como proteínas de fusión se conoce bien y puede realizarse mediante cualquier método descrito en el presente documento o conocido en la técnica, por ejemplo, clonando la secuencia de ADN o ADNc que codifica para el dominio  $V_H$  o  $V_L$  en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para CAT y una secuencia promotora que dirige la expresión de la proteína de fusión. La invención abarca además el dominio  $V_H$  y/o  $V_L$ , o fragmentos del mismo, producido mediante los métodos descritos en el presente documento. La invención también abarca las secuencias de aminoácidos de armazón novedosas o residuos de aminoácido de armazón (en posiciones definidas del dominio variable de la invención) aislados y/o identificados mediante estos métodos.

25 En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos de un solo dominio que comprenden dos dominios  $V_H$ . En otra realización, la presente invención proporciona un fragmento de un anticuerpo de un solo dominio que comprende un dominio  $V_H$ . En todavía otras realizaciones, la invención proporciona un polipéptido inmuno-específico que comprende un solo dominio  $V_H$  o  $V_L$  y que no comprende ningún otro dominio derivado de inmunoglobulina (por ejemplo, dominio CL, dominio CH<sub>1</sub>, dominio CH<sub>2</sub>, dominio CH<sub>3</sub>, dominio Fc, etc.). Antes de la presente invención, los

anticuerpos de un solo dominio se basaban principalmente en los anticuerpos del género *Camelus*, es decir, anticuerpos de un solo dominio camelizados (véase por ejemplo, Muldermans *et al.*, 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall *et al.*, 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann y Muldermans, 1999, J. Immunol. Met. 231:25; las publicaciones internacionales n.ºs WO 94/04678 y WO 94/25591; la patente estadounidense número 6.005.079.

5 En determinadas realizaciones, los polipéptidos inmuno-específicos de la invención son biespecíficos o multiespecíficos. Pueden formarse moléculas bi- o multiespecíficas de la invención usando cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento, por ejemplo, formarse mediante la creación de un péptido de fusión o conjugado. Las moléculas biespecíficas o multiespecíficas de la invención comprenden al menos un dominio V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>, o al menos una región de entramado de un dominio variable, identificado, aislado o construido  
10 según los métodos de la invención. En determinadas realizaciones, la molécula biespecífica o multiespecífica de la invención comprende más de un dominio V<sub>L</sub> y/o más de un dominio V<sub>L</sub>, dominios que se aislaron, identificaron y/o construyeron mediante los métodos de la invención.

Los polipéptidos inmuno-específicos, por ejemplo, anticuerpos, de la invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id frente a anticuerpos de la invención), diacuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores, incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv biespecíficos unidos por puentes disulfuro (sdFv) e intracuerpos, y fragmentos de unión a epítipo de los mismos. En particular, los  
15 polipéptidos inmuno-específicos, por ejemplo, anticuerpos, de la presente invención incluyen anticuerpos de un solo dominio o moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina.

Las CDR, secuencias de aminoácidos de armazón y/o residuos de aminoácido de armazón de los polipéptidos inmuno-específicos, por ejemplo, anticuerpos, de la presente invención pueden derivarse de cualquier miembro de la familia *Leporidae* (por ejemplo, conejos y liebres) y se derivan preferiblemente de conejos (por ejemplo, conejos blancos de Nueva Zelanda). En determinadas realizaciones, los polipéptidos de la invención son anticuerpos monoclonales humanizados.  
25

La presente invención también abarca polipéptidos inmuno-específicos o fragmentos de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio de entramado que es idéntico en al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de un dominio de entramado de la invención. En determinadas realizaciones, la invención abarca dominios de entramado que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 modificaciones de aminoácido (por ejemplo, inserción, sustitución, delección, etc.) en relación con un dominio de entramado de la invención. La presente invención abarca además polipéptidos inmuno-específicos o fragmentos de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es idéntica en al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR de la invención. En determinadas realizaciones, la invención abarca CDR que comprenden 1, 2, 3, 4 ó 5 modificaciones de aminoácido (por ejemplo, inserción, sustitución, delección, etc.) en relación con una CDR de la invención. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica.  
30  
35  
40

La presente invención también abarca el uso de polipéptidos inmuno-específicos o fragmentos de los mismos que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios variables, CDR, secuencias de aminoácidos de armazón o residuos de aminoácido de armazón (por ejemplo, en las posiciones de dominio variable de cadena pesada FR2 46, 53, 54, 56 y 58, en las posiciones de dominio de cadena pesada CDR1 44 y 59, en la posición de dominio variable de cadena pesada FR4 126, en las posiciones de dominio variable de cadena ligera FR2 39 y 45, y en la posición de dominio variable de cadena ligera FR3 91) de la invención con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido) en cualquiera de los anteriores. En ejemplos específicos según esta realización, la presente invención abarca polipéptidos inmuno-específicos que comprenden una o más sustituciones de aminoácido, en los que dichas sustituciones dan como resultado uno o más de, en la posición 46 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una fenilalanina; en la posición 53 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, un ácido glutámico; en la posición 54 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una arginina; en la posición 46 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una glicina; en la posición 58 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una alanina; en la posición 44 en el dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 59 en el dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 126 en el dominio FR4 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 39 en el dominio FR2 de V<sub>L</sub>, una fenilalanina o una tirosina; en la posición 45 en el dominio FR2 de V<sub>L</sub>, una lisina; o en la posición 91 del dominio FR3 de V<sub>L</sub>, una cisteína. Preferiblemente, las mutaciones en estas regiones, dominios o residuos mantienen o potencian la avidéz y/o afinidad del polipéptido inmuno-específico por el antígeno, es decir epítipo, al que se unen inmuno-específicamente. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, inmunoensayos) para someter a ensayo la afinidad de un polipéptido inmuno-específico, por ejemplo, anticuerpo, por un antígeno particular.  
45  
50  
55  
60

En otras realizaciones, la presente invención abarca el uso de polipéptidos inmunoespecíficos o fragmentos de los mismos que comprenden secuencias de aminoácidos de cualquiera de los dominios variables, CDR, secuencias de aminoácidos de armazón, o que comprenden los residuos de aminoácido de armazón (por ejemplo, en las posiciones de dominio variable de cadena pesada FR2 46, 53, 54, 56 y 58, en las posiciones de dominio de cadena pesada CDR1 44 y 59, en la posición de dominio variable de cadena pesada FR4 126, en las posiciones de dominio variable de cadena ligera FR2 39 y 45, y en la posición de dominio variable de cadena ligera FR3 91) identificados en el presente documento. En determinadas realizaciones, la presente invención abarca polipéptidos inmunoespecíficos que tienen uno o más de, en la posición 46 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una fenilalanina; en la posición 53 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, un ácido glutámico; en la posición 54 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una arginina; en la posición 46 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una glicina; en la posición 58 en el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, una alanina; en la posición 44 en el dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 59 en el dominio CDR1 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 126 en el dominio FR4 de V<sub>H</sub>, una cisteína; en la posición 39 en el dominio FR2 de V<sub>L</sub>, una fenilalanina o una tirosina; en la posición 45 en el dominio FR2 de V<sub>L</sub>, una lisina; o en la posición 91 del dominio FR3 de V<sub>L</sub>, una cisteína. Los residuos de armazón identificados en el presente documento pueden mantener o potenciar la avidéz y/o afinidad del polipéptido inmunoespecífico por el antígeno, es decir epítipo, al que se unen inmunoespecíficamente, en particular, para realizaciones de la invención que comprenden proteínas de unión de un solo dominio, es decir, un polipéptido que comprende únicamente un solo dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub> y que no comprende ningún otro dominio variable de inmunoglobulina. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, inmunoensayos) para someter a ensayo la afinidad de un polipéptido inmunoespecífico, por ejemplo, anticuerpo, por un antígeno particular.

Los polipéptidos usados en los métodos de la invención incluyen derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido inmunoespecífico de la presente invención. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados incluyen polipéptidos inmunoespecíficos que se han modificado, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En determinadas realizaciones, las moléculas inmunoespecíficas de la invención se modifican para aumentar la semivida en suero *in vivo*. Los métodos bien conocidos en la técnica para aumentar la semivida en suero incluyen conjugación o fusión con dominios de anticuerpo que incluyen, pero no se limitan a, regiones constantes de anticuerpo que incluyen regiones Fc y/o de bisagra (véanse por ejemplo, las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 5.565.335 y 6.277.375, y/u otros elementos conocidos tales como péptidos de direccionamiento de interferón y/o timosina, y proteínas que aumentan la permeabilidad (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 6.319.691 y 5.643.570, respectivamente. Cuando la molécula inmunoespecífica de la invención comprende un dominio constante de IgG, tales modificaciones también pueden incluir la introducción de una o más modificaciones de aminoácido (es decir, sustituciones, inserciones o deleciones) en dicho dominio constante o, preferiblemente, en un fragmento de unión a FcRn del mismo (preferiblemente un fragmento de dominio Fc o bisagra-Fc). Véanse, por ejemplo, la publicación internacional n.<sup>o</sup> WO 98/23289; la publicación internacional n.<sup>o</sup> WO 97/34631; y la patente estadounidense n.<sup>o</sup> 6.277.375. Otras modificaciones conocidas en la técnica para prolongar la vida de las moléculas de la invención incluyen el uso de aminoácidos no naturales, por ejemplo en la forma D o, alternativa o adicionalmente, el uso de análogos de aminoácidos, tales como formas que contienen azufre de aminoácidos. Alternativamente, los polinucleótidos y genes de la invención pueden fusionarse de manera recombinante a elementos que son útiles en la preparación de constructos inmunogénicos para los fines de formulación de vacunas o elementos útiles para el aislamiento de los polipéptidos proporcionados.

Las moléculas de la invención pueden contener modificaciones en los extremos C- y/o N-terminales que incluyen, pero no se limitan a amidación o acetilación. En determinadas realizaciones, los residuos de aminoácido contienen cadenas laterales reactivas, por ejemplo cadena lateral de carboxilo en ácido glutámico, que pueden ocuparse por grupos de ocupación de extremos conocidos en la técnica. Acetilación se refiere a la introducción de un grupo COCH<sub>3</sub> o bien en el extremo amino terminal o bien en la(s) cadena(s) lateral(es) de al menos una lisina en el/los péptido(s) o fragmento(s) de péptido. De manera importante, la acetilación puede regular la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, el análisis de E2F1 acetilado *in vivo* muestra que la versión acetilada tiene una semivida más larga (Martínez-Balbás *et al.*, (2000) EMBO J. 19(4):662-71; véase también Takemura *et al.* (1992) J Cell Sci. 103 (Pt 4):953-64. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el extremo amino terminal de las moléculas inmunoespecíficas de la invención se modifica mediante acetilación. En determinadas realizaciones, se modifica una cadena lateral de lisina en la molécula inmunoespecífica. En aún otras realizaciones, la molécula inmunoespecífica de la invención se acetila tanto en el extremo amino terminal como en una cadena lateral de lisina.

La presente invención también abarca el uso de polipéptidos inmunoespecíficos que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido) en las regiones de entramado o variables. Preferiblemente, las mutaciones en estas regiones mantienen o potencian la avidéz y/o afinidad de los anticuerpos por el/los antígeno(s) particular(es),

y/o epítipo, al/a los que se unen inmuno-específicamente. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, inmunoensayos) para someter a ensayo la afinidad de un anticuerpo por un antígeno particular.

5 Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido inmuno-específico de la invención, o fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, lo que da como resultado sustituciones de aminoácido. En determinadas realizaciones, los derivados tienen sustituciones de aminoácido conservativas realizadas en uno o más residuos de aminoácido no esenciales predichos.

10 La presente invención también abarca el uso de polipéptidos inmuno-específicos que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptidos inmuno-específicos de la invención con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácido) en las regiones de entramado o variables. Preferiblemente, las mutaciones en estas regiones mantienen o potencian la avidéz y/o afinidad de los anticuerpos por el/los antígeno(s) particular(es), y/o epítipo, al/a los que se unen inmuno-específicamente. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, inmunoensayos) para someter a ensayo la afinidad de un anticuerpo por un antígeno particular.

15 Pueden generarse polipéptidos inmuno-específicos de la invención, o fragmentos de los mismos, con semividas *in vivo* aumentadas uniendo dichos polipéptidos o fragmentos a moléculas de polímero tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG). Puede unirse PEG a dichos polipéptidos o fragmentos con o sin un ligador multifuncional o bien a través de conjugación específica de sitio del PEG al extremo N- o C-terminal de dichos polipéptidos o fragmentos o bien por medio de grupos épsilon-amino en residuos de lisina. Puede usarse derivatización de polímero lineal o ramificado que da como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede monitorizarse estrechamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar una conjugación apropiada de moléculas de PEG a los polipéptidos inmuno-específicos o fragmentos de la invención. Puede separarse PEG sin reaccionar de conjugados de polipéptido-PEG, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular o de intercambio iónico.

Para algunos usos, incluyendo uso *in vivo* en seres humanos y ensayo de detección *in vitro*, puede ser preferible usar moléculas quiméricas o humanizadas.

30 Se seleccionan secuencias de ácido nucleico que codifican para dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de conejo que se unen inmuno-específicamente a un antígeno y/o un epítipo según tanto la afinidad como la estabilidad usando métodos de examen para cada característica. Usando los métodos de la invención, combinaciones iniciales que codifican para dominios variables de conejo se enriquecerán en secuencias que codifican para polipéptidos inmuno-específicos, por ejemplo, dominios variables de conejo, que presentan alta afinidad por un antígeno de interés así como alta estabilidad (por ejemplo, la capacidad para expresarse apropiadamente y plegarse en sistemas recombinantes, la capacidad para resistir la degradación o agregación en estos sistemas, y para conservar su característica funcional de unión inmuno-específica). En determinadas realizaciones, los polipéptidos codificados por las secuencias se seleccionan según la unión inmuno-específica a un antígeno antes de seleccionarse según la estabilidad. En otras realizaciones, los polipéptidos codificados por las secuencias se seleccionan según la estabilidad antes de seleccionarse según la unión inmuno-específica a un antígeno. La invención abarca métodos en los que se repite una o más veces cualquiera o ambas de las etapas de selección según la unión y/o selección según la estabilidad. La invención abarca además métodos en los que las etapas de selección según la unión y selección según la estabilidad, y/o repeticiones de las mismas, se realizan en cualquier orden una o más veces.

#### 5.1.1 Selección según la afinidad usando presentación en fago

45 Se seleccionan dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de conejo que se unen inmuno-específicamente a un antígeno y/o un epítipo usando los diversos métodos de presentación en fago y cribado conocidos en la técnica. Usando métodos de presentación en fago, se presentan dominios variables de conejo funcionales en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótido que codifican para los mismos. Las partículas de fago se ponen en contacto entonces con un antígeno y/o epítipo de interés y se seleccionan o identifican las partículas que presentan unión inmuno-específica a dicho antígeno y/o epítipo usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido a o capturado en una perla o superficie sólida. Los ejemplos de métodos de presentación en fago que pueden usarse según los métodos de la invención incluyen los dados a conocer en Brinkman *et al.*, J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames *et al.*, J. Immunol. Methods, 184:177-186, 1995; Kettleborough *et al.*, Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic *et al.*, Gene, 187:9-18, 1997; Burton *et al.*, Advances in Immunology, 57:191-280, 1994; la solicitud PCT n.º PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes estadounidenses n.ºs 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

