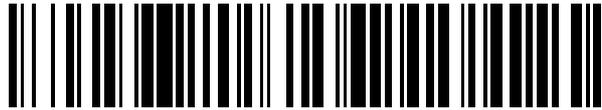


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 523**

51 Int. Cl.:

C40B 40/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2008 E 08867683 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2231904**

54 Título: **Diseño y generación de bibliotecas de presentación en fago por pIX de novo humanas mediante fusión con pIX o pVII, vectores, anticuerpos y métodos**

30 Prioridad:

19.12.2007 US 14786 P

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

23.03.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**TSUI, PING;
SHI, LEI;
LU, JIN;
WHEELER, JOHN;
WHITAKER, BRIAN;
BOROZDINA-BIRCH, LIONELLA;
ALMAGRO, JUAN;
AMEGADZIE, BERNARD;
TORNETTA, MARK;
REDDY, RAMACHANDRA;
KNIGHT, DAVID;
LUO, JINQUAN y
SWEET, RAYMOND**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 564 523 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).

Diseño y generación de bibliotecas de presentación en fago por pIX de novo humanas mediante fusión con pIX o pVII, vectores, anticuerpos y métodos**DESCRIPCIÓN****CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a composiciones y métodos para generar y usar bibliotecas de presentación en fago pIX para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha usado la presentación en fago filamentoso usando pIII y pVIII como componentes de fusión en sistemas de fagos o fagémidos como una tecnología para la ingeniería de proteínas, en particular para el aislamiento y la maduración por afinidad de anticuerpos *de novo*. Pueden generarse secuencias de fab similares a humanas a partir de secuencias de anticuerpos conocidas como moldes, y región determinante de la complementariedad (CDR) aleatoria o mutagenizada o regiones de unión al antígeno, tales como CDR3 de cadena pesada (H3), pueden generarse y aislarse de bibliotecas de fagos que presentan variaciones de secuencias de fragmentos de anticuerpo mediante inmunopurificación contra un antígeno u otra proteína diana de interés sin inmunización. Bibliotecas de anticuerpos *de novo* humanas previamente usadas se han creado sintéticamente o por clonación molecular de genes IgG de fuente(s) intacta(s). En una biblioteca sintética se diseñan y sintetizan secuencias de ADN de anticuerpo que incluyen región estructural de cadena pesada y cadena ligera variable y las regiones CDR basándose en 1) un gen IgG definido, 2) un gen de la línea germinal de Ig específico, y 3) secuencias consenso de familias de los genes de la línea germinal de Ig y 4) fragmentos de IgG derivados por PCR de fuentes naturales. Además de la biblioteca de anticuerpos sintéticos, también pueden crearse bibliotecas por clonación combinatoria de ADN de IgG derivado de tejidos humanos, por ejemplo, médulas óseas y glóbulos sanguíneos periféricos. Tales bibliotecas se han usado para proporcionar fragmentos de anticuerpos fab y para realizar rondas sucesivas de inmunopurificación y maduración o modificación para intentar encontrar fragmentos de anticuerpos fab que tienen propiedades deseadas tales como alta afinidad o actividad biológica inhibidora de una proteína diana seleccionada.

Se han aislado anticuerpos fab similares a humanos para varias proteínas diana de bibliotecas de anticuerpos pIII o pVIII de presentación en fago. Aunque son satisfactorios en aislar anticuerpos fab para dianas específicas, tales enfoques de biblioteca de presentación en fago padecen los problemas de tener que repetir el proceso de generación de bibliotecas, inmunopurificación y maduración varias veces para aislar anticuerpos fab que tienen las características deseadas. Tales bibliotecas de fagos también padecen el problema de que no engloban completamente o imitan la variedad de diversidad inmunitaria humana presente en los seres humanos, que incluye la contribución del par VH/VL, características de topología de diferentes familias de la línea germinal relacionadas con el reconocimiento del antígeno, la posición y el grado de la variación de aminoácidos, y la abundancia relativa de anticuerpos derivada de diferentes genes de la línea germinal humana. La desviación de anticuerpos sintéticos del repertorio natural puede aumentar el riesgo de propiedades bioquímicas desfavorables y de inmunogenicidad si se usan como terapéuticos en el hombre.

Existe la necesidad de bibliotecas de anticuerpos sintéticas y métodos que administran simultáneamente los elementos críticos de anticuerpos terapéuticos humanos de alta afinidad y actividad, alta productividad, buenas propiedades de disolución, y una propensión de baja respuesta inmunitaria cuando se administran en el hombre. Hay otra necesidad de aumentar la eficiencia del aislamiento de anticuerpos de bibliotecas sintéticas, con respecto a los métodos actuales, para reducir los costes de recursos del descubrimiento de anticuerpos y acelerar la administración de anticuerpos para la evaluación biológica. Las bibliotecas y métodos de la presente invención cumplen estas necesidades acoplando diseño completo, tecnologías de ensamblaje y presentación de Fab en pIX de fago.

El documento US 2003/186322 describe la presentación de polipéptidos exógenos sobre fago filamentoso usando una fusión entre el polipéptido exógeno y las proteínas de fago pVII o pIX. Gao et al. (PNAS, 2002, vol. 99(20) 12612-12616) construyeron una gran biblioteca de Fv monocatenario humano (scFv) de $4,5 \times 10^9$ miembros presentados sobre pIX. El documento US 5 658 727 desvela fago filamentoso que comprende una matriz de proteínas cpVIII. Kunkel et al. (Methods in Enzymology, 1991, vol. 204, 125-139) desvela la eficaz mutagénesis dirigida al sitio usando ADN que contiene uracilo.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un vector de fago de ácido nucleico recombinante manipulado por ingeniería para expresar secuencias de aminoácidos de fragmentos fab de anticuerpos de fusión con pIX de presentación en fago que se unen a ligandos biológicamente activos seleccionados, que comprende: (i) a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el conductor de fago recombinante; operativamente enlazada a: b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica marca recombinante, promotor o de selección; operativamente enlazada a: c) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la línea germinal de la cadena pesada variable que se une selectivamente a dicho ligando

biológicamente activo; operativamente enlazada a: d) una porción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la línea germinal de la cadena pesada constante que se une selectivamente a dicho ligando biológicamente activo; operativamente enlazada a: e) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica conector peptídico; operativamente enlazada a: f) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica pIX recombinante; y (ii) a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la línea germinal de la cadena ligera variable que se une selectivamente a dicho ligando biológicamente activo; operativamente enlazada a: b) una porción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la línea germinal de la cadena ligera constante que se une selectivamente a dicho ligando biológicamente activo.

La invención también proporciona una biblioteca de fagos de células huésped bacterianas que comprende una pluralidad de vectores de fago de ácido nucleico manipulados por ingeniería según la invención.

La invención también proporciona un método de cribado de una biblioteca de fragmentos de anticuerpo fab de fagos que tiene una actividad biológica deseada, que comprende (a) expresar fragmentos de anticuerpos fab de una biblioteca de fagos según la invención, y (b) seleccionar células bacterianas que expresan dichos fragmentos de anticuerpos fab que tienen dicha actividad biológica deseada.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

A diferencia de la enseñanza del estado de la técnica, se ha descubierto ahora que pVII y pIX pueden usarse satisfactoriamente para generar bibliotecas de fab de alta afinidad, por ejemplo, usando mutagénesis u otras técnicas productoras de diversidad, opcionalmente con maduración en línea, para proporcionar una plataforma eficaz y rápida para la generación de fab y de fragmentos de anticuerpo y selección de anticuerpos terapéuticos. Según la presente divulgación, las regiones variables de anticuerpos o de fab fusionadas con pVII y pIX se acoplan en una interacción dinámica sobre la superficie del fago para presentar un fragmento de anticuerpo funcional, un motivo heterodimérico representativo. La presentación sobre el fago de regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo es, por tanto, un método adecuado y preferido para presentar y ensayar diversas bibliotecas de matrices heterodiméricas combinatorias en las que los miembros pueden funcionar como especies de anticuerpos artificiales diméricas y permitir la selección de actividades biológicas novedosas o deseadas.

En el presente documento se desvelan diversos métodos y componentes mejorados y nuevos de generación de bibliotecas *de novo* de presentación en fago de pIX y pVII, tales como, pero no se limitan a, uno o más de (i) bibliotecas *de novo* de Fab de anticuerpos diseñadas y presentadas fusionadas con las proteínas de fago pIX o pVII; (ii) el uso de una proteína de la superficie del fago diferente de pIII y pVIII ampliamente usadas del fago M13; (iii) el uso de una pequeña matriz de genes VH y VL de la línea germinal que representan la secuencia y estructura del repertorio humano; (iv) el uso de tales componentes de fago como andamiaje de biblioteca para proporcionar diversidades combinatorias diseñadas mejoradas en las regiones de complementariedad de las regiones Vh y VI; (v) procesos de selección de anticuerpos que permiten el examen sistemático del efecto de las secuencias diseñadas y topologías estructurales para el reconocimiento del antígeno; (vi) un proceso de maduración por afinidad simplificado y de maduración en línea como parte de la selección de bibliotecas. Un nuevo sistema tal de diseño, selección, optimización y maduración de bibliotecas a partir de bibliotecas individuales o grupos de bibliotecas proporciona un sistema reproducible y fiable para el satisfactorio descubrimiento *de novo* de anticuerpos y también facilita el entendimiento de la relación de función estructural de la interacción de anticuerpo con antígeno.

La biblioteca *de novo* de Fab humana descrita anteriormente es distinta del actual estado de la técnica de bibliotecas de anticuerpos por su presentación mediante el gen pIX del fago M13. El uso de secuencias de la línea germinal humana representativas y de estructuras como andamiajes de biblioteca y el diseño de secuencias de CDR que imitan la distribución de aminoácidos naturales cubren exhaustivamente el repertorio inmunitario humano, y los anticuerpos de biblioteca tienen alta identidad de secuencias con los anticuerpos humanos derivados de naturales. La exhaustiva cobertura del repertorio inmunitario humano aumenta la probabilidad del descubrimiento *de novo* de anticuerpos comparando con las bibliotecas construidas sobre una única línea germinal o andamiaje del gen IgG informado en la bibliografía. Las sub-bibliotecas preparadas por separado, que llevan cada una un único andamiaje (par VH/VL) y/o longitudes de H-CDR3, maximizan la probabilidad de identificar anticuerpo único y proporcionar un mecanismo para examinar sistemáticamente la estructura de unión anticuerpo/antígeno y las relaciones de función. El proceso de maduración por afinidad integrado reducirá el tiempo necesario para descubrir diversos anticuerpos y de alta afinidad.

Anticuerpos artificiales se definen aquí como motivos de proteína de gran diversidad que usan la estrategia funcional de la molécula de anticuerpo, pero pueden generarse libres de limitaciones *in vivo*, que incluyen (1) homología de secuencias y toxicidad de antígenos diana; (2) impacto biológico del anticuerpo generado en el huésped o en cultivos de hibridomas usados para recuperar el anticuerpo; y (3) cribado frente a la selección para la actividad deseada. La molécula de anticuerpo es un dispositivo biológico para la presentación de una matriz combinatoria de elementos de péptidos en el espacio tridimensional. La característica esencial es que mientras que las CDR (regiones determinantes de la complementariedad) cooperan para formar un sitio de unión, su interacción es dinámica y funcional con poca asociación estructural entre las propias CDR. De esta forma, el complemento completo de los residuos de aminoácidos está disponible para el reconocimiento del antígeno como coste energético mínimo para la unión. Se propone resumir la capacidad para controlar el diseño combinatorio de no solo el espacio

de secuencia, sino también del espacio tridimensional, y por último lugar trascendería el diseño natural del repertorio inmunitario.

Así, la divulgación describe un formato de presentación en fago combinatoria para la construcción de matrices de polipéptidos heterodiméricos altamente diversas. En particular, la divulgación describe una partícula de fago filamentosos que encapsula un genoma que codifica un polipéptido de fusión, en el que el polipéptido de fusión comprende un polipéptido exógeno fusionado con el extremo amino de una proteína de fago de filamentosos pVII o pIX. Preferentemente, la partícula de fago comprende la proteína de fusión expresada sobre la superficie de la partícula de fago.