- Las bibliotecas de presentación en fago para su uso en los métodos de la invención pueden obtenerse comercialmente o derivarse de los repertorios de anticuerpos de conejos sin tratamiento previo o inmunizados tal como se describe en el presente documento y/o se conoce en la técnica. Tal como se conoce en la técnica, el polipéptido codificado por el ácido nucleico en el vector de fagémido, y por tanto expresado en la superficie del fago,
- 5 puede ser un solo dominio  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, puede ser un anticuerpo de cadena sencilla, puede ser un scFv o puede ser cualquier fragmento de la cadena pesada o ligera de conejo. En determinadas realizaciones, cada partícula de fago expresa un solo dominio variable en su superficie. En realizaciones alternativas, la partícula de fago expresa un dominio  $V_H$  y uno  $V_L$  en su superficie, de manera que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  interaccionan formando un par de unión.
- 10 Las partículas de fago usadas en los métodos de presentación en fago y cribado son fagos filamentosos y pueden seleccionarse de fagos de clase I (por ejemplo, fd, M13, fl, If1, ke, ZJ/Z, Ff, etc.) o fagos de clase II (por ejemplo, Xf, Pf1, Pf3, etc.), o derivados de los mismos. Las secuencias de nucleótidos que codifican para las porciones de las cadenas pesadas y/o ligeras de conejo, por ejemplo, dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, se expresan a partir de un vector de fagémido, que dirige la expresión de la secuencia en la célula huésped (es decir, bacterias) como una fusión con
- 15 la proteína de la cápside del gen III (pIII) de fd de fago o su homólogo en otro fago filamentosos. La tecnología de presentación en fago abarca el uso de un fago auxiliar, o un plásmido que codifica para genes de fago de complementación, para ayudar en el empaquetamiento del genoma del fagémido, en el que la proteína de fusión pIII es una proteína de la cápside para el mismo.
- Pueden aislarse partículas de fago individuales que expresan las porciones de las cadenas pesadas o ligeras de conejo, y por tanto que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifican para dichas porciones, que presentan especificidad por un antígeno deseado, a partir de la biblioteca usando métodos de examen conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gherardi *et al.*, 1990, *J Immunol Met* 126:61-68). La selección puede lograrse anclando el antígeno y/o epítipo de interés a una superficie sólida (por ejemplo, placa de cultivo, placa de microtitulación, perlas de cromatografía, perlas magnéticas, etc.) y haciendo pasar la biblioteca de partículas de fago sobre el antígeno y/o
- 20 epítipo unido. Los fagos individuales que se unen se retienen tras el lavado y se detectan opcionalmente mediante cualquier sistema de detección conocido en la técnica (por ejemplo, conjugados de anticuerpo anti-fd-enzima). En realizaciones específicas, la proteína de fusión pIII comprende además una secuencia de aminoácidos diana para facilitar la detección mediante conjugados de anticuerpo anti-diana-enzima. Las partículas de fago unidas pueden separarse en condiciones de lavado cada vez más rigurosas para seleccionar según la afinidad de unión creciente.
- 25 La rigurosidad de las condiciones de lavado puede aumentarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la alteración del pH de lavado, aumentando el tiempo del lavado, añadiendo detergente a la disolución de lavado, etc. En realizaciones específicas, el conjunto de partículas de fago unidas se recoge y vuelve a seleccionarse según la unión inmunespecífica a antígeno y/o epítipo diana una o más veces. La selección mediante presentación en fago puede realizarse antes o después o tanto antes como después de la selección de polipéptidos de la invención mediante análisis de la estabilidad.
- 30
- 35 Puede usarse la tecnología de presentación en fago para aumentar la afinidad de un polipéptido inmunespecífico de la invención por un antígeno y/o epítipo diana. La tecnología, denominada maduración por afinidad, emplea mutagénesis o paseo sobre CDR y selección de nuevo usando antígeno diana y/o un epítipo del mismo para identificar secuencias de aminoácidos de la invención que se unen con mayor afinidad al antígeno en comparación con la combinación inicial de secuencias seleccionadas. Mutagenizar codones completos en vez de nucleótidos individuales da como resultado un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácido. Pueden construirse bibliotecas que consisten en una combinación de clones variantes cada uno de los cuales difiere en una alteración de un solo aminoácido en una sola CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácido para cada residuo de CDR. Pueden seleccionarse mutantes con afinidad de unión aumentada por el
- 40 antígeno poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de selección conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con avidez aumentada por el antígeno (por ejemplo, ELISA) (Véanse Wu *et al.*, 1998, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95:6037; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunology* 155:1994).
- 45
- La especificidad de unión de los polipéptidos de la invención puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica para determinar interacciones de pares de unión, incluyendo, pero sin limitarse a ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, BIAcore) y radioinmunoensayo. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para evaluar la especificidad de unión de polipéptidos para identificar polipéptidos de la invención que muestran una  $K_d$  de más de 0,001 nM pero no más de 5 nM, no más de 10 nM, no más de 15 nM, no más de 20 nM, no más de 25 nM, no más de 30 nM, no más de
- 50 35 nM, no más de 40 nM, no más de 45 nM o no más de 50 nM. En determinadas realizaciones, los dominios  $V_H$  o  $V_L$  aislados de la invención muestran una  $K_d$  de no más de 5 nM, no más de 10, nM, no más de 15 nM, no más de 20 nM, no más de 25 nM, no más de 30 nM, no más de 35 nM, no más de 40 nM, no más de 45 nM o no más de 50 nM tal como se determina mediante el ensayo BIAcore.
- 55
- La presente invención también proporciona polipéptidos inmunespecíficos de la invención, o fragmentos de los mismos, que tienen una alta afinidad de unión por el antígeno de interés. En una realización específica, un
- 60

polipéptido inmunoespecífico de la presente invención o fragmento del mismo tiene una constante de velocidad de asociación o velocidad  $k_{on}$  (anticuerpo (Ac)+antígeno (Ag) Ac-Ag) de al menos  $10^5 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $10^6 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  o al menos  $10^8 M^{-1} s^{-1}$ . En una realización preferida, un polipéptido inmunoespecífico de la presente invención o fragmento del mismo tiene una  $k_{on}$  de al menos  $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $10^6 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  o al menos  $10^8 M^{-1} s^{-1}$ .

En otra realización, un polipéptido inmunoespecífico de la presente invención o fragmento del mismo tiene una velocidad  $k_{off}$  (anticuerpo (Ac)+antígeno (Ag) Ac-Ag) de menos de  $10^{-1} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-1} s^{-1}$ , menos de  $10^{-2} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-2} s^{-1}$ , menos de  $10^{-3} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ , menos de  $10^{-4} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ , menos de  $10^{-5} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ , menos de  $10^{-6} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ , menos de  $10^{-7} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-7} s^{-1}$ , menos de  $10^{-8} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-8} s^{-1}$ , menos de  $10^{-9} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-9} s^{-1}$  o menos de  $10^{-10} s^{-1}$ . En una realización preferida, un polipéptido inmunoespecífico de la presente invención o fragmento del mismo tiene una  $k_{off}$  de menos de  $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ , menos de  $10^{-5} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ , menos de  $10^{-6} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ , menos de  $10^{-7} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-7} s^{-1}$ , menos de  $10^{-8} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-8} s^{-1}$ , menos de  $10^{-9} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-9} s^{-1}$  o menos de  $10^{-10} s^{-1}$ .

En todavía otras realizaciones, un polipéptido inmunoespecífico de la presente invención o fragmento del mismo tiene una constante de afinidad o  $K_a$  ( $k_{on}/k_{off}$ ) de al menos  $10^2 M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^2 M^{-1}$ , al menos  $10^3 M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^3 M^{-1}$ , al menos  $10^4 M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^4 M^{-1}$ , al menos  $10^5 M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^5 M^{-1}$ , al menos  $10^6 M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^6 M^{-1}$ , al menos  $10^7 M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^7 M^{-1}$ , al menos  $10^8 M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^8 M^{-1}$ , al menos  $10^9 M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^9 M^{-1}$ , al menos  $10^{10} M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{10} M^{-1}$ , al menos  $10^{11} M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{11} M^{-1}$ , al menos  $10^{12} M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{12} M^{-1}$ , al menos  $10^{13} M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{13} M^{-1}$ , al menos  $10^{14} M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{14} M^{-1}$ , al menos  $10^{15} M^{-1}$  o al menos  $5 \times 10^{15} M^{-1}$ . En aún otra realización, un polipéptido inmunoespecífico de la presente invención o fragmento del mismo tiene una constante de disociación o  $K_d$  ( $k_{off}/k_{on}$ ) de menos de  $10^{-2} M$ , menos de  $5 \times 10^{-2} M$ , menos de  $10^{-3} M$ , menos de  $5 \times 10^{-3} M$ , menos de  $10^{-4} M$ , menos de  $5 \times 10^{-4} M$ , menos de  $10^{-5} M$ , menos de  $5 \times 10^{-5} M$ , menos de  $10^{-6} M$ , menos de  $5 \times 10^{-6} M$ , menos de  $10^{-7} M$ , menos de  $5 \times 10^{-7} M$ , menos de  $10^{-8} M$ , menos de  $5 \times 10^{-8} M$ , menos de  $10^{-9} M$ , menos de  $5 \times 10^{-9} M$ , menos de  $10^{-10} M$ , menos de  $5 \times 10^{-10} M$ , menos de  $10^{-11} M$ , menos de  $5 \times 10^{-11} M$ , menos de  $10^{-12} M$ , menos de  $5 \times 10^{-12} M$ , menos de  $10^{-13} M$ , menos de  $5 \times 10^{-13} M$ , menos de  $10^{-14} M$ , menos de  $5 \times 10^{-14} M$ , menos de  $10^{-15} M$ , o menos de  $5 \times 10^{-15} M$ .

### 5.1.2 Selección de solubilidad/estabilidad de polipéptidos inmunoespecíficos

Se seleccionan secuencias de nucleótidos que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo que muestran alta estabilidad usando un ensayo de resistencia a cloranfenicol modificado. El ensayo selecciona polipéptidos que muestran permanecer solubles, están apropiadamente plegados y resisten la agregación durante la expresión recombinante.

El método de selección de estabilidad se basa en evaluar la solubilidad de la proteína recombinante tal como se expresa en *E. coli* como fusión con cloranfenicol acetiltransferasa ("CAT"), la enzima responsable de conferir resistencia bacteriana al antibiótico cloranfenicol. CAT es una proteína homotrimérica altamente soluble con un peso molecular de 25 kDa que se ha mostrado que mantiene actividad cuando se fusiona con una variedad de otras proteínas (Robben *et al.*, 1993, Gene 126:109-113). Sin embargo, el nivel de actividad de CAT en proteínas de fusión (y por tanto resistencia a cloranfenicol) es significativamente inferior cuando el gen se expresa en una proteína de fusión con proteína insoluble que cuando se expresa como un constructo con proteína soluble. Por consiguiente, pueden seleccionarse formas solubles de los polipéptidos de la invención (por ejemplo, dominios  $V_H$  y  $V_L$  de conejo) a partir de una gran combinación de posibles proteínas mediante selección con cloranfenicol. Pueden seleccionarse bacterias que comprenden las secuencias de nucleótidos de la invención usando medios líquidos o placas bacterianas. La presente invención abarca métodos que comprenden cultivar dichas bacterias transformadas sobre medios selectivos que comprenden cloranfenicol al menos 0,1 mM, al menos 0,2 mM, al menos 0,4 mM, al menos 0,6 mM, al menos 0,8 mM, al menos 1,0 mM, al menos 1,2 mM, al menos 1,4 mM, al menos 1,6 mM, al menos 1,8 mM, al menos 2,0 mM, al menos 2,5 mM, al menos 3,0 mM, al menos 5,0 mM, al menos 10 mM, al menos 15 mM o al menos 20 mM. Las bacterias pueden transformarse y el ADN puede extraerse de las bacterias seleccionadas mediante cualquier método conocido en la técnica.

La invención también abarca otros ensayos conocidos en la técnica para la evaluación de la estabilidad de proteínas. Ejemplos no limitativos de tales ensayos son espectroscopía de fuerza de moléculas individuales, evaluación de alteraciones en fluorescencia intrínseca, evaluación de desnaturalización térmica, por ejemplo, monitorizado mediante dispersión de luz dinámica ("DLS"), y resistencia a desnaturalización por SDS (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense 2006/0099647). Los métodos de la presente invención abarcan además la determinación de la energía libre de Gibbs de plegamiento ( $\Delta G_{N-U}$ ) como método de determinación de la estabilidad. En determinadas realizaciones la  $\Delta G_{N-U}$  de las moléculas de la invención es de aproximadamente 1 kJ/mol, aproximadamente 2 kJ/mol, aproximadamente 4 kJ/mol, aproximadamente 6 kJ/mol, aproximadamente 8 kJ/mol, aproximadamente 10 kJ/mol, aproximadamente 12 kJ/mol, aproximadamente 14 kJ/mol, aproximadamente 16 kJ/mol, aproximadamente 18 kJ/mol, aproximadamente 20 kJ/mol, aproximadamente 21

kJ/mol, aproximadamente 22 kJ/mol, aproximadamente 23 kJ/mol, aproximadamente 24 kJ/mol, aproximadamente 25 kJ/mol, aproximadamente 26 kJ/mol, aproximadamente 27 kJ/mol, aproximadamente 28 kJ/mol, aproximadamente 29 kJ/mol, aproximadamente 30 kJ/mol, aproximadamente 32 kJ/mol, aproximadamente 34 kJ/mol, aproximadamente 36 kJ/mol, aproximadamente 38 kJ/mol, aproximadamente 40 kJ/mol, aproximadamente 45 kJ/mol o aproximadamente 50 kJ/mol.

Según los métodos de la invención también puede usarse cualquier otro método conocido en la técnica para monitorizar el plegamiento/desplegamiento de proteínas.

## 5.2 Moléculas humanizadas

En realizaciones preferidas, los polipéptidos inmuno-específicos de la invención y/o fragmentos de los mismos están humanizados. Una molécula humanizada de la presente invención es un polipéptido que comprende al menos un dominio variable de inmunoglobulina (o una variante o fragmento del mismo) que puede unirse inmuno-específicamente a un antígeno predeterminado y que comprende una región de entramado que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina de conejo aislada y/o identificada mediante los métodos descritos en el presente documento. Un polipéptido inmuno-específico humanizado de la invención puede comprender sustancialmente la totalidad de al menos uno o, en determinadas realizaciones, dos, dominios variables en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de un dominio variable de conejo aislado/identificado mediante los métodos de la presente invención (es decir, dominio/regiones donadores) y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones de entramado son aquéllas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En determinadas realizaciones, una molécula humanizada de la invención también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Los dominios constantes de las moléculas humanizadas de la invención pueden seleccionarse con respecto a la función propuesta del polipéptido inmuno-específico, por ejemplo, anticuerpo, en particular la función efectora que puede requerirse. En algunas realizaciones, los dominios constantes de las moléculas humanizadas de la invención son dominios de IgA, IgE, IgG o IgM humanas. En una realización específica, se usan dominios constantes de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3, cuando las moléculas humanizadas de la invención están previstas para usos terapéuticos y se desean funciones efectoras de anticuerpos. En realizaciones alternativas, se usan isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula humanizada de la invención está prevista para fines terapéuticos y no se requiere función efectora de anticuerpos.

En algunas realizaciones, los polipéptidos inmuno-específicos de la invención comprenden sólo una cadena pesada, sólo una cadena ligera, sólo un dominio V<sub>H</sub>, sólo un dominio V<sub>L</sub>, o cualquier combinación de los fragmentos y/o dominios anteriores. En otras realizaciones, el polipéptido inmuno-específico, o fragmento, de la invención puede comprender además ninguna, una, o una o más de las regiones CH1, de bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En otras realizaciones, el polipéptido inmuno-específico, o fragmento, de la invención no comprende un dominio CL. El polipéptido inmuno-específico, o fragmento, de la invención puede comprender un anticuerpo receptor seleccionado de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. En algunas realizaciones, el dominio constante es un dominio constante de fijación del complemento en el que se desea que la molécula humanizada, por ejemplo, el anticuerpo, muestre actividad citotóxica, y la clase es normalmente IgG<sub>1</sub>. En otras realizaciones, en las que no se desea tal actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de la clase IgG<sub>2</sub>. La molécula humanizada de la invención puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y seleccionar dominios constantes particulares para optimizar funciones efectoras deseadas está dentro de la habilidad habitual en la técnica.

No es necesario que las regiones de entramado y CDR de una molécula humanizada de la invención correspondan exactamente a las secuencias originales, por ejemplo, la CDR de conejo donador o el entramado consenso pueden mutagenizarse mediante sustitución, inserción o delección de al menos un residuo de modo que el residuo de CDR o entramado en ese sitio no corresponde ni al consenso ni a la molécula donadora. Sin embargo, preferiblemente tales mutaciones no son extensas. Habitualmente, al menos el 75% de los residuos humanizados corresponderán a los de las secuencias originales de la región de entramado (FR) y CDR, más frecuentemente el 90% y lo más preferiblemente más del 95%. Pueden producirse moléculas humanizadas, en particular, anticuerpos, usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, injerto de CDR (patente europea n.º EP 239.400; publicación internacional n.º WO 91/09967; y patentes estadounidenses n.ºs 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), remodelación de la superficie o modificación de la superficie (patentes europeas n.ºs EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; y Roguska *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969-973), intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5.565.332) y técnicas dadas a conocer en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, la publicación internacional n.º WO 9317105, Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25, Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13:353-60, Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20:267-79, Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84, Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9:895-904, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 sup.):5973s-5977s, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10, Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525, Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323, y Presta, 1992, *Curr. Op.*

Struct. Biol. 2:593-596. A menudo, residuos de entramado en las regiones de entramado se sustituirán por el residuo correspondiente de la CDR o el dominio variable de conejo donador para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno (es decir, sustitución de las secuencias de aminoácidos de armazón y/o los residuos identificados mediante los métodos de la presente invención). Estas sustituciones de entramado se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los residuos de entramado y CDR para identificar residuos de entramado importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de entramado inusuales en posiciones particulares. (Véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, patente estadounidense n.º 5.585.089; publicaciones estadounidenses n.ºs 2004/0049014 y 2003/0229208; patentes estadounidenses n.ºs 6.350.861; 6.180.370; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101 y Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323). El término "humanización" también incluye métodos de modificación de la superficie de proteínas y/o anticuerpos tal como los dados a conocer en las patentes estadounidenses 5.770.196; 5.776.866; 5.821.123; y 5.896.619, cada una concedida a Studnicka *et al.*

En algunas realizaciones, los polipéptidos inmuno-específicos, o fragmentos de los mismos, de la invención comprenden una molécula humanizada en la que al menos una CDR del dominio variable de conejo donador se injerta sobre la región de entramado receptora. En otras realizaciones, al menos dos y preferiblemente las tres CDR de los dominios V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> de conejo donadores se injertan sobre las regiones de entramado receptoras.

### 5.3 Moléculas quiméricas

Una molécula quimérica de la invención es una molécula en la que diferentes porciones del polipéptido inmuno-específico se derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina tales como moléculas que tienen una región variable derivada de una cadena pesada o cadena ligera de conejo y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véanse, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214; Gillies *et al.*, 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; y las patentes estadounidenses n.ºs 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397. Pueden producirse moléculas quiméricas de la invención que comprenden una o más CDR a partir de las moléculas donadoras de conejo de la invención y regiones de entramado de una molécula de inmunoglobulina humana usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación internacional n.º WO 91/09967; y patentes estadounidenses n.ºs 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), remodelación de la superficie o modificación de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, Protein Engineering 7:805; y Roguska *et al.*, 1994, PNAS 91:969), e intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5.565.332).

A menudo, se sustituirán residuos de entramado en las regiones de entramado por el residuo correspondiente de los dominios variables donadores de conejo de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones de entramado se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los residuos de entramado y CDR para identificar residuos de entramado importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de entramado inusuales en posiciones particulares. (Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.585.089; y Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323.)

### 5.4 Moléculas de conjugado

La presente invención engloba polipéptidos inmuno-específicos, por ejemplo, anticuerpos, fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) con polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o una porción del mismo, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. La fusión no tiene que ser necesariamente directa, sino que puede producirse a través de secuencias ligadoras. Los polipéptidos inmuno-específicos de la invención pueden usarse, por ejemplo, para direccionar polipéptidos heterólogos a tipos celulares particulares, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, fusionando o conjugando los polipéptidos heterólogos con moléculas de la invención que presentan inmuno-especificidad por estos receptores de la superficie celular particulares. Alternativa o adicionalmente, los polipéptidos heterólogos, en particular los polipéptidos heterólogos de unión a antígeno, pueden usarse, por ejemplo, para direccionar los polipéptidos inmuno-específicos de la invención a dianas proteicas o proteínas séricas particulares, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, fusionando o conjugando las moléculas de la invención con polipéptidos heterólogos que presentan inmuno-especificidad por proteínas diana o proteínas séricas c particulares. Tales fusiones o conjugaciones dan como resultado polipéptidos biespecíficos o multiespecíficos de la invención. Los polipéptidos inmuno-específicos de la invención fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos también pueden usarse en métodos de purificación e inmunoensayos *in vitro* usando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 93/21232; el documento EP 439.095; Naramura *et al.*, 1994, Immunol. Lett., 39:91-99; la patente estadounidense n.º 5.474.981; Gillies *et al.*, 1992, Proc Natl Acad Sci, 89:1428-1432; y Fell *et al.*, 1991, J. Immunol., 146:2446-2452.

Además, un polipéptido inmuno-específico de la invención puede conjugarse con un agente terapéutico o resto



farmacológico que modifica una respuesta biológica dada. No ha de interpretarse que los agentes terapéuticos o restos farmacológicos se limitan a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que presenta una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* (es decir, PE-40), o toxina diftérica, ricina, gelonina y proteína antiviral de fitolaca, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferones incluyendo, pero sin limitarse a, alfa-interferón (IFN-alfa), beta-interferón (IFN-beta), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (TPA); un agente apoptótico (por ejemplo, TNF-alfa, TNF-beta, AIM I tal como se da a conocer en la publicación PCT n.º WO 97/33899), AIM II (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 97/34911), ligando de Fas (Takahashi *et al.*, 1994, *J. Immunol.*, 6:1567-1574) y VEGF (publicación PCT n.º WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF")), factor estimulante de colonias de macrófagos ("M-CSF") o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")); una proteasa o una ribonucleasa.

Pueden fusionarse polipéptidos inmuno-específicos de la invención con secuencias de marcador, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como la cola proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:821-824. Otras colas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la cola de "HA" de hemaglutinina, que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, 1984, *Cell*, 37:767 y la cola "flag" (Knappik *et al.*, 1994, *Biotechniques*, 17(4):754-761).

La presente invención incluye además el uso de composiciones que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados o conjugados con fragmentos de las moléculas de la invención. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos pueden fusionarse o conjugarse con un fragmento Fab, fragmento Fc, fragmento Fv, fragmento F(ab)<sub>2</sub>, scFv, minicuerpo, nanocuerpo o una porción de los mismos. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugar polipéptidos con porciones de anticuerpo. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; los documentos EP 307.434; EP 367.166; las publicaciones internacionales n.ºs WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; y Vil *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-11341.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de intercambio de genes, intercambio de motivos, intercambio de exones y/o intercambio de codones (denominados colectivamente "intercambio de ADN"). Puede emplearse el intercambio de ADN para alterar las actividades de los polipéptidos inmuno-específicos de la invención, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con mayores afinidades y menores velocidades de disociación). Véanse, generalmente, las patentes estadounidenses n.ºs 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hansson, *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265; y Lorenzo y Blasco, 1998, *BioTechniques* 24:308. Pueden alterarse ácidos nucleicos de la invención o fragmentos de los mismos, o los polipéptidos codificados o fragmentos de los mismos, sometidos a mutagénesis al azar mediante PCR propensa a error, inserción de nucleótidos al azar u otros métodos antes de la recombinación.

La presente invención también engloba polipéptidos inmuno-específicos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Tales moléculas pueden usarse de manera diagnóstica para monitorizar, por ejemplo, el desarrollo o la progresión de una enfermedad, un trastorno o una infección como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para determinar, por ejemplo, la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Puede facilitarse la detección acoplado el polipéptido de la invención a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones de metales paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse o bien directamente con el polipéptido inmuno-específico de la invención o bien indirectamente, a través de un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.741.900 para iones de metales que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico según la presente invención. Tal diagnóstico y detección pueden lograrse acoplado el polipéptido de la invención a sustancias detectables incluyendo, pero sin limitarse a, diversas enzimas, incluyendo las enzimas, pero sin limitarse a, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina y aequorina; material radiactivo tal como, pero sin limitarse a, bismuto (<sup>213</sup>Bi), carbono (<sup>14</sup>C), cromo (<sup>51</sup>Cr), cobalto (<sup>57</sup>Co), flúor (<sup>18</sup>F),

5 gadolinio (<sup>153</sup>Gd, <sup>159</sup>Gd), galio (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), germanio (<sup>68</sup>Ge), holmio (<sup>166</sup>Ho), indio (<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), yodo (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), lantano (<sup>140</sup>La), lutecio (<sup>177</sup>Lu), manganeso (<sup>54</sup>Mn), molibdeno (<sup>99</sup>Mo), paladio (<sup>103</sup>Pd), fósforo (<sup>32</sup>P), praseodimio (<sup>42</sup>Pr), prometio (<sup>149</sup>Pm), renio (<sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re), rodio (<sup>105</sup>Rh), rutenio (<sup>97</sup>Ru), samario (<sup>153</sup>Sm), escandio (<sup>47</sup>Sc), selenio (<sup>75</sup>Se), estroncio (<sup>85</sup>Sr), azufre (<sup>35</sup>S), tecnecio (<sup>99</sup>Tc), talio (<sup>201</sup>Tl), estaño (<sup>113</sup>Sn, <sup>117</sup>Sn), tritio (<sup>3</sup>H), xenón (<sup>133</sup>Xe), iterbio (<sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb), itrio (<sup>90</sup>Y), zinc (<sup>65</sup>Zn); metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones de metales paramagnéticos no radiactivos. Adicionalmente, cualquiera de los radiometales trazadores anteriores puede presentar un efecto terapéutico cuando se conjuga con un polipéptido inmunoespecífico según los métodos de la invención.

10 Un polipéptido inmunoespecífico de la invención puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que es nocivo para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiandrindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

25 En determinadas realizaciones, el polipéptido inmunoespecífico de la invención puede conjugarse con un resto terapéutico tal como ARNip útil para el tratamiento o la prevención de enfermedades que están provocadas por la sobreexpresión o la expresión anómala de genes y enfermedades provocadas por la expresión de genes que contienen mutaciones. Los mecanismos de la actividad de ARNip y su modo de uso se conocen bien en la técnica, véanse, por ejemplo, Provost *et al.*, 2002, EMBO J., 21: 5864-5874; Tabara *et al.*, 2002, Cell 109:861-71; Ketting *et al.*, 2002, Cell 110:563; y Hutvagner & Zamore, 2002, Science 297:2056.

30 Además, un polipéptido inmunoespecífico de la invención puede conjugarse con restos terapéuticos tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones de radiometales (véase anteriormente para ejemplos de materiales radiactivos). En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo a través de una molécula ligadora. Tales moléculas ligadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

40 El polipéptido inmunoespecífico de la invención puede conjugarse con un resto terapéutico que no altera ni modifica la respuesta biológica, sino que en su lugar funciona en el direccionamiento y/o transporte del polipéptido inmunoespecífico o fragmento del mismo. Los ejemplos no limitativos de tales restos incluyen proteína A, proteínas G, albúmina, péptidos que interaccionan con albúmina (por ejemplo, gp60, gp30, gp18; véase, por ejemplo, Schnitzer *et al.*, 1992, J Biol Chem 34:24544-24553); y dominios de transducción de proteínas (véase, por ejemplo, Bogoyevitch *et al.*, 2002, DNA Cell Biol 12:879-894). Tales restos también incluyen restos que mejoran o aumentan la semivida sérica de los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención. Los ejemplos no limitativos de restos que aumentan o mejoran la semivida sérica de polipéptidos incluyen albúmina y fibronectina, o fragmentos activos de las mismas, así como proteínas de unión a albúmina y/o fibronectina, por ejemplo, anticuerpos de unión a albúmina y/o fibronectina, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos (véanse, por ejemplo, Holt *et al.*, 2008, Protein Eng Des Sel 21:238-288; Weimer *et al.*, 2008, Thromb Haemost 99:659-667; Yazaki *et al.*, 2008, Nucl Med Biol 35:151-158; Huang *et al.*, 2007, J Pept Sci 12:588-595; y Stork *et al.*, 2007, Protein Eng Des Sel 20:569-576.

50 Se conocen bien técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con polipéptidos; véanse, por ejemplo, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª ed.), Robinson *et al.* (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, págs. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Tera Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, págs. 303-16, Academic Press; y Thorpe *et al.*, Immunol. Rev., 62:119-58, 1982.

El polipéptido inmunoespecífico de la invención, o un fragmento de unión a epítipo del mismo, con o sin un resto terapéutico conjugado con el mismo, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxico(s) y/o citocina(s) puede usarse como agente profiláctico o terapéutico.

Alternativamente, un polipéptido inmunoespecífico de la invención puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo tal como se describe por Segal en la patente estadounidense n.º 4.676.980.

5 También pueden unirse moléculas de la invención a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

La invención también engloba el uso de liposomas para prolongar o aumentar la semivida sérica de moléculas de la invención. En determinadas realizaciones, una molécula inmunoespecífica de la invención, por ejemplo, que comprende un dominio  $V_L$  o  $V_H$ , puede conjugarse con liposomas usando métodos descritos previamente, véase, por ejemplo, Martin *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288. La invención engloba por tanto métodos de preparación de liposomas con una semivida sérica prolongada, es decir, un tiempo de circulación potenciado, tal como los dados a conocer en la patente estadounidense n.º 5.013.556. Liposomas preferidos usados en los métodos de la invención no se eliminan rápidamente de la circulación, es decir, no se captan en el sistema fagocítico mononuclear (MPS). La invención engloba liposomas estabilizados estéricamente que se preparan usando métodos comunes conocidos por un experto en la técnica. Aunque no pretende limitarse por un mecanismo de acción particular, los liposomas estabilizados estéricamente contienen componentes lipídicos con restos hidrófilos voluminosos y altamente flexibles, lo que reduce la reacción no deseada de liposomas con proteínas séricas, reduce la opsonización con componentes séricos y reduce el reconocimiento por MPS. Los liposomas estabilizados estéricamente se preparan preferiblemente usando polietilenglicol. Para la preparación de liposomas y liposomas estabilizados estéricamente véanse, por ejemplo, Bendas *et al.*, 2001 BioDrugs, 15(4): 215-224; Allen *et al.*, 1987 FEBS Lett. 223: 42-6; Klibanov *et al.*, 1990 FEBS Lett., 268: 235-7; Blum *et al.*, 1990, Biochim. Biophys. Acta., 1029: 91-7; Torchilin *et al.*, 1996, J. Liposome Res. 6: 99-116; Litzinger *et al.*, 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190: 99-107; Maruyama *et al.*, 1991, Chem. Pharm. Bull., 39: 1620-2; Klibanov *et al.*, 1991, Biochim Biophys Acta, 1062; 142-8; Allen *et al.*, 1994, Adv. Drug Deliv. Rev, 13: 285-309. La invención también engloba liposomas que están adaptados para el direccionamiento a órganos específicos, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.544.545, o el direccionamiento a células específicas, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0074403. Pueden generarse liposomas particularmente útiles para su uso en las composiciones y los métodos de la invención mediante un método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extraen los liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

### 5.5 Preparación y caracterización de polipéptidos de la invención

Los polipéptidos inmunoespecíficos, o fragmentos de los mismos, de la invención pueden caracterizarse por la unión específica a un antígeno y/o epítipo usando cualquier método de base inmunológica o bioquímica conocido en la técnica para caracterizar interacciones de pares de unión. La unión específica de un polipéptido inmunoespecífico de la invención a un antígeno y/o epítipo puede determinarse, por ejemplo, usando métodos de base inmunológica o bioquímica incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y diálisis de equilibrio. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmunoespecífica y reactividad cruzada de las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como inmunotransferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por mencionar sólo algunos. Tales ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

También pueden someterse a ensayo polipéptidos inmunoespecíficos, o fragmentos de los mismos, de la invención usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial conocido en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la interacción de la proteína inmunoespecífica con un antígeno y/o epítipo de interés. En la presente invención, puede usarse cualquier instrumento de SPR disponible comercialmente incluyendo, pero sin limitarse a, instrumentos BIAcore, disponibles de Biacore AB (Uppsala, Suecia); instrumentos IAsys disponibles de Affinity Sensors (Franklin, Mass.); sistema IBIS disponible de Windsor Scientific Limited (Berks, R.U.), sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón) y detector de SPR Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, Tex.). Para una revisión de tecnología basada en SPR, véanse Mullet *et al.*, 2000, Methods 22: 77-91; Dong *et al.*, 2002, Review in Mol. Biotech., 82: 303-23; Fivash *et al.*, 1998, Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich *et al.*, 2000, Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61. Adicionalmente, cualquiera de los instrumentos de SPR y métodos basados en SPR para medir interacciones proteína-proteína descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125 se contemplan en los métodos de la invención.

Brevemente, los ensayos basados en SPR implican inmovilizar un elemento de un par de unión sobre una superficie,

y monitorizar su interacción con el otro elemento del par de unión en disolución en tiempo real. SPR se basa en la medición del cambio del índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que se produce con la formación o disociación de complejos. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es el chip sensor, que está en el núcleo de la tecnología de SPR; consiste en una superficie de vidrio recubierta con una fina capa de oro y forma la base para una gama de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. Una variedad de chips sensores están disponibles comercialmente, especialmente de las empresas enumeradas anteriormente, todos los cuales pueden usarse en los métodos de la invención. Los ejemplos no limitativos de chips sensores incluyen los disponibles de BIAcore AB, Inc., por ejemplo, chip sensor CM5, SA, NTA y HPA. Una molécula de la invención puede inmovilizarse sobre la superficie de un chip sensor usando cualquiera de los métodos y las químicas de inmovilización conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, acoplamiento covalente directo mediante grupos amina, acoplamiento covalente directo mediante grupos sulfhidrilo, unión de biotina a superficie recubierta con avidina, acoplamiento de aldehído a grupos hidrato de carbono y unión a través de la cola de histidina con chips de NTA.

#### 5.5.1 Polinucleótidos que codifican para los polipéptidos inmuno-específicos de la invención

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican para los polipéptidos inmuno-específicos de la invención (por ejemplo, polipéptidos que comprenden un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, que comprenden una o más CDR identificadas mediante los métodos de la invención, que comprenden secuencias de aminoácidos de armazón o residuos de aminoácido de armazón, etc.) u otros polipéptidos inmuno-específicos o fragmentos de los mismos producidos mediante los métodos de la invención, y versiones humanizadas de los mismos, y métodos para producir los mismos.

Los métodos de la invención también engloban polinucleótidos que se hibridan en diversas condiciones de rigurosidad, por ejemplo, alta rigurosidad, rigurosidad intermedia o menor, con polinucleótidos que codifican para un polipéptido inmuno-específico de la invención. La hibridación puede realizarse en diversas condiciones de rigurosidad. A modo de ejemplo y no de limitación, procedimientos que usan condiciones de baja rigurosidad son tal como sigue (véase también Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792). Se pretratan filtros que contienen ADN durante 6 h a 40°C en una disolución que contiene formamida al 35%, 5 X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1%, Ficoll al 0,1%, BSA al 0,1% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500 µg/ml. Se llevan a cabo las hibridaciones en la misma disolución con las siguientes modificaciones: se usa PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, sulfato de dextrano al 10% (peso/vol.) y 5-20 X 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada con <sup>32</sup>P. Se incuban los filtros en mezcla de hibridación durante 18-20 h a 40°C, y entonces se lavan durante 1,5 h a 55°C en una disolución que contiene 2 X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1%. Se sustituye la disolución de lavado por nueva disolución y se incuban 1,5 h adicionales a 60°C. Se secan con papel los filtros y se exponen para autorradiografía. Si es necesario, se lavan los filtros una tercera vez a 65-68°C y vuelven a exponerse a la película. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de baja rigurosidad que pueden usarse (por ejemplo, tal como se emplea para hibridaciones de especies cruzadas). A modo de ejemplo y no de limitación, procedimientos que usan condiciones de alta rigurosidad son tal como sigue. Se lleva a cabo la prehibridación de filtros que contienen ADN durante de 8 h a toda la noche a 65°C en tampón que se compone de 6 X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 500 µg/ml. Se hibridan los filtros durante 48 h a 65°C en mezcla de prehibridación que contiene ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml y 5-20 X 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada con <sup>32</sup>P. Se realiza el lavado de los filtros a 37°C durante 1 h en una disolución que contiene 2 X SSC, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01% y BSA al 0,01%. Esto va seguido por un lavado en 0,1 X SSC a 50°C durante 45 min antes de la autorradiografía. Se conocen bien en la técnica otras condiciones de alta rigurosidad que pueden usarse. Se conoce bien en la técnica la selección de condiciones apropiadas para tales rigurosidades (véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; véase también, Ausubel *et al.*, eds., en the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, .COPYRGT. 1987-1997, Current Protocols, .COPYRGT. 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.; véase especialmente, Dyson. 1991, "Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis", En: Essential Molecular Biology: A Practical Approach, vol. 2, T. A. Brown, ed., págs. 111-156, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, R.U.).