En una realización preferida, el genoma del fago codifica además un segundo polipéptido de fusión, en el que el segundo polipéptido de fusión comprende un segundo polipéptido exógeno fusionado con el extremo amino de la proteína pIX y el primer polipéptido exógeno en el primer polipéptido de fusión está fusionado con el extremo amino de la proteína pVII. En esta realización, el primer y segundo polipéptidos de fusión pueden asociarse para formar un complejo de proteína heterodimérica, tal como un Fv de inmunoglobulina, un Fv catalítico, un receptor, una proteína de unión a ácido nucleico o una enzima.

En una realización relacionada, la divulgación describe un vector para expresar una proteína de fusión sobre la superficie de un fago filamentosos que comprende un casete para expresar la proteína de fusión. El casete incluye secuencias de ADN traducibles en la dirección 5' y en la dirección 3' operativamente enlazadas mediante una secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación direccional de un ADN de inserto, es decir, un policonector, en el que la secuencia en la dirección 5' codifica una señal de secreción procariota, la secuencia en la dirección 3' codifica una proteína de fago filamentosos pVII o pIX. Las secuencias de ADN traducibles están operativamente enlazadas a un conjunto de señales de expresión de ADN para la expresión de las secuencias de ADN traducibles como porciones del polipéptido de fusión. En una variación preferida, el vector comprende además un segundo casete para expresar una segunda proteína de fusión sobre la superficie del fago filamentosos, en el que el segundo casete tiene la estructura del primer casete con la condición de que el primer casete de expresión de la proteína de fusión codifique la proteína pVII y el segundo casete de expresión de la proteína de fusión codifique la proteína pIX. El vector se usa como genoma de fago para expresar complejos de proteína heterodimérica sobre la superficie de la partícula de fago en la que los dos polipéptidos exógenos del heterodímero están anclados sobre la partícula de fago por la fusión con la primera y segunda proteínas de fago, pVII y pIX, respectivamente.

En otra realización, la invención contempla una biblioteca de partículas de fago según la presente invención, es decir, una biblioteca combinatoria, en la que partículas representativas en la biblioteca presentan cada una una proteína de fusión diferente. Si la partícula presenta un complejo de proteína heterodimérica, la biblioteca comprende una biblioteca combinatoria de heterodímeros, tales como anticuerpos en forma de una biblioteca de moléculas Fv. Bibliotecas preferidas tienen una diversidad combinatoria de al menos 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , o cualquier intervalo o valor allí dentro, diferentes especies de proteína de fusión.

Una realización relacionada describe una proteína de fusión que comprende primer y segundo polipéptidos, en la que el primer polipéptido es una proteína exógena y el segundo polipéptido es una proteína de fago filamentosos pVII o pIX, en la que la proteína exógena está fusionada con el extremo amino de la proteína de fago filamentosos.

Todavía además, la divulgación contempla una variedad de métodos de producción de una biblioteca combinatoria de fago, que incluye clonar repertorios de genes que codifican un polipéptido exógeno en un vector de la presente invención, modificar la estructura de los polipéptidos exógenos en una biblioteca por mutagénesis, por combinación aleatoria de poblaciones de bibliotecas de la primera y segunda proteína de fusión, por selección de diana y por afinidad ("inmunopurificación") para alterar la diversidad de una biblioteca, y similares.

El diseño de proteínas con funciones mejoradas o novedosas es un objetivo importante con una variedad de aplicaciones médicas, industriales, medioambientales y de investigación básica. Tras el desarrollo de bibliotecas de anticuerpos combinatorias, una siguiente etapa poderosa es la evolución hacia construcciones de anticuerpos artificiales, además de otros motivos de proteína en los que especies diméricas son nativas o podrían ser funcionales.

La presente divulgación trata estos retos proporcionando un formato de presentación en fago para la construcción de matrices de polipéptidos heterodiméricas combinatorias en las que se utilizan pVII y pIX para la presentación de proteínas de fusión que forman especies diméricas. Es importante tener en cuenta que esto es una metodología completamente nueva debido a que pueden presentarse independientemente dos motivos de proteína en estrecha proximidad para generar una biblioteca de interacciones funcionales.

Inherente en el alcance y potencia de la tecnología es la capacidad para presentar una variedad de proteínas que pueden acoplarse en interacciones diméricas. Éstas incluyen no solo anticuerpos, sino también algunas enzimas, hormonas y receptores de hormona, y proteínas de unión a ADN. La tecnología de presentación descrita en el presente documento puede usarse para la alteración combinatoria de regiones estructurales de anticuerpo y para reorganizar y miniaturizar la estructura del anticuerpo o para presentar proteínas de unión a ADN, tales como

represores, como una biblioteca de heterodímeros para la selección contra secuencias de ADN particulares de importancia clínica y terapéutica.

5 Así, la presente tecnología proporciona la presentación y selección de proteínas diméricas mutantes y bibliotecas combinatorias en las que los miembros consisten en matrices heterodiméricas. Usando esta tecnología, la estructura de inmunoglobulina nativa, en un formato de Fv V_H-V_L heterodimérico mostrado en el presente documento, puede modificarse en diferentes formas y cribarse para especificidad y actividad. Por ejemplo, por alteración combinatoria de regiones estructurales (FR) u otras manipulaciones para reorganizar y miniaturizar la estructura de anticuerpo por procesos acuñados "barajado de la región determinante de la complementariedad (CDR)" y formación de "twincuerpos", emergerán estructuras secundarias similares a anticuerpos que contienen nuevos parátopes o elementos estructurales completamente diferentes. Se usará la selección para la unión y/o catálisis contra el antígeno natural y/o sustrato, además de algunos compuestos relacionados, para cribar las bibliotecas de proteínas heterodiméricas.

15 Además, las aleatorizaciones de secuencias para formar bibliotecas y los protocolos de barajado de cadenas para formar especies híbridas pueden conducir a subconjuntos de proteínas novedosas. Por ejemplo, la presentación y modificación de matrices de dominios de dedo de cinc en forma homodimérica o heterodimérica produce estructuras que poseen interacciones de ADN específicas. Además, son posibles construcciones completamente nuevas mediante la inserción de un fragmento codificante deseado dentro de un andamiaje previamente formado tal como una cadena de anticuerpo. Posibles inserciones incluyen una secuencia distintiva de enzima o una proteína de unión a represor.