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, mediante cualquier método conocido en la técnica.

Un polinucleótido que codifica para un polipéptido inmuno-específico de la invención puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado de, cualquier tejido o célula que exprese los anticuerpos de conejo, en particular, dominios variables de conejo, tales como células plasmáticas) mediante hibridación con sondas específicas de inmunoglobulina y/o amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia de dominio variable o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia génica particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica para el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR pueden clonarse entonces

en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos del polipéptido inmuno específico de la invención, puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, para generar moléculas de la invención que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización específica, una o más de las CDR de conejo identificadas mediante los métodos de la invención se insertan dentro de regiones de entramado heterólogas usando técnicas de ADN recombinante rutinarias. Las regiones de entramado pueden producirse de manera natural o ser regiones de entramado consenso, y preferiblemente regiones de entramado humanas (véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para un listado de regiones de entramado humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado mediante la combinación de las regiones de entramado y las CDR codifica para un polipéptido inmuno específico, por ejemplo, anticuerpo, que se une específicamente al antígeno y/o epítipo de interés. Preferiblemente, tal como se comentó anteriormente, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácido dentro de las regiones de entramado, y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácido mejoran la unión de los anticuerpos de la invención a dicho antígeno y/o epítipo.

En otra realización, pueden examinarse bibliotecas o inmunoglobulinas o dominios variables de inmunoglobulina de conejo o cualquier otra biblioteca de conejo disponible en la técnica, mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, para clonar los ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos inmuno específicos de la invención.

#### 5.5.2 Expresión recombinante de polipéptidos inmuno específicos de la invención.

Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de la invención, puede producirse el vector para la producción del polipéptido inmuno específico mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidos en la técnica. Pueden usarse métodos que conocen bien los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes de los polipéptidos de la invención y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.* eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un polipéptido inmuno específico de la invención puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal y precipitación con fosfato de calcio) y las células transfectadas se cultivan entonces mediante técnicas convencionales para producir el polipéptido de la invención. En realizaciones específicas, la expresión del polipéptido se regula mediante un promotor constitutivo, uno inducible o uno tisular, específico.

Las células huésped usadas para expresar los polipéptidos inmuno específicos recombinantes de la invención pueden ser o bien células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o bien, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento de promotor de gen de expresión temprana intermedia principal de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para inmunoglobulinas (Foecking *et al.*, 1998, Gene 45:101; Cockett *et al.*, 1990, Bio/Technology 8:2).

Una variedad de sistemas de vector de expresión de huésped pueden utilizarse para expresar los polipéptidos inmuno específicos de la invención. Tales sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales pueden producirse las secuencias codificantes de los polipéptidos y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden expresar, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos adecuadas, los polipéptidos de la invención *in situ*. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de cósmido, ADN de plásmido o ADN de bacteriófago recombinante que contienen secuencias codificantes de polipéptido; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de polipéptido; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes de polipéptido; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (VMCo) y virus del mosaico del tabaco (VMT)) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de polipéptido; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (véase la patente estadounidense n.º 5.807.715), células Per C.6 (células retinianas de rata desarrolladas

por Crucell)) que albergan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5K de virus Vaccinia).

5 En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso destinado para el polipéptido inmuno específico que está expresándose. Por ejemplo, cuando va a producirse una gran cantidad de una proteína de este tipo, para la generación de composiciones farmacéuticas de un polipéptido inmuno específico de la invención, pueden desearse vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión en *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, EMBO J. 2:1791), en el que la secuencia codificante de polipéptido  
10 inmuno específico puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante de lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas, mediante adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa de matriz seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de factor Xa o trombina de modo que el producto génico  
15 diana clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de polipéptido inmuno específico puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de VPNAc (por ejemplo, el promotor de polihedrina).  
20

En células huésped de mamíferos, pueden utilizarse varios sistemas de expresión de base viral. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de polipéptido inmuno específico de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y que puede expresar la molécula de polipéptido inmuno específico en huéspedes infectados. (Por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estos codones de iniciación y señales de control traduccional exógenas pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Puede potenciarse la eficacia de expresión mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. apropiados (véase Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).  
25  
30  
35

Además, puede elegirse una cepa de células huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico del modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas del huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Para ello, pueden usarse células huésped eucariotas que presentan la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.  
40  
45

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento, de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética líneas celulares que expresan de manera estable un polipéptido inmuno específico de la invención. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, pueden transformarse células huésped con ADN controlado mediante elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, puede permitirse que células modificadas por ingeniería genética crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos  
50 que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar por ingeniería genética líneas celulares que expresan el polipéptido inmuno específico de la invención. Tales líneas celulares modificadas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en el examen y la evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con el polipéptido inmuno específico de la invención.  
55

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo pero sin limitarse a, los genes de la timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, 1977, Cell 11:223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, Cell 22:817) que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, puede usarse la resistencia a antimetabolitos como base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; mayo de 1993, TIB TECH 11(5):155-215). Se describen métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse, en Ausubel *et al.* (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150: 1; e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, 1984, Gene 30:147).

Los niveles de expresión de un polipéptido inmunoespecífico de la invención pueden aumentarse mediante amplificación en vectores (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando puede amplificarse un marcador en el sistema de vector que expresa un polipéptido inmunoespecífico, el aumento en el nivel de inhibidor presente en cultivo de célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos del polipéptido inmunoespecífico de la invención, también aumentará la producción del polipéptido inmunoespecífico (Crouse *et al.*, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector para un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector para un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica para ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha expresado de manera recombinante el polipéptido inmunoespecífico de la invención, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para purificación de un polipéptido inmunoespecífico, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad por el antígeno específico tras la proteína A y en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas.

#### 5.6 Métodos profilácticos y terapéuticos

Pueden administrarse polipéptidos inmunoespecíficos de la presente invención que funcionan como agentes profilácticos y/o terapéuticos frente a una enfermedad, un trastorno o una infección a un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, el trastorno o la infección. Pueden administrarse polipéptidos inmunoespecíficos de la invención en combinación con uno o más de otros agentes profilácticos y/o terapéuticos útiles en el tratamiento, la prevención o el manejo de una enfermedad, un trastorno o una infección. En determinadas realizaciones, uno o más polipéptidos inmunoespecíficos de la invención se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, de manera concurrente con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad. El término "de manera concurrente" no se limita a la administración de los agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que significa más bien que los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención y el otro agente se administran a un sujeto en secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de tal manera que los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención pueden actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio aumentado con respecto a si se administrasen de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos de tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse de manera suficientemente próxima en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada.

En diversas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con una separación de menos de 1 hora, con una separación de aproximadamente 1 hora, con una separación de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, con una separación de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, con una separación de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, con una separación de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, con una separación de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas,

con una separación de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, con una separación de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, con una separación de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, con una separación de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, con una separación de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, con una separación de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, con una separación de no más de 24 horas o con una separación de no más de 48 horas. En realizaciones preferidas, se administran dos o más componentes dentro de la misma visita del paciente.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración previstas en el presente documento están englobadas mediante los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosificación y la frecuencia variarán además normalmente según factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de enfermedad, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y los antecedentes médicos del paciente. Un experto en la técnica puede seleccionar regímenes adecuados considerando tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones notificadas en la bibliografía y recomendadas en the Physician's Desk Reference (56<sup>a</sup> ed., 2002).

## 15 5.7 Composiciones y métodos de administración

La invención proporciona métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos inmuno-específicos de la invención. La invención también proporciona métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno o una infección administrando a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o moléculas conjugadas de la invención. En un aspecto preferido, un polipéptido inmuno-específico o proteína de fusión o molécula conjugada, está sustancialmente purificado (es decir, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferiblemente un mamífero tal como un mamífero no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un mamífero primate (por ejemplo, mono tal como, un mono cinomolgo y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar una composición que comprende polipéptidos inmuno-específicos de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que pueden expresar el polipéptido inmuno-específico o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc.

Los métodos de administración de un polipéptido inmuno-específico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una realización específica, los polipéptidos inmuno-específicos de la invención se administran por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 6.019.968; 5.985. 20; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y las publicaciones PCT n.<sup>os</sup> WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; WO 99/66903.

Las moléculas inmuno-específicas de la invención pueden suministrarse en una formulación de liberación sostenida. Las formulaciones proporcionan liberación prolongada y semivida prolongada de los polipéptidos terapéuticos administrados. Los sistemas de liberación controlada adecuados para su uso incluyen, sin limitación, sistemas controlados por difusión, controlados por disolventes y controlados químicamente. Los sistemas controlados por difusión incluyen, por ejemplo dispositivos de depósito, en los que las moléculas inmuno-específicas de la invención están encerradas dentro de un dispositivo de manera que la liberación de las moléculas está controlada mediante permeación a través de una barrera de difusión. Los dispositivos de depósito comunes incluyen, por ejemplo, membranas, cápsulas, microcápsulas, liposomas y fibras huecas. El dispositivo monolítico (matriz) es un segundo tipo de sistema controlado por difusión, en el que las moléculas inmuno-específicas se dispersan o se disuelven en una matriz de control de la velocidad (por ejemplo, una matriz de polímero). Las moléculas inmuno-específicas de la invención se dispersan homogéneamente en la totalidad de una matriz de control de la velocidad y la velocidad de liberación están controlada mediante difusión a través de la matriz. Los polímeros adecuados para su uso en el dispositivo de matriz monolítico incluyen polímeros que se producen de manera natural, polímeros sintéticos y polímeros naturales modificados de manera sintética, así como derivados de polímero.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. La dosis



precisa que ha de emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad del estado, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos animales o *in vitro*.

5 Generalmente, los polipéptidos inmunoespecíficos humanizados, por ejemplo, anticuerpos, tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los polipéptidos inmunoespecíficos, por ejemplo, anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria frente a los polipéptidos foráneos. Por tanto, a menudo son posibles menores dosificaciones de los polipéptidos inmunoespecíficos humanizados, por ejemplo, anticuerpos, y administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de polipéptidos inmunoespecíficos de la invención o fragmentos de los mismos pueden reducirse mediante la potenciación de la captación y la penetración en los tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo conjugación con proteínas G.

15 En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, mediante inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas Silastic, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un polipéptido inmunoespecífico de la invención, debe tenerse cuidado de usar materiales que no absorba el polipéptido inmunoespecífico o la proteína de fusión.

20 El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosificación eficaz de los anticuerpos usados para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del transcurso de un tratamiento particular.

#### 5.7.1 Composiciones farmacéuticas

30 Las composiciones de la invención incluyen composiciones farmacológicas a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitaria. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico dado a conocer en el presente documento o una combinación de esos agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de los polipéptidos inmunoespecíficos de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o uno estatal o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los que tienen origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, 45 gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

50 Generalmente, los componentes de las composiciones de la invención se suministran o bien por separado o bien mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de principio activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con un frasco para infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de solución salina o agua para inyección estéril de modo que puedan 55 mezclarse los componentes antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente

aceptables incluyen, pero no se limitan a las formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

#### 5.7.2 Kits

5 La invención proporciona un kit o paquete farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los polipéptidos inmuno-específicos de la invención. Adicionalmente, también pueden incluirse uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad en el kit o paquete farmacéutico. La invención también proporciona un kit o paquete farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente puede haber una  
10 notificación asociada con tal(es) recipiente(s) de la forma recomendada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración a seres humanos.

La presente invención proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende uno o más polipéptidos inmuno-específicos de la invención. En otra realización, un kit comprende  
15 además uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad, en uno o más recipientes. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico hormonal o biológico

#### 5.8 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica

Pueden someterse a prueba combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en sistemas de modelos  
20 animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Tales sistemas de modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, gallinas, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. En una realización específica de la invención, se someten a prueba combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo de ratón. Tales sistemas de modelos se usan  
25 ampliamente y se conocen bien por el experto en la técnica. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar tal como el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos, y si tales agentes se administran por separado o como mezcla.

Una vez que se han sometido a prueba los agentes profilácticos y/o terapéuticos de la invención en un modelo  
30 animal, pueden someterse a prueba en ensayos clínicos para establecer su eficacia. El establecimiento de ensayos clínicos se realizará según metodologías comunes que conoce un experto en la técnica, y pueden establecerse las dosificaciones y vías de administración óptimas así como los perfiles de toxicidad de las composiciones de la invención usando experimentación de rutina.

Pueden determinarse la toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por  
35 ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y the DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan grande índices terapéuticos. Aunque pueden usarse agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio  
40 de tejido afectado para minimizar el posible daño a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los estudios con animales y ensayos de cultivo celular pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres  
45 humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE<sub>50</sub> con escasa o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método de la invención, puede estimarse la dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de prueba que  
50 logra una inhibición de los síntomas que es la mitad de la máxima) tal como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más exacta dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

#### 6. Ejemplos

Pueden usarse los siguientes métodos con conejos sin tratamiento previo o inmunizados

6.1 Aislamiento y caracterización de dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> inmunoespecíficos, estables

El siguiente método proporciona la identificación y el aislamiento de dominios variables de conejo distintivos que presentan propiedades únicas en comparación con anticuerpos de ser humano, ratón o camello, que presentan alta afinidad, especificidad y estabilidad

5 6.1.1 Materiales y métodos

Inmunización de conejos (opcional)

10 Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con Vif, GP41 de VIH, integrasa de VIH, TNF-alfa, vWF o Delta4 purificados a lo largo del transcurso de doce semanas. Se les administró a los conejos cuatro inyecciones subcutáneas a intervalos de 2-3 semanas de 50 µg de proteína purificada preparada en 1 ml de adyuvante según las instrucciones del fabricante (Ribi Immunochem Research, Hamilton, MT). Cinco días tras el refuerzo final, se recogieron el bazo y la médula ósea y se usan para la preparación de ARN total.

Aislamiento de ARN y construcción de bibliotecas

15 Se recogieron muestras de tejido y se prepararon para el aislamiento de ARN total usando reactivo TRI (Molecular Research Centre) según el protocolo del fabricante. Se disolvió el ARN total aislado en 500 µl de agua libre de ARNasa y se determinaron la concentración y la pureza mediante espectrofotometría. Se sintetizó ADNc de primera hebra a partir del ARN total usando un cebador de oligo (dT) y transcriptasa inversa (Superscript; Invitrogen) usando el protocolo del fabricante.

20 Se realizó la amplificación primaria de los genes que codifican para las regiones variables de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras usando los cebadores sentido presentados en la tabla 1 (parte 5' de la región variable; figura 1) y los cebadores antisentido presentados en la tabla 2 (parte 3' de la región constante de las cadenas pesadas y ligeras; figuras 2A-B)

Tabla 1. Cebadores sentido para el aislamiento de dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de conejo a partir de la preparación de ADNc

Dominio	Cebador	Secuencia
VH	SDVH1-F	<b>5'GGG CCC AGG CGG CC CAG TCG GTG GAG GAG TCC TGG 3' (SEQ ID NO:10)</b>
	SDVH2-F	<b>5' GGG CCC AGG CGG CC CAG TCG GTG AAG GAG TCC GAG 3' (SEQ ID NO:11)</b>
VL	SDVH3-F	<b>5' GGG CCC AGG CGG CC CAG TCG YTG GAG GAG TCC GGG 3' (SEQ ID NO:12)</b>
	SDVH4-F	<b>5' GGG CCC AGG CGG CC CAG SAG CAG CTG RTG GAG TCC GG 3' (SEQ ID NO:13)</b>
	SDVK1-F	<b>5' GGG CCC AGG CGG CC GAGC TCG TGM TGA CCC AGA CTC CA 3' (SEQ ID NO:14)</b>
	SDVK2-F	<b>5' GGG CCC AGG CGG CC GAGC TCG ATM TGA CCC AGA CTC CA 3' (SEQ ID NO:15)</b>
	SDVK3-F	<b>5' GGG CCC AGG CGG CC GAGC TCG TGA TGA CCC AGA CTG AA 3' (SEQ ID NO:16)</b>

Dominio	Cebador	Secuencia
VL	SDV $\lambda$ -F	<b>5' GGG CCC AGG CGG CC GAGC TCG TGC TGA CTC AGT CGC CCT C 3' (SEQ ID NO:17)</b>

Tabla 2. Cebadores antisentido para el aislamiento de dominios V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de conejo a partir de la preparación de ADNc

Dominio	Cebador	Secuencia
VH	SDG-R	<b>5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CTG AYG GAG CCT TAG GTT GCC C 3' (SEQ ID NO:18)</b>
	SDVKj10-R	<b>5' CCT GGC CGG CCT GGCC TTT GAT TTC CAC ATT GGT GCC 3' (SEQ ID NO:19)</b>
VL	SDVKj0-R	<b>5' CCT GGC CGG CCT GGCC TAG GAT CTC CAG CTC GGT CCC 3' (SEQ ID NO:20)</b>
	SDVK42j0-R	<b>5' CCT GGC CGG CCT GGCC TTT GAC SAC CAC CTC GGT CCC 3' (SEQ ID NO:21)</b>
	SDV $\lambda$ -R	<b>5' CCT GGC CGG CCT GGC C GCCTGTGACGGTCAGCTGGGTCCC 3' (SEQ ID NO:22)</b>

5

Se realizó la PCR primaria en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l usando 25 pmol de cada cebador. Se usaron 2,5  $\mu$ l de ADNc de oligo-dT o cebador al azar como molde (equivalente a 5  $\mu$ g de ARNm). Las condiciones de reacción para la PCR primaria fueron 11 min a 94°C, seguido por 30/60/120 s a 54/55/72°C durante 30 ciclos, y 5 min a 72°C. Se realizaron todas las reacciones con MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 200  $\mu$ M (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica) y 1,25 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Roche).