25 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y explicativas solo y no son restrictivas de la invención como se reivindica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Secuencias de aminoácidos de V_H y V_L de andamiaje.

30 Figura 2. Diagrama de vectores de la presentación en fago y vector de expresión de Fab: pCNTO-Fab-pIX-lacl.

35 Figura 3A-C: Representación gráfica e imagen de la expresión de Fab del andamiaje de biblioteca y presentación. 3A muestra niveles relativos de la expresión de Fab sobre la superficie de M13. 3B muestra la expresión relativa de Fab en una transferencia Western usando anti-Fab'(2) como reactivo de detección. 3C muestra la expresión aproximada de andamiajes de Fab en sobrenadante de medio de *E. coli* por comparación con un Fab de concentración desconocida. Esto incluye los andamiajes de gen kappa (barras sólidas) y andamiajes de gen lambda (barras sombreadas).

40 Figura 4. Esquema del patrón de diseño de H-CDR3.

Figura 5. Esquema del diseño de oligonucleótidos de H-CDR3.

45 Figura 6. Distribución de aminoácidos en posiciones de H-CDR3 para el molde de H1-69. A. Distribución en las 393 posiciones D (longitud 9-14). B. Distribución en las 2163 posiciones N (longitud 9-14). C. Distribución en las 973 posiciones Y en H-CDR3 (longitud 9-14); D. Distribución en todas las posiciones en la longitud de H-CDR3 7 y 8 usando el codón NNS.

50 Figura 7. Diagrama resumen de las arquitecturas de bibliotecas.

Figura 8. Esquema de la eliminación de hebras parentales asistida por palíndromo.

Figura 9. Esquema de mega-cebador que se dirige a la región entera de una región V.

55 Figura 10. El fragmento V_H de éxito(s) se amplifica por PCR y se clona en un vector de bucle de V_L . El plásmido resultante se produce como ADNmc y sirve de molde para la hibridación del mega-cebador y la mutagénesis de digestión. El mega-cebador de la biblioteca Lc se usa para replicar el plásmido, incorporando así la diversidad de la biblioteca Lc en asociación con la secuencia de Hc aislada. Esta biblioteca de maduración por afinidad está encapsulada como el fago M13 y se utiliza para la inmunopurificación en fago contra el antígeno inicial para dar éxitos madurados por afinidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

65 La presente divulgación proporciona diversos métodos nuevos y componentes de generación de bibliotecas *de novo* de presentación en fago, tales como, pero no se limitan a (i) bibliotecas *de novo* de anticuerpos Fab diseñadas y presentadas fusionadas con las proteínas de fago pIX u otras; (ii) el uso de una proteína de fago de la superficie

diferente de pIII y pVIII ampliamente usadas del fago M13; (iii) el uso de una pequeña matriz de genes VH y VL de la línea germinal que representa la secuencia y estructura del repertorio humano; (iv) uso de tales componentes de fago como andamiaje de biblioteca para proporcionar diversidades combinatorias diseñadas mejoradas en las regiones de complementariedad de las regiones Vh y VI; (v) procesos de selección de anticuerpos que permiten el examen sistemático del efecto de las secuencias diseñadas y topologías estructurales para el reconocimiento del antígeno; (vi) un proceso de maduración por afinidad simplificado como parte de la selección de bibliotecas. Un sistema nuevo tal de diseño de bibliotecas, selección, optimización y maduración de bibliotecas individuales o grupos de bibliotecas proporciona un sistema reproducible y fiable para el satisfactorio descubrimiento *de novo* de anticuerpos y también facilita el entendimiento de la relación de la función estructural de la interacción del anticuerpo con el antígeno.

La biblioteca *de novo* de Fab humanos descrita anteriormente es distinta del actual estado de la técnica de bibliotecas de anticuerpos por su presentación mediante el gen pIX del fago M13. El uso de secuencias de la línea germinal humana representativas y de estructuras como andamiajes de biblioteca y el diseño de secuencias de CDR que imitan la longitud natural y la distribución de aminoácidos cubren exhaustivamente el repertorio inmunitario humano, y los anticuerpos de biblioteca son altamente homólogos a los anticuerpos humanos derivados naturales. La exhaustiva cobertura del repertorio inmunitario aumenta la probabilidad del descubrimiento *de novo* de anticuerpos comparando con las bibliotecas construidas sobre una única línea germinal o andamiaje del gen IgG informado en la bibliografía. Las sub-bibliotecas preparadas por separado, que llevan cada una un único andamiaje (par VH/VL y/o las longitudes de H-CDR3), maximizan la probabilidad de identificar anticuerpo único y proporcionar un mecanismo para examinar sistemáticamente la estructura de unión anticuerpo/antígeno y las relaciones de función. El proceso de maduración por afinidad integrado reducirá el tiempo necesario para descubrir diversos anticuerpos y de alta afinidad.

Definiciones:

Anticuerpo: El término anticuerpo en sus diversas formas gramaticales se usa en el presente documento para referirse a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de combinación de anticuerpos o parátipe. Moléculas de anticuerpo a modo de ejemplo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y porciones de una molécula de inmunoglobulina, que incluyen aquellas porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

Sitio de combinación de anticuerpos: Un sitio de combinación de anticuerpos es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo que comprende regiones variables e hipervariables de cadena pesada y ligera que se unen específicamente a (inmunorreaccionan con) un antígeno. El término inmunorreaccionan en sus diversas formas significa la unión específica entre una molécula que contiene determinante antigénico y una molécula que contiene un sitio de combinación de anticuerpos tal como una molécula de anticuerpo completo o una porción de la misma.

Polipéptido de fusión: Un polipéptido que comprende al menos dos polipéptidos y una secuencia de enlace para enlazar operativamente los dos polipéptidos en un polipéptido continuo. Los dos polipéptidos enlazados en un polipéptido de fusión normalmente se derivan de dos fuentes independientes, y por tanto un polipéptido de fusión comprende dos polipéptidos enlazados no normalmente encontrados enlazados en la naturaleza.

Cistrón: Secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN que codifica una secuencia de residuos de aminoácido y que incluye elementos de control de la expresión de ADN en la dirección 5' y en la dirección 3'.

Fago filamentoso

La presente divulgación contempla un fago filamentoso que comprende una matriz de proteínas que encapsula un genoma que codifica una proteína de fusión (proteína). La proteína de fusión comprende una porción de polipéptido exógeno fusionada con el extremo amino de una proteína pVII o pIX de fago filamentoso.

Por "exógeno" se indica que el polipéptido fusionado con la proteína de fago no está normalmente asociado a la proteína pVII o pIX de fago en variedades no mutantes de fago filamentoso, sino que son extraños para la proteína de fago normal.

Un polipéptido exógeno típico es cualquier polipéptido de interés, que incluye un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), polipéptidos naturales o sintéticos, un anticuerpo monocatenario (scFv), y similares.

En una realización preferida, un fago filamentoso encapsula un genoma que codifica una primera y segunda proteína de fusión, en la que la primera proteína de fusión comprende un primer polipéptido exógeno fusionado con pVII y la segunda proteína de fusión comprende un segundo polipéptido exógeno fusionado con pIX.

El fago filamentoso contendrá adicionalmente la(s) proteína(s) de fusión presentada(s) sobre la superficie de la

partícula de fago, como se describe en los ejemplos. Así, si hay primera y segunda proteínas de fusión, el fago puede mostrar estas proteínas en un modo de función de forma que el primer y segundo polipéptidos exógenos puedan interactuar como un heterodímero para formar un complejo de proteína bicatenaria funcional sobre la superficie del fago.

5 Si una proteína heterodimérica expresada tiene la capacidad de unirse al ligando se denomina alternativamente en el presente documento un receptor heterodimérico de unión al ligando.

10 El receptor heterodimérico en una realización preferida es un complejo de unión al epítipo. Es decir, un complejo de primer y segunda polipéptidos capaces de unirse a un epítipo. Preferentemente, el primer y segundo polipéptidos son polipéptidos de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo. En particular, una realización preferida utiliza V_H y V_L para formar un complejo de Fv. Otros complejos de proteína heterodimérica incluyen un Fv catalítico, un receptor, una proteína de unión a ácido nucleico, y enzima y proteínas heterodimericas similares.

15 En una proteína de fusión presente sobre un fago desvelado en el presente documento, la "fusión" entre el polipéptido exógeno y la proteína pVII o pIX de fago filamentososo puede comprender un enlace amida típico, o puede comprender un polipéptido conector (es decir, un "conector") como se describe en los ejemplos. Puede usarse cualquiera de una variedad de conectores que normalmente son un estiramiento de aproximadamente 5 a 50 aminoácidos de longitud. Conectores particularmente preferidos proporcionan un alto grado de movilidad a la
20 proteína de fusión en el punto del conector.

Diseño de bibliotecas: bibliotecas sintéticas previas han incorporado algunos de los siguientes, pero ninguna ha incluido todo de una manera exhaustiva.

25 Diversidad de la familia de la región V de la línea germinal. El repertorio variable humano para cadenas pesadas y ligeras consiste en familias de secuencias relacionadas que se definen por homología de secuencias y longitud. En cualquiera de tal familia, miembros individuales se diferencian principalmente en secuencia y longitud de las regiones determinantes de la complementariedad. Estas diferencias conducen a patrones de variación estructurales conocidos (estructura canónica), además de a variación de aminoácidos de la línea germinal en posiciones
30 estructuralmente similares que tienen predisposición para interactuar con el antígeno. La elección de solo un único molde del gen V_H y V_L para una biblioteca disminuye el alcance de la diversidad de la línea germinal natural que puede ser capturado (citar bibliotecas de Genentech). La elección de todos los genes V_H y V_L paraliza la eficiencia de generación de bibliotecas. Las bibliotecas de la invención capturan eficazmente la diversidad de la línea germinal (1) identificando un pequeño número de V_H , V_K y V_λ de la línea germinal que representan los grupos de
35 estructura canónica dominantes en anticuerpos humanos reorganizados (IMGT, Kabat, NCBI) y (2) incorporar la diversidad de la línea germinal humana natural de miembros de la familia relacionado en las CDR 1 y 2 codificadas por el gen V_H , o también en CDR 1-3 de las regiones V_K y V_λ , por mutagénesis de oligonucleótidos combinatoria.

40 Diversidad de V_H -CDR3. Se crea V_H -CDR3 por la unión de los segmentos V, D y J y va acompañado por tanto la adición de extremos como por acontecimientos exonucleolíticos. Hay aproximadamente 25 segmentos de la región D de la línea germinal y este número se acopló con los acontecimientos de unión al complejo y la mutación somática crea la región más diversa de anticuerpos. Estos acontecimientos se producen en un conjunto definido de secuencias de la línea germinal y así no son aleatorios; pero son difíciles de predecir. Sin embargo, la base de datos de secuencias reorganizadas de anticuerpo humano ha alcanzado ahora tamaño suficiente (aproximadamente 5000 regiones V_H) para aplicar evaluación estadística de tanto la longitud como la distribución de aminoácidos en cada
45 posición en V_H -CDR3. Las bibliotecas de la presente invención resumen esta diversidad humana natural utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados para ensamblar esta región.

50 Posición y naturaleza de la diversidad somática. La diversidad somática es un distintivo de cómo los anticuerpos humanos maduran a entidades de unión selectivas de alta afinidad. Esta generación y acumulación de mutaciones somáticas no es aleatoria. El sitio y tipo de mutación de nucleótidos está influido por la secuencia de ADN y el mecanismo, pero solo las mutaciones que proporcionan la unión y ventaja funcional están seleccionadas y se guardan, frecuentemente junto con sustituciones neutras. Aunque no son susceptibles a predicción del mecanismo,
55 la base de datos de secuencias de anticuerpo humano reorganizadas y el análisis de la función estructural identifica posiciones y sustituciones de amino lo más frecuentemente asociadas al reconocimiento de antígeno en regiones CDR, incluyendo la diferenciación entre proteína, péptido y antígenos de molécula pequeña. Las bibliotecas de la presente invención resumen esta diversidad humana natural utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados para incorporar sustituciones en CDR1 y 2 de V_H , o también CDR 1-3 de las regiones V_K y V_λ .