10

Se separaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% y se eluyó el ADN usando el kit de extracción de gel QIAquick o QIAEXII (Qiagen)

Todos los cebadores tienen el sitio SfiI. Se cortaron con SfiI los fragmentos de ADN, se purificaron y se clonaron en el vector de fagémido. El fagémido contenía un codón de terminación supresor y secuencias que codifican para colas peptídicas para purificación (His<sub>6</sub>) y detección (HA).

15

#### Ligamiento y transformación de bibliotecas

Se ligaron aproximadamente 50 ng de ADN de vector linealizado (tal como se determina mediante electroforesis en gel frente a cantidades conocidas) con aproximadamente un exceso de 1-3 veces del inserto en reacciones de 20  $\mu$ l que contenían tampón de ligasa 1X (Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditioneitol 1 mM, ATP 1 mM, pH 7,5) y 1 U de ADN ligasa de T4 (Roche), para ligamiento de ligamientos de extremos cohesivos. Se incubaron los ligamientos durante 16-18 h a 12-14°C.

20

Se incubaron los productos resultantes de los ligamientos y un número correspondiente de cubetas en hielo durante 10 min. Simultáneamente, se descongeló *E. coli* electrocompetente en hielo. Se añadieron 2  $\mu$ l de cada reacción de ligamiento a las bacterias electrocompetentes, se transfirieron a una cubeta y se almacenaron en hielo durante 1 min. Se realizó la electroporación a 2,5 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Se lavaron inmediatamente las cubetas con 1 ml de medio SOC a temperatura ambiente y se agitaron los cultivos a 250 rpm durante 1 h a 37°C o 30°C. Luego se extendieron los cultivos sobre placas de agar LB que contenían ampicilina 100  $\mu$ g/ml, kanamicina 30  $\mu$ g/ml y cloranfenicol 17  $\mu$ g/ml y se incubaron durante la noche a 37°C o 30°C.

25

Se aisló el vector de fagémido y se sometió a electroporación en células huésped según los protocolos del fabricante. Tras la electroporación, se añadieron 5 ml de SOC y se agitaron los cultivos durante 1 h a 37°C. Luego se añadieron 10 ml de medio SB/carb. durante 1 h a 37°C. A continuación se añadieron 4,5 µl de carbenicilina 100 mg/ml y se agitaron los cultivos durante otra hora a 37°C antes de añadir 1 ml de VSCM13 (fago auxiliar; 10<sup>13</sup> ufp/ml) a cada 15 ml de cultivo. Se añadió un total de 170 ml de medio SB/carb. a los cultivos, que se agitaron durante 2 h a 37°C. Se añadieron 280 µl de kanamicina 50 mg/ml y se continuó agitando los cultivos durante la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se centrifugaron los cultivos y se precipitaron los sobrenadantes de fago mediante la adición de 25 ml de PEG-8000 (polietilenglicol)/NaCl e incubación en hielo durante 30 min. Se centrifugó el fago a partir del sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos en 2 ml de TBS/BSA al 1%, se centrifugaron y se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm en un tubo estéril.

#### Cribado de bibliotecas

Se usaron antígenos inmovilizados (Vif, Gp41, integrasa, TNF-alfa, vWF, Delta4) para cribar la biblioteca de expresión en fago para determinar unión inmuno-específica. Se unió el antígeno a una placa de microtitulación mediante incubación durante la noche a 4°C. Luego se lavaron las placas y se bloquearon con TBS/BSA al 3% durante 1 h a 37°C. Se añadieron 50 µl de biblioteca de fagos recién preparada a cada pocillo y se incubó durante 2 h a 37°C. El cribado consistió en varias tandas de unión de fago a un antígeno inmovilizado en el pocillo de una placa para ELISA, lavado, elución mediante tripsinización (escinde el fragmento de anticuerpo de la superficie del fago) y reamplificación. Durante cada tanda, se seleccionaron clones con unión específica y se amplificaron. Estos clones predominaban tras 3 ó 4 tandas.

Se lavaron los pocillos con 150 µl de TBS/Tween 20 al 0,5%. Se aumentaron las etapas de lavado de 5 en la primera tanda a 10 en la segunda tanda y 15 en la tercera y cuarta tanda.

Si se deseaban tandas de cribado adicionales, se transfirieron los eluatos de fago a 2 ml de cultivos de *E. coli* que se habían preparado mediante inoculación con 2 µl de ER2537 y se incubó mientras se agitaba durante 2 h a 37°C hasta D.O. = 1. Se incubaron los cultivos expuestos a eluato durante 15 min a T.A. Se añadieron 6 ml de medio SB/carb. precalentado y se agitaron durante 1 h a 37°C seguido por la adición de 1 ml de VCSM 13 (fago auxiliar) y 91 ml de medio SB/carb precalentado. Se agitaron los cultivos durante 2 h a 37°C, seguido por la adición de 140 µl de kanamicina 50 mg/ml y luego se agitaron durante la noche a 37°C. Se prepararon placas recubiertas con antígeno tal como se describe para la siguiente tanda de cribado. Luego se repitió el cribado de la segunda tanda siguiendo el mismo protocolo.

Tras el cribado, se sometieron a prueba los fagos combinados mediante la unión a placas recubiertas con antígeno (preparadas tal como se describe) y se detectaron mediante anticuerpo anti-HA conjugado con HRP (1:2000) para evaluar si merecía la pena continuar con el análisis de clones individuales.

#### Construcción de bibliotecas de anticuerpos de dominio único de fusión con CAT

Se amplificó el gen CAT gene a partir de pCAT (Stratagene) mediante PCR y se insertó en plásmido derivado de pET usando los sitios de restricción EcoRI y SphI para crear el pE-CAT. El cebador de PCR en 5' usado originariamente para clonar los dominios variables también estaba diseñado para contener dos sitios de clonación *Sfi*I secuenciales y diferentes, y un codón ámbar (TAG) justo antes del comienzo del gen CAT. Para clonar estas bibliotecas de anticuerpos de un solo dominio fusionadas en el gen CAT, se generaron los fragmentos SDVH y SDVL mediante PCR a partir de cada vector de biblioteca p-SDVH (plásmido que expresa dominios VH) y pSDVL (plásmido que expresa dominios VL) o a partir de vectores de fagémido seleccionados mediante cribado. Se purificaron en gel los fragmentos de PCR SDVH y SDVL, se digirieron con la endonucleasa de restricción *Sfi*I y se clonaron independientemente en el vector pE-CAT cortado con *Sfi*I de manera apropiada. Los constructos pSDVH-CAT y pSDVL-CAT están bajo el control del promotor Lac fuerte que también incluye una cola de afinidad de Hist<sub>6</sub> N-terminal y el gen de resistencia a ampicilina. Alternativamente, pueden clonarse los segmentos SDVH o SDVL en vectores fácilmente disponibles diseñados para expresar secuencias clonadas como proteínas de fusión con CAT, por ejemplo, el vector PCFN1 (véase Maxwell, *et al.*, 1999, J Prot Sci 8:1908-1911; figura 5).

#### Análisis de la resistencia a cloranfenicol

Se realizaron ensayos de resistencia a cloranfenicol mediante la transformación de células ER2738 (New England Biolabs, Inc) con cada biblioteca de fusión con CAT de dominio único. Se inocularon las mezclas de transformación en 5 ml de SOC y se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, se añadieron 10 ml de medio SB con 3 µl de ampicilina 100 mg/ml a cada biblioteca. Se agitó un total de 15 ml de cada cultivo durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se añadieron 4,5 µl de ampicilina 100 mg/ml y se agitaron los cultivos durante una hora a 37°C. Luego, se añadieron 85 ml de medio SB con 85 µl de ampicilina 100 mg/ml y se hicieron crecer los cultivos durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se usaron 600 µl de cada cultivo para inocular 20 ml de medio SB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. Se indujo la expresión de proteínas de un solo dominio de fusión con CAT mediante la

adición de IPTG 0,5 mM cuando la densidad óptica de los cultivos alcanzó 0,9 (a 600 nm). Tras 2 horas de incubación a 37°C, se sembraron en placa alícuotas de 100 µl de cada biblioteca sobre placas de agar con IPTG (200 µg/ml) y diversas concentraciones de cloranfenicol. Se incubaron las placas a 37°C durante 16-20 horas. Se cuantificó el nivel de resistencia como el mayor nivel de cloranfenicol al que aparecieron colonias tras el periodo de incubación a 37°C.

Análisis de estabilidad

Se realizó la confirmación de la estabilidad de clones seleccionados mediante ensayos de cribado y/o resistencia a cloranfenicol (o combinaciones de ambos) mediante la monitorización de la transición de desplegamiento en respuesta a calor o a una concentración creciente de cloruro de guanidinio (GdmCl) mediante fluorescencia intrínseca. Se diluyeron los clones expresados y aislados hasta una concentración de 6 µM. Se determinó la fluorescencia intrínseca a una longitud de onda de 280 ó 295 nm, registrándose los espectros de emisión desde 310 hasta 440 nm. Se corrigieron los espectros de fluorescencia para la fluorescencia de fondo de la disolución. La figura 6A representa la curva de transición de desplegamiento representativa de un dominio V<sub>L</sub> de la invención en respuesta a calor creciente. La figura 6B representa la curva de transición de desplegamiento representativa de un dominio V<sub>L</sub> de la invención en respuesta a concentraciones crecientes de GdmCl; antes de la medición de la fluorescencia, se incubaron muestras de proteína 6 µM durante la noche a 25°C para cada concentración de GdmCl.

Análisis de secuencias

Se inocularon clones de vector seleccionados mediante cribado y/o resistencia a cloranfenicol, o combinaciones de ambos, en cultivo, y se indujeron los cultivos con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) 1 mM y se sometieron a prueba para determinar la unión. Se realizaron en paralelo análisis de huella genética de ADN (análisis de diferentes tamaños de fragmentos tras amplificación por PCR) y análisis con *AfuI* (enzima que digiere ADN en varias secuencias) de fragmentos de anticuerpo que codifican para productos de PCR, para someter a prueba para determinar la diversidad entre los clones. Luego se sometieron clones seleccionados a análisis de la secuencia de ADN y se expresaron sin el producto del gen III para análisis adicional.

6.1.2 Resultados

Dominio variable de cadena pesada

Las tablas 3-6 presentan secuencias de entramado representativas de dominios variables de cadena pesada de conejo seleccionadas mediante el ensayo de estabilidad y/o el ensayo de estabilidad con cribado de fagos. El análisis de secuencias de clones seleccionados en relación con combinaciones iniciales indicó que las siguientes secuencias proporcionan estabilidad y/o afinidad potenciadas: para el dominio FR1 de V<sub>H</sub>, QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTLTCTAS (SEQ ID NO: 57); para el dominio FR2 de V<sub>H</sub>, WVRQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 69); para el dominio FR3 de V<sub>H</sub>, YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTATYYCAR (SEQ ID NO: 95); y para el dominio FR4 de V<sub>H</sub>, WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 139).

Estudios de mutaciones puntuales adicionales indicaron que la presencia de uno o más de los siguientes residuos de aminoácido confirió estabilidad y/o afinidad potenciadas al dominio V<sub>H</sub>: una fenilalanina en la posición 46 (dentro del dominio FR2), un ácido glutámico en la posición 53 (dentro del dominio FR2), una arginina en la posición 54 (dentro del dominio FR2), una glicina en la posición 56 (dentro del dominio FR2), una alanina en la posición 58 (dentro del dominio FR2) y una arginina en la posición 126 (dentro del dominio FR4). El análisis y los estudios de mutaciones puntuales dentro de los dominios CDR también indicó que la presencia de una cisteína en la posición 44 (el residuo de CDR1 final) y/o una cisteína en la posición 59 (el primer residuo en CDR2) confirió estabilidad y/o afinidad potenciadas. Se cree que estas cisteínas actúan estabilizando la estructura tridimensional del dominio. Las posiciones de aminoácido son según las posiciones dentro de las alineaciones de secuencias presentadas en la figura 3.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de dominios FR1 de V<sub>H</sub> seleccionados mediante métodos de la invención

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 1-31
23	QQQLV--ESGGR----LVKPDETLTITCTVS
24	-QSVE--ESGGG----LVTPGTPLTLTCTVS
25	-QSLE--ESGGG----LVQPGGSLKVSCAS

ES 2 540 807 T3

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 1-31
26	-QSLE--ESGGR----LVTPGTPLTLTCTVS
27	QQQLM--KSGGG----LVQPGGSLTLCKAS
28	-QSLE--ESGGR----LVTPGGSLTPTCTVS
29	-QSVE--ESGGR----LVKPDETLTLTCTVS
30	-QSVE--ESRGR----LVTPGTPLTLTCTVS
31	QEQLV--ESGGG----LVQPGGSLKLSCKAS
32	QQQLV--ESGGG----LVQPGGSLKLSCKAS
33	-QSMK--ESEGR----LVTPGGSLTLTCTVS
34	-QSVE--ESRGR----LVTPGGSLTLTCTVS
35	-QSVE--ESGGG----LVQPGGSLKVCKAP
36	-QSLE--ESGGR----LVTPGGSLTLTCTVS
37	-QSVE--ESGGR----LVTPGGSLTLTCTVS
38	QEQLM--ESGGG----LVQPGGSLTLCKAS
39	-QSLE--ESGGR----LVTPGTPLTLCTAS
40	QQQLV--ESGGG----LVQPGGSLTLCKAS
41	-QSVE--ESGGR----LVTPGTPLTLTCTVS
42	-QSVE--ESRGG----LVQPGGSLKVCKAS
43	-QSVE--ESRGG----LFKPTDTLTLTCTVS
44	-QSVE--ESGGR----LISPGGSLTLTCTVS
45	-QSLE--ESGGR----LVKPDETLTLTCTVS
46	-QSVE--ESRGR----LVTPGTPLTLCTAS
47	-QSVE--ESRGR----LVKPDETLTLTCTVS
48	-QSVE--ESRGD----LVKPEGSLTLCTAS
49	-QSLE--ESGGR----LVTPGTPLTLCTIS
50	-QSLE--ESGGR----LVTLGTPLTLTCTVS
51	-QSLE--ESWGR----LVKPDETLTITCTVS
52	-QSVE--ESGGG----LVQPGGSLKLSCKAS
53	QEQLV--ESGGG----LVKPEGSLTLCKAS

ES 2 540 807 T3

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 1-31
54	-QSVE--ESGGN----LVTPGTPLTLTCTVS
55	QQQLM--ESGGG----LVQPGGSLKLSCKAS
56	QEQLMETESGGGAEGGLVKPGGSLELCKAS
57	QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTLTCTAS
58	--QSLE-ESGGR----LVTPGTPLTLTCTVS
59	--QSVE-ESRGD----LVKPGASLTLTCTAS
60	--QSVE-ESGGR----LITPGGSLTLTCTVS
61	--QSLE-ESGGD----LVKPGASLTLTCTAS
62	--QSVE-ESRGR----LVTPGTPLTLTCTVS
63	QEQLMETESGGG----LVKPGASLTLTCTAS
64	--QSLE-ESGGD----LVQPGASLTLTCTAS
65	-QQQLV-ESGGD----LVKPEGSLTLTCTAS
66	--QSLE-ESGGD----LVKPEGSLTLTCTAS

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de dominios FR2 de V<sub>H</sub> seleccionados mediante métodos de la invención

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 45-58
67	WVRQAPGEGLEWIG
68	WVRQAPGKGLQYIG
69	WVRQAPGKGLEWIG
70	WVRQAPGKGLDWIG
71	WVRQAPGEGLDWIG
72	WVRQAPGKGLEYIG
73	WGRQAPREGLEWIG
74	WVRQAPGKRLEWIG
75	WVRQAPGKGLEWVA
76	WVRQAPEKGLEWIG
77	WVRQAPGKGLEWIA
78	WFRQAPGKGLEWIA
79	WFRQAPGKGLEWIG



ES 2 540 807 T3

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 45-58
80	WFRQAPGKELEWIG
81	WFRQAPGKGREWIG
82	WFRQAPGKGLEGIG
83	WVRQAPGKELEWIG
84	WVRQAPGKEREWIG
85	WVRQAPGKELEGIG
86	WVRQAPGKGREWIG
87	WVRQAPGKGREGIG
88	WVRQAPGKGLEGIG
89	WFRQAPGKEREWIG
90	WFRQAPGKELEGIG
91	WFRQAPGKGREGIG
92	WVRQAPGKEREIG
93	WFRQAPGKEREIG

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de dominios FR3 de V<sub>H</sub> seleccionados mediante métodos de la invención

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 70-110
94	YASWAKGRFTIS-KTSSTTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAR
95	YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSL-- TAADTATYYCAR
96	YATWAKGRFTIS-KTS-- TTVNLQMETTSLTTEDTATFFCAR
97	YASWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAS
98	YASWAEGRFSIS-- KASSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAR
99	YATWAKGRFTIS-- KTSSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAR

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 70-110
100	YANWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCVR
101	YASWPQGRFTIS- VTSSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAK
102	YASWAKGRFTIS-QTS-TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAR
103	YANWAKGRFTIA- KTSSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAR
104	YASWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAR
105	YATWAKGRFTIS- KPSSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAR
106	YPSWVDGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAR
107	YADWVTGRETISSHNAQNTLYLQLNLSL-- TAADTATYFCAR
108	YANWAKGRFTIS-KTP-TTVDLKINSP-- TTEDTATYFCAR
109	YANWAKGRCTIS-KTS-TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAP
110	YATWVNGRLTISSHNAQNTLYLQLNLSL-- TAADTATYFCAR
111	YADWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAR
112	YADWAKGRFTIS-KTS-TTMDLKITSP-- TTEDTATYFCGR
113	YASWVNGRETISSRNAQNTLYLQLNLSL-- TAADTATYFCAR
114	YASWVNGRETISSDNAQNTVLDLQLNLSL-- TAADTATYFCAR
115	YANWAKGRFTISS-KTS-TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAR

ES 2 540 807 T3

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 70-110
116	YANWAKGRFTIS-KTS-TTVLDLEIASP-- TTEDTATYFCVR
117	YASWAEGRFTIS-KASSTTVDLKMTSL-- TTEDTATYFCAR
118	YANWAKGRFTIS-RTS-TTVDLKMTSL-- TTEDTATYFCAR
119	YASWAKGRFTIS-KTSSTTVDLEMTSL-- TTEDTATYFCAR
120	YANWAKGRFTIS-KASSTTVELKMTGL-- TTEDTATYFCAR
121	YASWVNGRFTISSHNAQNTLYLQLNLSL-- TAADTATYFCAR
122	YANWARGRFTIS-RTS-TTVLDLEITSP-- TTEDTATYFCGR
123	YASWVNGRFTISRTS--TTVDLKMTSL-- TTEDTATYFCIR
124	YARWAKDRVTISKTS--TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCAR
125	YANWAKGRFTISKTS--TTVDLEIISP-- TKEDTATYFCAT
126	YANWAKGRFTISKAS--TTVDLKITSP-- TTEDTATYFCVR
127	YANWARGRFTISKTS--TTVDLKMTSP-- TTEDTAIYFCAR
128	YATWAKGRFTISKTS--TTVDLKVTSP-- TTEDTATYFCAS
129	YPSWAEGRFTISKTS--TTVDLKIASP-- ATEDTATYFCAR
130	YASWAKGRFTISRTS--TTADLRITSP-- TIEDTATYFCAR
131	YANWAKGRFTISKTS--TTVDLKMTSL-- TAADTATYFCAR
132	YATWAKGRFTISKTSS-TTVDLKMTSL-- TTEDTATYFCTR

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 70-110
133	YANWAKGRFTIS-RTS-TTVDLKMTSP-- TTEDTATYFCIR
134	YASWAEGRFTIS-RTS-TTVDLKMTSP-- TTEDTATYFCAR
135	YASWAKGPFTIS-KTS-TTVDLKMTSP-- TTEDMATYFCAR
136	YASWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP-- ITEDTATYFCIR
137	YASWVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNLSL-- TAADTATYFCAR
138	YANWVNGRFTISLDNAQNTVFLQMTSL-- TAADTATYFCAR

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de dominios FR4 de V<sub>H</sub> seleccionados mediante métodos de la invención

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 126-136
139	WGQGLTVTVSS
140	WPGGLTVTVSS
141	WGQGILTVTVSS
142	WGQGalTVTVSS
143	WPGGLVTIIS
144	WGQGLVTASS
145	WPGGLVAVSS
146	WGQGTRVTVSS
147	WPGGLVTGSS
148	WGQGSVTIIS
149	RGQGSVTIIS

Dominio variable de cadena ligera

- 5 Las tablas 7-10 presentan secuencias representativas de dominios de entramado variables de cadena ligera de conejo seleccionados mediante el ensayo de estabilidad y cribado de fagos. El análisis de secuencia de clones seleccionados en relación con combinaciones iniciales indicó que las siguientes secuencias proporcionan estabilidad y/o afinidad potenciadas, para el dominio FR1 de VL, ELVLTQTPPSLSASVGETVRIRC (SEQ ID NO: 150) o ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 155); para el dominio FR2 de VL, WYQQKPEKPTLLIS (SEQ ID NO: 174) o WYQQKPGQRPKLLIY (SEQ ID NO: 181); para el dominio FR3 de VL,
- 10

GVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDVATYYC (SEQ ID NO: 183) o GVSSRFKSGSGTQFTLTISGVQCADAATYYC (SEQ ID NO: 205); y para el dominio FR4 de VL, FGAGTNVEIK (SEQ ID NO: 206) o FAFGGGTELEIL (SEQ ID NO: 210).

5 Estudios de mutaciones puntuales adicionales indicaron que la presencia de una fenilalanina en la posición 39 (dentro del dominio FR2) y/o la presencia de una lisina en la posición 42 (dentro del dominio FR2) y/o la presencia de una cisteína en la posición 91 (el residuo de FR3 final) confirió estabilidad y/o afinidad potenciadas al dominio V<sub>L</sub>. Las posiciones de aminoácido son según las posiciones dentro de las alineaciones de secuencias presentadas en la figura 4.

Tabla 7. Secuencias de aminoácidos de dominios FR1 de V<sub>L</sub> seleccionados mediante métodos de la invención

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 1-23
150	ELVLTQTPPSLSASVGETVRIRC
151	ELDMTQTPASVSEPVGGTVTIKC
152	ELVLTQTPSPVSAAVGGTVTIKC
153	ELDLTQTPASVSEPVGGTVTIKC
154	ELVLTQTPSSASEPVGGTATIKC
155	ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC
156	ELDMTQTPASVSAAVGGTVTINC
157	ELDLTQTPASVEVAVGGTVTINC
158	ELDMTQTPSSVSAAVGGTVTINC
159	ELVMTQTPASVSAAVGGTVTINC
160	ELVMTQTPASVEAAVGDSVTINC
161	ELVLTQTPASVSEPVGGTVTIKC
162	ELVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC
136	ELVMTQTESPVSAPVGGTVTIKC
134	ELVLTQTPSSKSVPVGETVTINC
165	ELDMTQTPSSKSVVRGTVSISC
166	ELVLTQSPSSKSVPVGDTVTINC
167	ELDLTQTPPSLSASVGETVRIRC
168	ELDLTQTPASVEAAVGGTVTIKC
169	ELVMTQTPSPVSAAVGGTVTISC
170	ELVLTQTPSSKSVPVGDTVIINC
171	ELVLTQSPS-VSGAVGGTVIINC

ES 2 540 807 T3

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 1-23
172	ELVLTQTPSSVEAAVGGTVTIKC
173	ELVLTQTPASVEAAVGGTVTIKC

Tabla 8. Secuencias de aminoácidos de dominios FR2 de V<sub>L</sub> seleccionados mediante métodos de la invención

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 38-52
174	WYQQKPEKPPTLLIS
175	WYQQKPGQPPKLLIY
176	WYQQKPGQPPKRLIY
177	WYQLKPGQPPKLLIY
178	WYQQKPGQPPKPLIY
179	WFQQKPGQPPKLLIY
180	WYQQKPGKPPTLLIS
181	WYQQKPGQRPKLLIY
182	WYQQKAGKPPTLLIY

5 Tabla 9. Secuencias de aminoácidos de dominios FR3 de V<sub>L</sub> seleccionados mediante métodos de la invención

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 60-91
183	GVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDVATYYC
184	GVSSRFKSGSGSGTEFTLTISGVQCDDAATYYC
185	GVSSRFKGSRSRGTEYTLTISDLECADAAATYYC
186	GVSSRFKSGSGSGTEFTLTISDVQCDDAATYYC
187	GVPSRFKSGSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYC
188	GVPSRFRGSGSGTEFTLTISGMKAEDAATYYC
189	GVSSRFKSGSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYC
190	GVPSRFKSGSGSGTEYTLTISGVECDAAATYYC
191	GVPPRFSGSGAGTQFTLTISDLECDAAATYYC
192	GVPSRFKSGSGGAQFTLTISDLECDAAATYYC
193	GVPSRFKSGSGSGTQFTLTISDLECDAAATYYC

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 60-91
194	GVPSRFKGS GSGTEFTLTISGVQCDDAATYFC
195	GVPSRFKGS GSGTQFTLTISDVVCDDAATYYC
196	GVPSRFKGS GSGTDFLTISSVECDDAATYYC
197	GVPSRFSGSGSGTQFTLTISDLECD AATYYC
198	GVPPRFSGSGSGADYTLTIGGVQAEDAATYYC
199	GVPSRFKGS GSGTQFTLTISDVQCDDAATYYC
200	GVSSRFKGS GSGTQFTLTINDLECD AATYYC
201	GVPSRFKGS GSGTQFTLTISDVVCDDAATYGC
202	GVPSRFKGS GSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC
203	GVPSRFSGSGSGTEFTLTINDLDCDDAATYYC
204	GVPSRFKGS GSGTQFTLTISDLECAD AATYYC
205	GVSSRFKGS GSGTQFTLTISGVQCADAATYYC

Tabla 10. Secuencias de aminoácidos dominios de FR4 de V<sub>L</sub> seleccionados mediante métodos de la invención

SEQ ID NO	POSICIÓN DE ALINEACIÓN 60-91
206	F--GAGTNVEIK-
207	F--GGGTEVVVK-
208	F--GGGTELEIL-
209	F--GGGTQLTVTG
210	FAFGGGTELEIL-

**Lista de secuencias**

- 5 <110> TechnoPhage, Investigacao e Desenvolvimento em Biotecnologica SA
- <120> Dominios variables de anticuerpos de conejo modificados por ingeniería genética y usos de los mismos
- <130> 14116-105002
- <150> Documento US 60/916.226
- <151> 04-05-2007
- 10 <160> 210
- <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 540 807 T3

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

5 <400> 1

Gln Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ala  
85 90 95

Leu Tyr Ala Gly Ser Thr Thr Gly Ser Pro Phe Asn Leu Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus*

<400> 2



ES 2 540 807 T3

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Met Glu Thr Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr  
 35 40 45

Ile Gly Ile Ile Tyr Thr Gly Asp Ser Ala Ser Tyr Ala Ser Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu  
 65 70 75 80

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
 85 90 95

Arg Arg Gly Tyr Asn Ser Gly Trp Gly Ala Glu Asn Leu Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 3

<211> 126

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 3

ES 2 540 807 T3

Gln Glu Gln Leu Met Glu Thr Glu Ser Gly Gly Gly Ala Glu Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Glu Leu Cys Cys Lys Ala Ser Gly  
 20 25 30

Phe Ser Leu Ser Ile Asn Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 35 40 45

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Tyr Thr Asp Asp Gly Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp  
 65 70 75 80

Ile Asp Gln Ser Thr Gly Cys Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala  
 85 90 95

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Glu Tyr Val Tyr Ser Thr  
 100 105 110

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 4

<211> 124

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 4

ES 2 540 807 T3

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Tyr Pro Asp Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asn Trp Val  
50 55 60

Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Asp Asp Tyr Asn Asp Trp Gly Tyr Phe Asn  
100 105 110

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 5

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly Ser  
1 5 10 15

ES 2 540 807 T3

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asn Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Met Glu Thr Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ile Gly Tyr Tyr Ala  
50 55 60

Ser Trp Ala Glu Gly Arg Phe Ser Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr  
65 70 75 80

Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
85 90 95

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Val Gly Tyr Gly Gly Phe Trp Asp Leu  
100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 6

ES 2 540 807 T3

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Glu Thr Val Arg Ile Arg Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly  
20 25 30

Ile Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Pro Pro Thr Leu Leu Ile  
35 40 45

Ser Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Gly Gly Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Ala  
85 90 95

Asp Phe Gly Ala Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 7

<211> 114

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 7

ES 2 540 807 T3

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Lys Ser Val Pro Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Ala Gly Gly  
 20 25 30

Asn Arg Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu  
 65 70 75 80

Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Asp Cys  
 85 90 95

Ser Ser Ala Asp Cys Ser Ala Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val  
 100 105 110

Thr Gly

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 8

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Glu Ser Val Tyr Asn Asn  
 20 25 30

Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

ES 2 540 807 T3

50

55

60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu  
65 70 75 80

Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Ala Tyr Ser His  
85 90 95

Val His Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Leu  
100 105

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 9

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Gly Ala Val Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Ile Ile Asn Cys Gln Thr Ser Glu Ser Ile Ser Asn Trp Leu  
20 25 30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Ser Gly Ala Thr Asn  
85 90 95

Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly  
100 105

<210> 10

<211> 35

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador sintético

- <400> 10  
gggccaggc ggccagtcg gtggaggagt cctgg 35  
<210> 11  
<211> 35  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador sintético  
<400> 11  
10 gggcccaggc ggccagtcg gtgaaggagt ccgag 35  
<210> 12  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> cebador sintético  
<400> 12  
gggccaggc ggccagtcg ytgaggagt ccggg 35  
<210> 13  
20 <211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador sintético  
25 <400> 13  
gggccaggc ggccagsag cagctgrtgg agtccgg 37  
<210> 14  
<211> 38  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial  
<220>



<223> cebador sintético  
<400> 14  
gggccaggc ggccgagctc gtgmtgacct agactcca 38  
<210> 15  
5 <211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador sintético  
10 <400> 15  
gggccaggc ggccgagctc gatmtgacct agactcca 38  
<210> 16  
<211> 38  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> cebador sintético  
<400> 16  
gggccaggc ggccgagctc gtgatgacct agactgaa 38  
20 <210> 17  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
25 <223> cebador sintético  
<400> 17  
gggccaggc ggccgagctc gtgctgactc agtcgcctc 40  
<210> 18  
<211> 46  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador sintético

<400> 18

cctggccggc ctggccacta gtgactgayg gagccttagg ttgcc 46

5 <210> 19

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador sintético

<400> 19

cctggccggc ctggccttg attccacat tgggcc 37

<210> 20

<211> 37

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador sintético

<400> 20

20 cctggccggc ctggccttag atctccagct cgggcc 37

<210> 21

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador sintético

<400> 21

cctggccggc ctggccttg acsaccacct cgggcc 37

<210> 22

30 <211> 40

<212> ADN

ES 2 540 807 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador sintético

<400> 22

5 cctggccggc ctggccgcct gtgacggcca gctgggtccc 40

<210> 23

<211> 25

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

10 <400> 23

Gln Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Thr Cys Thr Val Ser  
20 25

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

15 <213> *Oryctolagus*

<400> 24

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 25

<211> 24

20 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 25

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
20

<210> 26

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

5 <400> 26

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus*

<400> 27

Gln Gln Gln Leu Met Lys Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
20 25

<210> 28

<211> 24

15 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 28

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Pro Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 29

20 <211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 29

ES 2 540 807 T3

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 30

<211> 24

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 30

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 31

10 <211> 25

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 31

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
20 25

15 <210> 32

<211> 25

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 32

Gln Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
20 25

20

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 33

Gln Ser Met Lys Glu Ser Glu Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser  
1                   5                   10                   15

5 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
                  20

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

10 <400> 34

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
                  20

<210> 35

<211> 24

<212> PRT

15 <213> *Oryctolagus*

<400> 35

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro  
                  20

<210> 36

<211> 24

20 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 36

ES 2 540 807 T3

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 37

<211> 24

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 37

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 38

10 <211> 25

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 38

Gln Glu Gln Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
20 25

15 <210> 39

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 39

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20

20

<210> 40

<211> 25

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 40

Gln Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
20 25

5 <210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 41

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

10 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser

20

<210> 42

<211> 24

<212> PRT

15 <213> *Oryctolagus*

<400> 42

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
20

<210> 43

<211> 24

20 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 43



ES 2 540 807 T3

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Gly Leu Phe Lys Pro Thr Asp Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 44

<211> 24

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 44

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Ile Ser Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 45

<211> 24

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 45

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 46

15 <211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 46

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20

20 <210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 47

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

5 <210> 48

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 48

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20

10

<210> 49

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 49

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ile Ser  
20

<210> 50

<211> 24

<212> PRT

20 <213> *Oryctolagus*

<400> 50

ES 2 540 807 T3

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Leu Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 51

<211> 24

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 51

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Trp Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 52

<211> 24

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 52

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
20

<210> 53

15 <211> 25

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 53

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser  
20 25

20 <210> 54

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 54

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
 20

5 <210> 55

<211> 25

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 55

Gln Gln Gln Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser  
 20 25

10

<210> 56

<211> 31

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 56

Gln Glu Gln Leu Met Glu Thr Glu Ser Gly Gly Gly Ala Glu Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Glu Leu Cys Cys Lys Ala Ser  
 20 25 30

<210> 57

<211> 31

<212> PRT

20 <213> *Oryctolagus*

<400> 57

ES 2 540 807 T3

Gln Glu Gln Leu Met Glu Thr Glu Ser Gly Gly Gly Ala Glu Gly Gly  
1 5 10 15

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20 25 30

<210> 58

<211> 24

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 58

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 59

<211> 24

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 59

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20

<210> 60

15 <211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 60

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Ile Thr Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

20 <210> 61

<211> 24

ES 2 540 807 T3

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 61

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20

5 <210> 62

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 62

Gln Ser Val Glu Glu Ser Arg Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
1 5 10 15

10 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser  
20

<210> 63

<211> 27

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 63

Gln Glu Gln Leu Met Glu Thr Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro  
1 5 10 15

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20 25

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

20 <213> *Oryctolagus*

<400> 64

ES 2 540 807 T3

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20

<210> 65

<211> 25

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 65

Gln Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20 25

<210> 66

<211> 24

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 66

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser  
20

<210> 67

15 <211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 67

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

20 <210> 68

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 68

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Tyr Ile Gly  
1                   5                   10

<210> 69

<211> 14

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 69

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1                   5                   10

<210> 70

10 <211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 70

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile Gly  
1                   5                   10