60 Uso de genes de la línea germinal. El repertorio de la línea germinal humana consiste en aproximadamente 30 genes funcionales de V_κ , 56 de V_λ y 40 de la cadena pesada de V. Sin embargo, su representación en anticuerpos reorganizados está fuertemente influida y esto se refleja en la frecuencia de apareamiento de diferentes regiones V de la cadena ligera-pesada (de Wildt et al., J Mol Bio 285: 895-901 (1999)). Las bibliotecas de la
65 invención capturan esta influencia seleccionando una región V de la línea germinal dominante para cada una de las clases de diversidad indicadas en (a) anteriormente.

Expresión, propiedades bioquímicas y biofísicas. Anticuerpos humanos preferidos tienen actividades biológicas y de unión deseadas, pero también se producen eficazmente a partir de una variedad de huéspedes, son estables y tienen buenas propiedades de disolución. El uso de genes de la línea germinal de alta frecuencia (1d) también indica buena expresión en sistemas de mamífero. Además, los anticuerpos recuperados de bibliotecas por métodos de selección de presentación en fago bacteriano o cribado deben expresarse bien en el huésped bacteriano. Las bibliotecas de la invención se basan en moldes derivados de la línea germinal humana que se expresan bien y se purifican a partir de huéspedes de mamífero recombinantes estándar (por ejemplo, células HEK 293 y CHO), además de huéspedes bacterianos, y tienen alta estabilidad y buenas propiedades de disolución.

Maduración. El gran número de posiciones en las secuencias de la región V que pueden influir en el reconocimiento de antígeno, acoplado con la posible variación de hasta 20 aminoácidos diferentes en cada posición, excluyen la utilidad de incluir todas las variaciones en una única biblioteca. Los anticuerpos humanos logran alta afinidad y especificidad por el proceso progresivo de mutación somática. Las bibliotecas de la invención se diseñan y se ordenan para permitir la selección paralela y la variación dirigida, mientras que mantienen la integridad de secuencia de cada cadena de anticuerpo de forma que reflejen anticuerpos humanos.

Diseño alternativo. El diseño anterior resume los anticuerpos humanos naturales. La naturaleza modular del sistema es susceptible a la incorporación de cualquier colección de aminoácidos en cualquier colección de posiciones.

Tecnologías de ensamblaje de bibliotecas. Bibliotecas de anticuerpo *de novo* preferidas son de alta diversidad (> 10¹⁰), susceptibles a alteración, y fáciles de ensamblar y tener un bajo fondo de secuencias no deseadas. Estas secuencias de fondo incluyen molde parental y diversidad dirigida baja. El acoplamiento de los siguientes métodos acelera el ensamblaje de bibliotecas y conduce a fondo bajo. (a) Mutagénesis monocatenaria basada en Kunkle; (b) Bucle palindrómico con sitio de restricción; (c) Mega-cebador

Presentación en fago de Fab pIX. Todas las bibliotecas de anticuerpos humanos *de novo* filamentosas anteriores utilizan proteínas de la envuelta del fago pIII o pVIII para la presentación, con la excepción de una biblioteca de Fv individual (referencia de Scripps). La combinación de pIX con los moldes de Fab seleccionados es un sistema de selección más eficaz para recuperar anticuerpos que retienen sus propiedades seleccionadas tras la conversión en mAb y otras moléculas relacionadas.

Presentación de Fab. A diferencia de scFv, los Fab son segmentos naturales de anticuerpos humanos y resumen mejor su actividad cuando se manipulan por ingeniería en anticuerpos completos. La eficaz presentación filamentosas de Fab puede requerir propiedades más allá de la buena expresión en el huésped bacteriano. Los moldes de la región V de la presente invención se eligieron para la eficaz presentación por pIX sobre fago filamentosos.

Presentación en fagémido. La molécula de Fab es grande con respecto a las proteínas de la envoltura pIX de fago y así pueden interferir con el ensamblaje de partículas de fago recombinantes si se enlazan con todas las proteína pIX producidas en la célula bacteriana. Un enfoque para evitar esta interferencia es usar un sistema de fagémido de pIX, tal descrito por (referencia Scripps), por el cual tanto las proteínas pIX no mutantes como enlazadas a Fab pueden incorporarse en la partícula de fago recombinante. En una aplicación preferida, las bibliotecas de la presente invención se presentan por pIX en un sistema de fagémido.

Proteína de la envoltura del fago pIX para la presentación. Al igual que pIII, pIX está presente a bajo número de copias sobre el fago y es susceptible a selección por afinidad de Fab presentados. Sin embargo, la proteína pIII participa críticamente en el proceso de infección y las proteínas presentadas sobre esta proteína pueden interferir con la eficiencia de infección. Además, cualquiera de Fd de la cadena pesada o segmentos de la cadena ligera pueden fusionarse con pIX para la presentación. Se predice que las bibliotecas de la presente invención presentadas sobre la proteína pIX se replican eficazmente y se presentan para la selección y/o cribado.

Expresión de Fab-pIX. Un enfoque para cribar Fab recuperados de las bibliotecas de fagos es eliminar la proteína de envoltura del fago que está enlazada a la molécula de Fab para la presentación. El pequeño tamaño de la proteína pIX proporciona la opción de la producción del cribado de Fab directamente sin esta etapa.

DISEÑO DE ANDAMIAJES DE BIBLIOTECA. El andamiaje de biblioteca está hecho de un conjunto de genes VH y VL de la línea germinal humana. La bibliografía del análisis, además de la información de anticuerpos patentados, condujo a la identificación de genes de la línea germinal que representaban a las familias de genes de IgG humana, uso en el repertorio de IgG y las estructuras canónicas de anticuerpo humano. También se consideraron en el análisis el buen emparejamiento entre Vh y VL y la probabilidad de fabricación satisfactoria de anticuerpo derivado de los genes de la línea germinal. El diseño de la naturaleza humana y el buen emparejamiento de VH y VL del andamiaje es superior al diseño de uso de un consenso de gen de la línea germinal humana como andamiajes de biblioteca (MorfoSys HuCAL GOLD) y está representando más exhaustivamente el repertorio humano que los diseños basados en un único gen de la línea germinal como andamiaje de biblioteca (Dyax VH y Affytech).