15 <210> 71

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 71

20 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Asp Trp Ile Gly  
1                   5                   10

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

25 <400> 72

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly  
1                   5                   10

<210> 73

<211> 14



<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 73

Trp Gly Arg Gln Ala Pro Arg Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1                   5                   10

5 <210> 74

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 74

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Gly  
1                   5                   10

10

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 75

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
1                   5                   10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

20 <213> *Oryctolagus*

<400> 76

Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1                   5                   10

<210> 77

<211> 14

25 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 77

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala  
1                   5                   10

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

5 <400> 78

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala  
 1                      5                                      10

<210> 79

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 79

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1                      5                                      10

15 <210> 80

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> *Oryctolagus*

<400> 80

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Ile Gly  
 1                      5                                      10

<210> 81

<211> 14

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 81

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 82

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 82

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Ile Gly

10 1 5 10

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 83

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 84

20 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

25 <400> 84

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 85

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 85

5 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Gly Ile Gly  
1 5 10

<210> 86

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 86

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

<210> 87

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

20 <400> 87

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Ile Gly  
1 5 10

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 88

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Ile Gly  
1 5 10

<210> 89

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 89

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Ile Gly  
 1                      5                      10

<210> 90

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

15 <400> 90

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Gly Ile Gly  
 1                      5                      10

<210> 91

<211> 14

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Oryctolagus*

<400> 91

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Ile Gly  
 1                      5                      10

25 <210> 92

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>



ES 2 540 807 T3

Tyr Ala Thr Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Ile Asp  
1 5 10 15

Gln Ser Thr Gly Cys Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr  
20 25 30

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
35

<210> 96

<211> 39

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 96

Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asn Leu Gln Met Glu Thr Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr  
20 25 30

Ala Thr Phe Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 97

<211> 40

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 97

Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp  
20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35 40

15 <210> 98

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

ES 2 540 807 T3

<400> 98

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Ser  
35

<210> 99

<211> 40

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 99

Tyr Ala Ser Trp Ala Glu Gly Arg Phe Ser Ile Ser Lys Ala Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp  
20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35 40

<210> 100

10 <211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 100

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Val Arg  
35

15 <210> 101

<211> 40

<212> PRT



<213> *Oryctolagus*

<400> 101

Tyr Ala Ser Trp Pro Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Thr Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Lys  
 35 40

<210> 102

5 <211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 102

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Thr Ser Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30  
 Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

10 <210> 103

<211> 40

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 103

Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35 40

15

<210> 104

<211> 40

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 104

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ala Lys Thr Ser Ser  
 1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Glu Thr Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp  
 20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35 40

5 <210> 105

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 105

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
 1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

10

<210> 106

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 106

Tyr Pro Ser Trp Val Asp Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
 1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

<210> 107

<211> 39

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 107

5 Tyr Ala Asp Trp Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser His Asn Ala  
 1 5 10 15  
 Gln Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr  
 20 25 30  
 Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

<210> 108

<211> 37

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus*

<400> 108

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Cys Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30  
 Tyr Phe Cys Ala Pro  
 35

<210> 109

<211> 39

15 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 109

Tyr Ala Thr Trp Val Asn Gly Arg Leu Thr Ile Ser Ser His Asn Ala  
 1 5 10 15  
 Gln Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr  
 20 25 30  
 Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

<210> 110

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 110

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Pro Thr  
 1                      5                                      10                                      15

5 Thr Val Asp Leu Lys Ile Asn Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
                     20                                      25                                      30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

<210> 111

<211> 37

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 111

Tyr Ala Asp Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
 1                      5                                      10                                      15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
                     20                                      25                                      30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

<210> 112

15 <211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 112

Tyr Ala Asp Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
 1                      5                                      10                                      15

Thr Met Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
                     20                                      25                                      30

Tyr Phe Cys Gly Arg  
 35

<210> 113

<211> 39

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

5 <400> 113

Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Arg Asn Ala  
1 5 10 15

Gln Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr  
20 25 30

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 114

<211> 39

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus*

<400> 114

Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala  
1 5 10 15

Gln Asn Thr Val Asp Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr  
20 25 30

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 115

<211> 37

15 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 115

ES 2 540 807 T3

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 116

<211> 37

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 116

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Glu Ile Ala Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Val Arg  
35

<210> 117

<211> 38

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 117

Tyr Ala Ser Trp Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala  
20 25 30

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 118

15 <211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

ES 2 540 807 T3

<400> 118

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 119

<211> 38

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 119

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Thr Val Asp Leu Glu Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala  
20 25 30

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 120

10 <211> 38

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 120

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Thr Val Glu Leu Lys Met Thr Gly Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala  
20 25 30

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

15 <210> 121

<211> 39

<212> PRT

ES 2 540 807 T3

<213> *Oryctolagus*

<400> 121

Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser His Asn Ala  
1 5 10 15

Gln Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr  
20 25 30

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 122

5 <211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 122

Tyr Ala Asn Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Glu Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Gly Arg  
35

10 <210> 123

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 123

15 Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Ile Arg  
35

<210> 124

<211> 37



<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 124

Tyr Ala Arg Trp Ala Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
 1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

5 <210> 125

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 125

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
 1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Glu Ile Ile Ser Pro Thr Lys Glu Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Thr  
 35

10

<210> 126

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 126

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr  
 1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30

Tyr Phe Cys Val Arg  
 35

<210> 127

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 127

Tyr Ala Asn Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1                   5                   10                   15

Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Ile  
                  20                   25                   30

5 Tyr Phe Cys Ala Arg  
                  35

<210> 128

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

10 <400> 128

Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1                   5                   10                   15

Thr Val Asp Leu Lys Val Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
                  20                   25                   30

Tyr Phe Cys Ala Ser  
                  35

<210> 129

<211> 37

<212> PRT

15 <213> *Oryctolagus*

<400> 129

Tyr Pro Ser Trp Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1                   5                   10                   15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Ala Ser Pro Ala Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
                  20                   25                   30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
                  35

<210> 130

<211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

5 <400> 130

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr  
 1 5 10 15

Thr Ala Asp Leu Arg Ile Thr Ser Pro Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

<210> 131

<211> 37

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus*

<400> 131

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
 1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr  
 20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

<210> 132

<211> 38

15 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 132

ES 2 540 807 T3

Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala  
20 25 30

Thr Tyr Phe Cys Thr Arg  
35

<210> 133

<211> 37

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 133

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Ile Arg  
35

<210> 134

<211> 37

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 134

Tyr Ala Ser Trp Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 135

15 <211> 37

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

ES 2 540 807 T3

<400> 135

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Pro Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Met Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

<210> 136

<211> 37

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 136

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Ile Thr Glu Asp Thr Ala Thr  
20 25 30

Tyr Phe Cys Ile Arg  
35

<210> 137

10 <211> 39

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 137

Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala  
1 5 10 15

Gln Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr  
20 25 30

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
35

15 <210> 138

<211> 39

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 138

Tyr Ala Asn Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ala  
 1 5 10 15

Gln Asn Thr Val Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr  
 20 25 30

Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
 35

<210> 139

5 <211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 139

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

10 <210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 140

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

15 <210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 141

20 <210> 142

Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

25 <400> 142

<400> 142

Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 143

<211> 11

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 143

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser  
1 5 10

<210> 144

10 <211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 144

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Ala Ser Ser  
1 5 10

15 <210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 145

20 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Ala Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

25 <400> 146

Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 147

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Gly Ser Ser  
1                   5                   10

5 <210> 148

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 148

10 Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Ile Ser Ser  
1                   5                   10

<210> 149

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 149

Arg Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Ile Ser Ser  
1                   5                   10

<210> 150

<211> 23

<212> PRT

20 <213> *Oryctolagus*

<400> 150

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1                   5                   10                   15

Glu Thr Val Arg Ile Arg Cys

20

<210> 151

25 <211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*



ES 2 540 807 T3

<400> 151

Glu Leu Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys  
20

<210> 152

<211> 23

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 152

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys  
20

<210> 153

10 <211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 153

Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys  
20

15 <210> 154

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 154

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly  
1 5 10 15

20 Gly Thr Ala Thr Ile Lys Cys  
20

<210> 155

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 155

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

5 Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys  
20

<210> 156

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

10 <400> 156

Glu Leu Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys  
20

<210> 157

<211> 23

<212> PRT

15 <213> *Oryctolagus*

<400> 157

Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys  
20

<210> 158

<211> 23

20 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 158

ES 2 540 807 T3

Glu Leu Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys  
20

<210> 159

<211> 23

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 159

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys  
20

<210> 160

<211> 23

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 160

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Asn Cys  
20

<210> 161

15 <211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 161

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys  
20

20 <210> 162

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 162

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys  
 20

5 <210> 163

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 163

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys  
 20

10

<210> 164

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 164

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Pro Val Gly  
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 165

<211> 23

<212> PRT

20 <213> *Oryctolagus*

<400> 165

Glu Leu Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Pro Val Arg  
1 5 10 15

Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys  
20

<210> 166

<211> 23

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 166

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Lys Ser Val Pro Val Gly  
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys  
20

<210> 167

<211> 23

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 167

Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Glu Thr Val Arg Ile Arg Cys  
20

<210> 168

15 <211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 168

Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys  
20

20 <210> 169

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 169

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys  
 20

5 <210> 170

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 170

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Pro Val Gly  
 1 5 10 15

10 Asp Thr Val Ile Ile Asn Cys  
 20

<210> 171

<211> 22

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 171

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Gly Ala Val Gly Gly  
 1 5 10 15

Thr Val Ile Ile Asn Cys  
 20

<210> 172

<211> 23

<212> PRT

20 <213> *Oryctolagus*

<400> 172

ES 2 540 807 T3

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys  
20

<210> 173

<211> 23

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 173

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys  
20

<210> 174

<211> 15

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 174

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Pro Pro Thr Leu Leu Ile Ser  
1 5 10 15

<210> 175

15 <211> 15

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

20 <210> 176

<211> 15

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 176

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 177

<211> 15

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 177

Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 178

<211> 15

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 178

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Pro Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 179

15 <211> 15

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 179

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

20 <210> 180

<211> 15

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 180

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Thr Leu Leu Ile Ser  
 1 5 10 15

25 <210> 181

<211> 15

<212> PRT



<213> *Oryctolagus*

<400> 181

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 182

5 <211> 15

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 182

Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Lys Pro Pro Thr Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

10 <210> 183

<211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 183

Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr  
 1 5 10 15

15 Leu Thr Ile Gly Gly Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 184

<211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

20 <400> 184

Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 185

<211> 32

<212> PRT



ES 2 540 807 T3

<210> 189

<211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

5 <400> 189

Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 190

<211> 32

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 191

15 <211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 191

Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

20 <210> 192

<211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 192

ES 2 540 807 T3

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ala Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 193

<211> 32

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 193

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 194

<211> 32

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 194

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys  
 20 25 30

<210> 195

15 <211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 195

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

20 <210> 196

<211> 32

ES 2 540 807 T3

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 196

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

5 <210> 197

<211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 197

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
1 5 10 15

10 Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 198

<211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

15 <400> 198

Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Gly Gly Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 199

<211> 32

<212> PRT

20 <213> *Oryctolagus*

<400> 199

ES 2 540 807 T3

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 200

<211> 32

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus*

<400> 200

Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 201

<211> 32

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 201

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Gly Cys  
 20 25 30

<210> 202

15 <211> 32

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 202

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

20 <210> 203

<211> 32



<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 207

5 Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
1 5 10

<210> 208

<211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus*

10 <400> 208

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Leu  
1 5 10

<210> 209

<211> 11

<212> PRT

15 <213> *Oryctolagus*

<400> 209

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly  
1 5 10

<210> 210

<211> 12

20 <212> PRT

<213> *Oryctolagus*

<400> 210

Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Leu  
1 5 10



**REIVINDICACIONES**

1. Método para producir un dominio  $V_L$  o  $V_H$  de conejo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, en el que dicho método es un primer método que comprende:

5 a) seleccionar de una biblioteca de expresión en fago un conjunto de secuencias de ADN que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  que se unen inmunoespecíficamente a dicho antígeno, preparándose dicha biblioteca de expresión en fago a partir de secuencias de ADN o ADNc que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  y que se obtuvieron a partir de una muestra biológica de un conejo que contenía células que expresan inmunoglobulinas; y

10 b) expresar dicho conjunto de secuencias, o un subconjunto del mismo, en bacterias como una proteína de fusión con CAT, seleccionar bacterias que tienen resistencia a cloranfenicol en virtud de la expresión de CAT y obtener secuencias que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo a partir de las bacterias seleccionadas, mediante lo cual dicha resistencia bacteriana a cloranfenicol conferida por dicha fusión con CAT se correlaciona con la solubilidad, estabilidad y/o falta de agregación de dicha secuencia fusionada con CAT;

o un segundo método que comprende:

15 a) expresar secuencias de ADN o ADNc que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  en bacterias como una proteína de fusión con CAT, en el que dichas secuencias de ADN o ADNc se obtuvieron a partir de una muestra biológica de un conejo que contenía células que expresan inmunoglobulinas;

20 b) seleccionar bacterias que tienen resistencia a cloranfenicol en virtud de la expresión de CAT y obtener el conjunto de secuencias que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  de conejo a partir de las bacterias seleccionadas, mediante lo cual dicha resistencia bacteriana a cloranfenicol conferida por dicha fusión con CAT se correlaciona con la solubilidad, estabilidad y/o falta de agregación de dicha secuencia fusionada con CAT; y

c) seleccionar de una biblioteca de expresión en fago secuencias de ADN que codifican para dominios  $V_H$  o  $V_L$  que se unen inmunoespecíficamente a dicho antígeno, mediante lo cual se prepara dicha biblioteca a partir de dicho conjunto de secuencias, o subconjunto del mismo.

25 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica de conejo es de un conejo que se ha inmunizado con dicho antígeno.

3. Método según la reivindicación 1, en el que, en dicho primer método, la etapa a) se repite una o más veces o en el que, en dicho segundo método, la etapa c) se repite una o más veces.

4. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica comprende células plasmáticas, tejido linfóide, médula ósea o tejido de apéndice.

30 5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha muestra comprende tejido linfóide y dicho tejido linfóide es tejido de bazo o tejido de ganglios linfáticos.

6. Polipéptido que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, en el que dicho polipéptido comprende uno o ambos de un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, y al menos uno de

35 (a) un dominio FR1 de  $V_H$  que tiene la secuencia de aminoácidos QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTLTCTAS (SEQ ID NO: 57);

(b) un dominio FR3 de  $V_H$  que tiene la secuencia de aminoácidos YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTATYYCAR (SEQ ID NO: 95);

(c) un dominio FR1 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos ELVLTQTTPPSLSASVGETVRIRC (SEQ ID NO: 150);

40 (d) un dominio FR3 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos GVSSRFKSGSGTQFTLTISGVQCADAATYYC; (SEQ ID NO: 205); o

(e) un dominio FR4 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos FAFGGGTELEIL (SEQ ID NO: 210).

7. Polipéptido según la reivindicación 6, que comprende además al menos uno de

(f) un dominio FR2 de  $V_H$  que tiene la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 69);

(g) un dominio FR4 de  $V_H$  que tiene la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 139);

(h) un dominio FR1 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 155);

5 (i) dominio FR2 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos WYQQKPEKPPTLLIS (SEQ ID NO: 174) o WYQQKPGQRPKLLIY (SEQ ID NO: 181);

(j) un dominio FR3 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos GVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDVATYYC (SEQ ID NO: 183); o

(k) un dominio FR4 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos FGAGTNVEIK (SEQ ID NO: 206).

8. Polipéptido según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho polipéptido comprende además al menos uno de

10 (a) en el dominio FR2 de  $V_H$ , una fenilalanina en la posición 46;

(b) en el dominio FR2 de  $V_H$ , un ácido glutámico en la posición 53;

(c) en el dominio FR2 de  $V_H$ , una arginina en la posición 54;

(d) en el dominio FR2 de  $V_H$ , una glicina en la posición 56;

(e) en el dominio FR2 de  $V_H$ , una alanina en la posición 58;

15 (f) en el dominio CDR1 de  $V_H$ , una cisteína en la posición 44;

(g) en el dominio CDR2 de  $V_H$ , una cisteína en la posición 59;

(h) en el dominio FR4 de  $V_H$ , una arginina en la posición 126;

(i) en el dominio FR2 de  $V_L$ , una fenilalanina o una tirosina en la posición 39;

(j) en el dominio FR2 de  $V_L$ , una lisina en la posición 45; o

20 (k) en el dominio FR3 de  $V_L$ ; una cisteína en la posición 91,

en el que dichas posiciones son según las posiciones de las alineaciones de secuencias del dominio  $V_H$  o  $V_L$  en las figuras 3 y 4, respectivamente.