CAPACIDAD DE EXPRESIÓN Y DE PRESENTACIÓN DE LOS ANDAMIAJES DE BIBLIOTECA. La buena

capacidad de expresión y de presentación de Fab del andamiaje de biblioteca se refieren directamente a la calidad de la biblioteca para desarrollarse con respecto a los genes del andamiaje. La capacidad de expresión y de presentación de Fab del andamiaje de biblioteca se examinó antes de la construcción de la biblioteca. Algunos Fab de andamiaje que se expresaron, pero fueron incapaces o se presentaron malamente, se excluyeron de la construcción de biblioteca. Los andamiajes de biblioteca bien expresados y presentados garantizan que una alta proporción de los Fab en la biblioteca son funcionales, más superiores que las bibliotecas derivadas de la clonación combinatoria de genes VH y VL genéticamente amplificados de fuentes naturales (CAT).

DISEÑO DE LA DIVERSIDAD EN H-CDR3. La biblioteca VH-CDR3 se diversificó en tanto las longitudes como las secuencias. Se diseñaron aproximadamente 10^9 a 10^{18} posibilidades de secuencia total dependiendo de las longitudes de las CDR en VH-CDR3 que reflejan la importancia de VH-CDR3 en la unión al antígeno. A diferencia del uso de todos los codones de aminoácido para la diversificación de aminoácidos (por ejemplo, NNK por Genentech 2004) y el uso de exhaustivos métodos de clonación para manipular por ingeniería secuencias de VH-CDR3 de fuentes naturales (CAT, Dyax, Affytech), los presentes inventores crearon VH-CDR3 usando oligonucleótidos diseñados que codifican codones de aminoácido que imitan el patrón de uso de aminoácidos en el repertorio de IgG humana. VH-CDR3 diseñada contiene menos aminoácidos no deseados (por ejemplo, codón de terminación) y menos no favorecidos (por ejemplo, cisteína), pero más proporción de secuencias de CDR3 tipo IgG. Los oligonucleótidos degenerados pueden usarse fácilmente para generar una biblioteca de genes de gran tamaño en una reacción de mutagénesis.

DISEÑO DE DIVERSIDAD EN H-CDR1 Y H-CDR2. Se diseñó la diversidad de aminoácidos en VH-CDR1 y VH-CDR2 para imitar las variaciones dentro de las secuencias de la línea germinal. La diversidad de la secuencia total combinada en VH-CDR1 y VH-CDR2 oscila entre 10^2 - 10^5 . Combinando con las grandes variaciones de secuencias de VH-CDR3, esto aumenta las variaciones de secuencia total en la biblioteca y de ahí que aumente la probabilidad de identificar anticuerpos de unión al antígeno. El diseño único de la pequeña diversidad similar a la línea germinal favorece el descubrimiento de la línea germinal o secuencias de anticuerpos tipo natural y minimiza el potencial de aislar combinaciones de CDR no naturales debido al efecto combinatorio sobre la creación de bibliotecas. Este diseño es diferente de muchas de las otras bibliotecas de anticuerpos sintéticas o semi-sintéticas que contuvieron mayores variaciones de secuencia en las tres CDR de VH (Genentech, Dyax y MorfoSys) y también solo una pequeña porción de la gran diversidad de secuencias teóricas fue capaz de capturarse en la biblioteca.

DISEÑO DE DIVERSIDAD EN LC. Las cadenas ligeras de la biblioteca se diseñaron estratégicamente para variarse en la biblioteca *de novo* y las diversidades de Lc se introdujeron en las CDR después de seleccionarse Fab mediante inmunopurificación de fagos. Como la diversidad de Lc en los Fab de unión al antígeno se diseña para mejora de la afinidad de unión, se eligieron para diversificación las posiciones de CDR que se encontraron frecuentemente en contacto con el antígeno en el complejo antígeno-anticuerpo de estructura conocida. La estrategia de diversificación de CDR escalonada gestiona eficazmente la gran diversidad de secuencias de CDR teórica y genera anticuerpos de alta afinidad de unión, más adecuados para la caracterización biológica.

MÉTODOS PARA LA GENERACIÓN DE BIBLIOTECAS. Se usa un método de mutagénesis de Kunkel modificado, que genera eficazmente billones de colonias de *E. coli* que aloja cada una una secuencia de Fab diferente, para la generación de las grandes bibliotecas de Fab. Aunque es eficaz, el porcentaje de ADN parental no mutagenizado aumenta cuando se adapta en la generación de una biblioteca de secuencias altamente compleja. Además, la limitación técnica de la síntesis de oligonucleótidos largos redujo la eficacia del método para hacer bibliotecas que contuvieran diversidades de secuencia en regiones distanciadas. Para vencer las limitaciones, se usaron técnicas adicionales de generación de oligonucleótido >350 bases (mega-cebador) y de creación de una secuencia de tallo-bucle que contiene un sitio de reconocimiento de enzima de restricción en el molde de mutagénesis en combinación del método de mutagénesis de Kunkel estándar. Comparando con otras tecnologías de bibliotecas, tales como la clonación por restricción (MorfoSys, CAT y Dyax), recombinación en fago (Gigapack, Invitrogen) y recombinación específica de secuencia (CAT), usadas por otros para la generación de bibliotecas, el método basado en Kunkel mejorado es significativamente más eficaz en la generación de bibliotecas diversas de $>10^9$ secuencias y es más versátil para introducir diversidad de secuencia en cualquier localización sobre el ADN dirigido.

MADURACIÓN POR AFINIDAD EN LÍNEA. Se diseña un proceso de maduración por afinidad integrado, o maduración por afinidad en línea, para mejorar la afinidad de unión de todos los Fab seleccionados de la biblioteca. Como la biblioteca se diseña estratégicamente para dejar que VL de Fab varíe, sitios de unión al antígeno adicionales deben crearse fácilmente en VL mediante la diversificación de secuencias de CDR. El mejorar la afinidad de unión de todos los Fab después de la inmunopurificación aumenta el éxito de identificar el anticuerpo terapéutico conductor. El uso del método de Kunkel para la generación de bibliotecas garantiza la eficaz ejecución de la estrategia de diversificación de la secuencia de VL en un proceso simple y continuo. La estrategia de diseño y las ventajas técnicas de uso del método de mutagénesis de Kunkel mejorado hicieron el enfoque superior a otras estrategias de maduración reunidas informadas por CAT y MorfoSys, en las que se emplean tediosos métodos de generación de bibliotecas que reducen la eficiencia y beneficio del fin.