9. Polipéptido que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, en el que dicho polipéptido comprende uno o ambos de un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, y al menos uno de

25 (f) un dominio FR2 de  $V_H$  que tiene la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 69);

(g) un dominio FR4 de  $V_H$  que tiene la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 139);

(h) un dominio FR1 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO: 155);

30 (i) dominio FR2 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos WYQQKPEKPPTLLIS (SEQ ID NO: 174) o WYQQKPGQRPKLLIY (SEQ ID NO: 181);

(j) un dominio FR3 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos GVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDVATYYC (SEQ ID NO: 183); o

(k) un dominio FR4 de  $V_L$  que tiene la secuencia de aminoácidos FGAGTNVEIK (SEQ ID NO: 206); y

en el que dicho polipéptido comprende además al menos uno de

35 (a) en el dominio FR2 de  $V_H$ , una fenilalanina en la posición 46;

- (b) en el dominio FR2 de  $V_H$ , un ácido glutámico en la posición 53;
- (c) en el dominio FR2 de  $V_H$ , una arginina en la posición 54;
- (d) en el dominio FR2 de  $V_H$ , una glicina en la posición 56;
- (e) en el dominio FR2 de  $V_H$ , una alanina en la posición 58;
- 5 (f) en el dominio CDR1 de  $V_H$ , una cisteína en la posición 44;
- (g) en el dominio CDR2 de  $V_H$ , una cisteína en la posición 59;
- (h) en el dominio FR4 de  $V_H$ , una arginina en la posición 126;
- (i) en el dominio FR2 de  $V_L$ , una fenilalanina o una tirosina en la posición 39;
- (j) en el dominio FR2 de  $V_L$ , una lisina en la posición 45; o
- 10 (k) en el dominio FR3 de  $V_L$ ; una cisteína en la posición 91
- en el que dichas posiciones son según las posiciones de las alineaciones de secuencias del dominio  $V_H$  o  $V_L$  en las figuras 3 y 4, respectivamente.
- 15 10. Anticuerpo que comprende el polipéptido según la reivindicación 6, 7, 8 ó 9 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; en el que un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de dicho polipéptido se pliega para formar un polipéptido soluble, no agregado que permite la selección a una concentración de cloranfenicol de al menos 1,8 mM cuando se fusiona con CAT; y en el que el dominio  $V_H$  o  $V_L$  tiene una  $T_m$  de al menos 54°C.
- 20 11. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo de un solo dominio, un minicuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo biespecífico o un nanocuerpo; o en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que es un fragmento Fab, Fab',  $F(ab')_2$  o Fv.
12. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento no comprende un dominio CH1.
13. Versión quimérica o humanizada del anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12.
- 25 14. Anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que dicho antígeno no es inmunogénico en ratones o ratas.
15. Método según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno no es inmunogénico en ratones o ratas.
- 30 16. Polipéptido según la reivindicación 6, 7, 8 ó 9, en el que dicho polipéptido no tiene uno o más de un dominio CH<sub>1</sub>, dominio CH<sub>2</sub>, dominio CH<sub>3</sub> o dominio CL; o no tiene uno de un dominio  $V_H$  o  $V_L$ ; y en el que un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de dicho polipéptido se pliega para formar un polipéptido soluble, no agregado que permite la selección a una concentración de cloranfenicol de al menos 1,8 mM cuando se fusiona con CAT; y en el que el dominio  $V_H$  o  $V_L$  tiene una  $T_m$  de al menos 54°C.
17. Polipéptido según la reivindicación 16, que no comprende un dominio  $V_H$  de conejo.
18. Polipéptido según la reivindicación 16, que no comprende un dominio  $V_H$  de una especie distinta de conejo.
19. Polipéptido según la reivindicación 16, que no comprende un dominio  $V_L$  de conejo.
- 35 20. Polipéptido según la reivindicación 16, que no comprende un dominio  $V_L$  de una especie distinta de conejo.
21. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 16-20, que no comprende un dominio CH<sub>2</sub>.
22. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 16-20, que no comprende un dominio CH<sub>3</sub>.
23. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 16-20, que no comprende un dominio CH<sub>1</sub>.

24. Polipéptido según la reivindicación 16, en el que dicho antígeno no es inmunogénico en ratones o ratas.
25. Polipéptido según la reivindicación 16, en el que dicho polipéptido se conjuga además con un agente terapéutico, un péptido que interacciona con albúmina, un péptido que interacciona con fibronectina, fibronectina, albúmina, proteína A o proteína G.
- 5 26. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo o fragmento se conjuga además con un agente terapéutico, un péptido que interacciona con albúmina, un péptido que interacciona con fibronectina, fibronectina, albúmina, proteína A o proteína G.
- 10 27. Método según la reivindicación 1, en el que dicha selección es a una concentración de cloranfenicol de al menos 1,8 mM; el dominio  $V_H$  o  $V_L$  recombinante tiene una  $T_m$  de al menos 54°C; y/o el dominio  $V_H$  o  $V_L$  recombinante muestra una  $K_d$  para dicho antígeno de no más de 20 nM.
28. Polipéptido de fusión que comprende CAT fusionada con un dominio  $V_H$  o  $V_L$  de conejo, comprendiendo dicho dominio  $V_H$  o  $V_L$  el polipéptido según la reivindicación 6, 7, 8 ó 9.
- 15 29. Polipéptido de fusión según la reivindicación 28, en el que dicho dominio  $V_H$  o  $V_L$  se pliega para formar un polipéptido soluble, no agregado que permite la selección a una concentración de cloranfenicol de al menos 1,81 mM cuando se fusiona con la CAT; y en el que el dominio  $V_H$  o  $V_L$  tiene una  $T_m$  de al menos 54°C.
30. Polipéptido de fusión según la reivindicación 28, en el que dicho dominio carece de uno o más de un dominio  $CH_1$ , dominio  $CH_2$ , dominio  $CH_3$  o dominio  $CL$ ; o que carece de uno de un dominio  $V_H$  o  $V_L$ .
31. Polipéptido de fusión que comprende CAT fusionada con el anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 10-14 y 26.
- 20 32. Polipéptido de fusión que comprende CAT fusionada con el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 16-25.
33. Polinucleótido que codifica para un polipéptido de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 28-32.
34. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 33.
35. Célula huésped que comprende el polinucleótido según la reivindicación 34.
- 25 36. Célula huésped según la reivindicación 35, en la que dicha célula es una célula bacteriana.

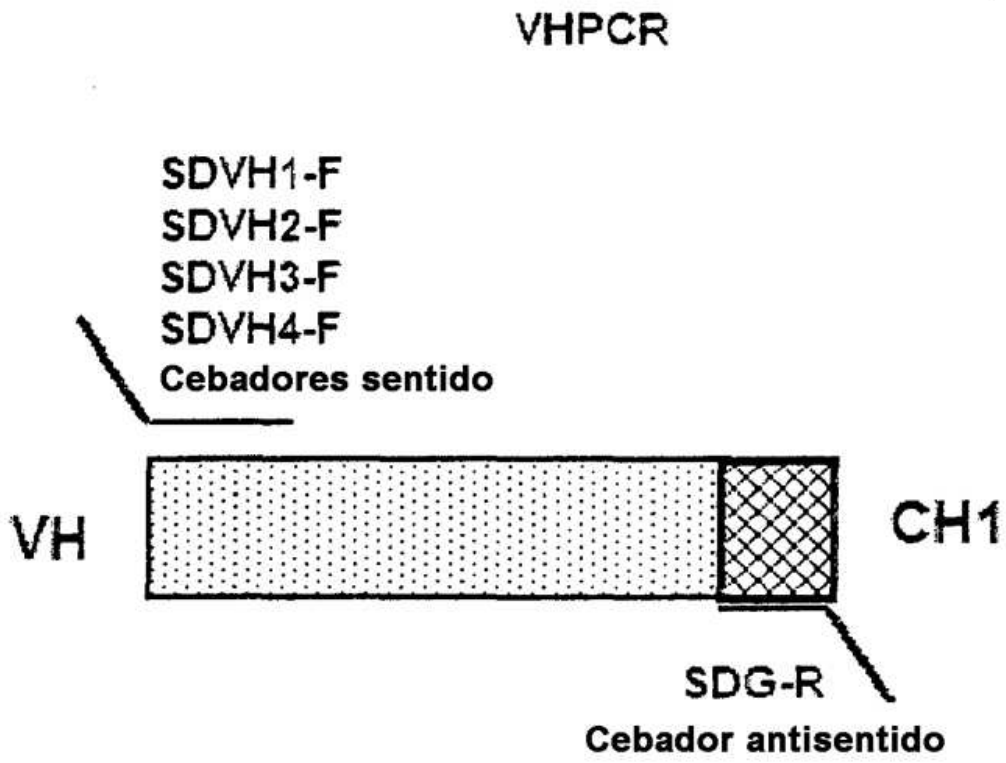


FIG. 1

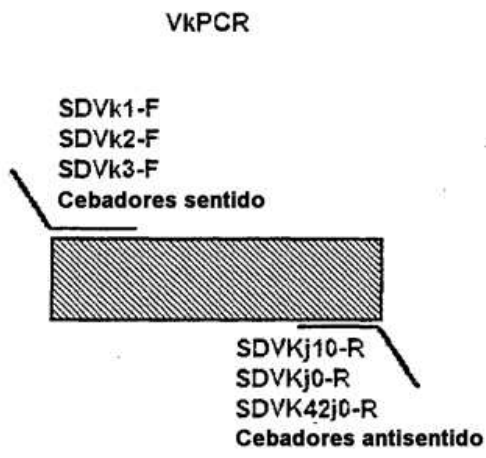


FIG. 2A

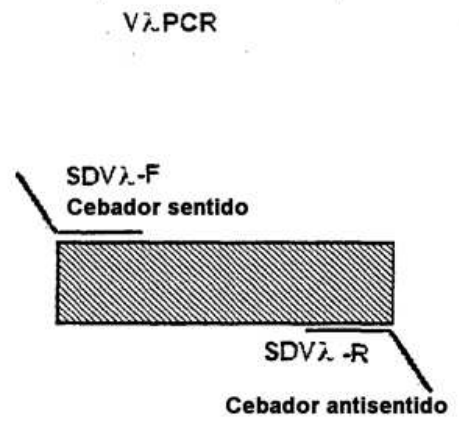


FIG. 2B

	FR1 de VH	CDR1 de VH	FR2 de VH	CDR2 de VH	FR3 de VH	CDR3 de VH	FR4 de VH	
	31	45	58 59	70	110 111	126	136	
(SEQ ID NO:1)	DOQLV--ESGR-----LVKPELITITCTVS	GIDL-SSNHH--	HVRQAPGKLEWIG	IIS--TIGASTY	YASNAKGRPTIS-KTS-TIVDLKITSF--	TTEDTATVFCAR	ALVAGST-TGSPFNL	HGGTILVTVSS
(SEQ ID NO:2)	--QSVL-ESGR-----LVTFCTEITITCTAS	GFSLASVYHETI-	HVRQAPGKLEWIG	IIV--TIGSAS	YASNAKGRPTIS-KTSSTIVDLKITSF--	TTEDTATVFCAR	RG---YNSQNGEHL	HGGTILVTVSS
(SEQ ID NO:3)	DEQLMETESGGGAEGLVKKPKQSLLECCRAS	GFGLSINNYI--C	HVRQAPGKLEWIG	CVYT-DGGSTY	YATWVNGRFTLSRDIIDQSTGKQINSL-	TAAADTATVFCAR	KE-----YVYSTYNF	HGGTILVTVSS
(SEQ ID NO:4)	DFQLVLE--SGGSI-----YKREGSITITCTAS	GIDFS-HYGLIS--	HVRQAPGKLEWVA	YIYP-DYGTID	YANWVNGRFTLSLDMWQKIVELAKNTSL--	TAAADTATVFCAR	INLTYDIDWNGVYFNL	HGGTILVTVSS
(SEQ ID NO:5)	--QSLV-ESGGG-----LVQPEKSLITITCTAS	GFTIENSYHETC	HVRQAPGKLEWIG	CIYAGSSGIGY	YASNAKGRFSLIS-KASSTIVTIGKMTTISLTAADTATVFCAR	PV-----GYGGFMDL	HGRGTIATVSS	

FIG. 3

	FR1 de VL	CDR1 de VL	FR2 de VL	CDR2 de VL	FR3 de VL	CDR3 de VL	FR4 de VL
(SEQ ID NO:6)	1	23	36	52 53 60	91 92	106	116B
(SEQ ID NO:7)	ELVLTQTPPSLSASVGETVRIK	LASEDIYSG---IS	WYQOKPKPPTLLIS	GASMLER	GVFPRFGSGGTQVTLTIGWVAEDIVATYYC	LGSYSGSAD----	F--GAGTIVEIK-
(SEQ ID NO:8)	ELVLTQSPFSKSKVFPQDTVTINC	QASESVAGG-NRLS	WYQOKFGQPKLLIY	NASMLAS	GVFPRFKGSGGTQFTLLISDLCEDDAAATYYC	GGYDCSSADCS-A	F--GGATQILTVTG
(SEQ ID NO:9)	ELVLTQTPSPVSAAVGATVTIIC	QASESVYRNKQ IS	WFOOKFGQPKLLIY	EASKLAS	GVFPRFKGSGGTQFTLLISDLCEDDAAATYYC	GGNY---	F--GGGTREIL-
(SEQ ID NO:9)	ELVLTQSPFS-VSGAVGGTVIINC	QTSESIEN--N-LA	WYQOKFGQPKLLIY	DASKLAS	GVFPRFKGSGGTQFTLLISGWCDDPAATYYC	GGYS-GATNN--A	F--GGTQILTVC

FIG. 4



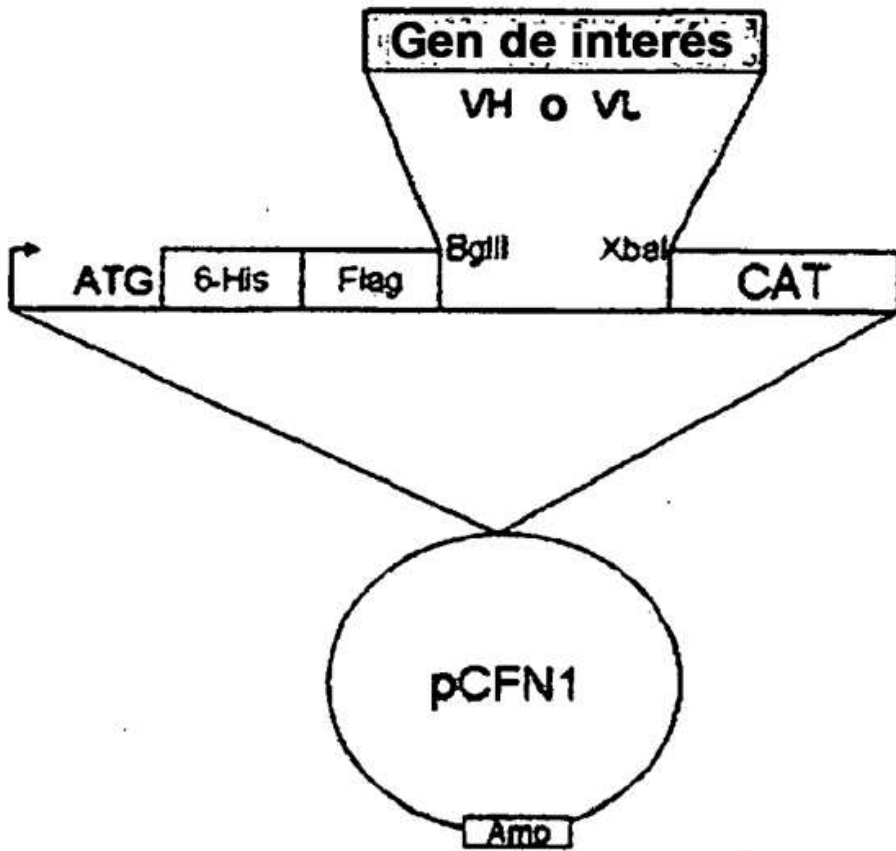


FIG. 5

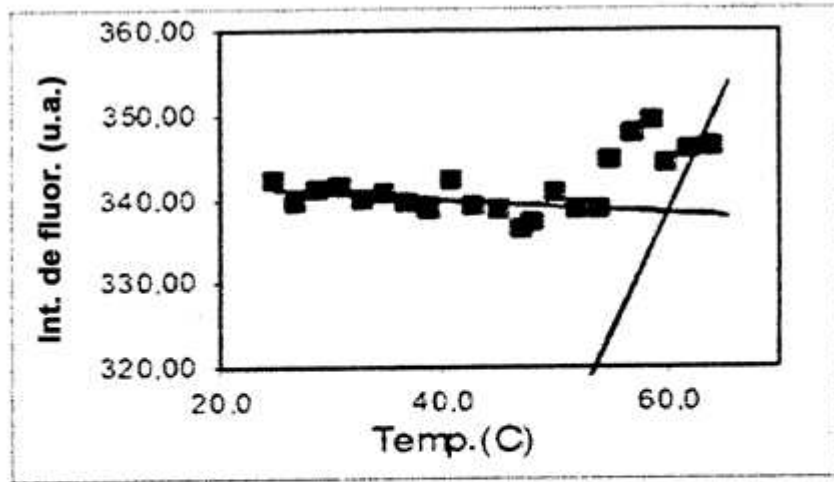


FIG. 6A

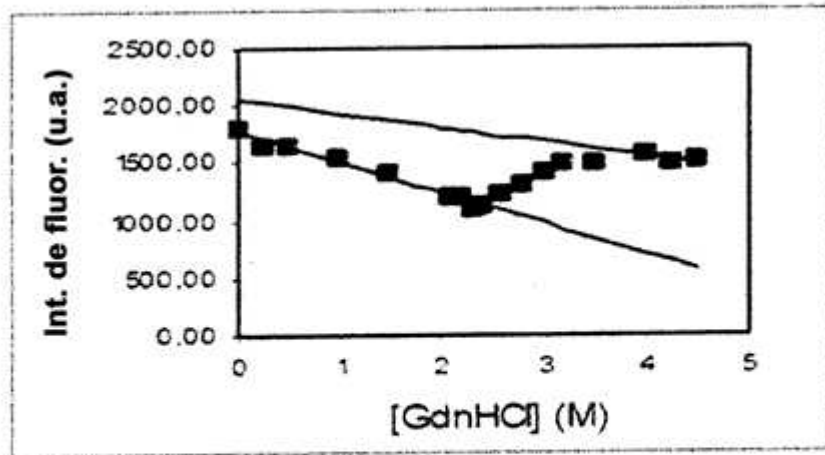


FIG. 6B