INMUNOPURIFICACIÓN DE BIBLIOTECAS PARALELA. Se desarrolla un proceso de inmunopurificación paralela usando un equipo semi-automatizado del estado de la técnica para procesar las sub-bibliotecas individualmente

preparadas. La inmunopurificación paralela maximiza el potencial de descubrimiento de un diverso conjunto de anticuerpos, soportando las bibliotecas únicamente diseñadas y generadas. El uso eficaz de inmunopurificación paralela en la maduración por afinidad en línea también permite que se mejoren simultáneamente anticuerpos que tienen un amplio intervalo de afinidad. El desarrollo de una inmunopurificación basada en máquina también permite examinar sistemáticamente diferentes condiciones de inmunopurificación para el descubrimiento de anticuerpo de propiedades deseadas.

CLASIFICACIÓN DE AFINIDAD. Los ensayos de unión basados en afinidad se aplican a los anticuerpos de unión específicos de antígeno grandes, diversos y de alta afinidad para seleccionar los mejores anticuerpos de unión para la caracterización adicional. Métodos bioquímicos estándar como ELSIA, además de equipos de medición de afinidad, por ejemplo, BIAcore, Octet y BIND, que son adecuados para procesar un gran número de muestras, se usan solos o en combinación para este fin.

Aunque la invención se ha descrito en términos generales, las realizaciones de la invención se desvelarán adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLO 1: Ejemplo 1. Diseño de andamiajes de biblioteca

Se diseñaron genes de la línea germinal humana como esqueletos de biblioteca. Se identificaron inicialmente un panel de genes VH y VL de la línea germinal basándose en las propiedades de 1) uso en IgG naturalmente expresada, 2) topología de estructura (conformación de cadena principal) que favorece el reconocimiento de antígeno de proteína y de péptido, 3) propiedades bioquímicas y biofísicas de anticuerpos derivados de genes de la línea germinal y 4) probabilidad de formación de heterodímero de VH y VL como anticuerpo. Se seleccionan adicionalmente cuatro (4) genes de la línea germinal VH y cuatro (4) VL del panel que son los que mejor representan las propiedades enumeradas anteriormente. Se usó una única secuencia de H-CDR3 artificial de 10 aminoácidos derivada de un anticuerpo conocido con modificaciones de secuencia y el segmento JH4 humano en combinación con cada VH de la línea germinal para completar las secuencias de VH completas. Para VL, se usó el segmento Jk1 para combinar con cada uno de VL de la línea germinal seleccionada. Estos 4 genes basados en la línea germinal VH y 4 VL se sintetizan químicamente. Combinando con una secuencia de CH y de CL definida, constituyeron dieciséis (16) Fab humanos recombinantes. Para VL- λ , el segmento J λ 2 se combinó con cada uno de los andamiajes de la línea germinal VL- λ seleccionada. Se combinaron tres genes de la línea germinal VH (169, 323 y 551) con los andamiajes de la línea germinal VL- λ y se clonaron en vectores que contenían las secuencias CH1 y CA para dar 12 Fab humanos recombinantes. Estos 28 Fab se usaron como andamiaje de biblioteca o molde para presentar la diversidad de secuencia en regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada y/o Lc. La Figura 1 muestra las secuencias de las cuatro VH y cuatro VL diseñadas.

Ejemplo 2. Expresión y presentación de los andamiajes de biblioteca

Se clonan los ADN de Fab sintético en el vector pCNTO-lacI-pIX (Fig --). El gen VH se clonó mediante los sitios NcoI y ApaI. El gen VL, que incluye la secuencia señal ompA y secuencias en la dirección 5', se clonó mediante sitios NheI y BsiWI (Figura 2). Se examinaron la expresión y presentación de los Fab de andamiaje en un análisis de transferencia Western y en un ELISA en fago, respectivamente.

Para examinar la presentación, el fago se preparó y se probó en un ELISA en fago. Brevemente, la construcción pCNTO-Fab-pIX-lacI se transformó en las células MC1061 F' y se cultivaron durante la noche en 2x medio YT / Carb (100 ug/ml) / TET (15 ug/ml) / 1 % de glucosa a 37 °C con agitación. A la mañana siguiente se usaron 50 ul de este crecimiento para sembrar 5 ml de 2xYT / Carb (100 ug/ml) y cultivar a una DO600 de 0,6-0,8. El cultivo se infectó entonces con (nº de fago) de fago cooperador durante 40 minutos a 37 °C sin agitación. Las células infectadas se centrifugaron, se resuspendieron en 5 ml de 2x medio YT / Carb (100 ug/ml) / TET (15 ug/ml) / Kan (35 ug/ml) / IPTG 0,5 mM, y se cultivaron durante la noche a 30 °C con agitación. A la mañana siguiente, las células se centrifugaron y se recogió el sobrenadante de fago y se usó para ELISA en fago. Se añadieron 50 ul de sobrenadante de fago (puro), además de 3 diluciones sucesivas de 1:5, a pocillos de ELISA recubiertos con anticuerpos anti-Fd (específico de Hc) o anti-kappa (específico de Lc). Después de la incubación, el fago sin unir se eliminó lavando y el fago de unión se detectó por anticuerpo anti-M13. Todas las combinaciones de andamiaje, excepto H3-53/L-B3 y H3-53/L-A27, mostraron buena unión a anticuerpos anti-Fd y anti-kappa, que indica presentación suficiente de tanto Hc como Lc sobre la superficie del fago (Figura 3).

Para examinar la expresión de Fab, el gen pIX se escinde primero del vector pCNTO-Fab-lacI-pIX por digestiones con enzimas de restricción en SpeI y NheI, seguido de auto-ligación del ADN de vector digerido. Esto crea la construcción de expresión de Fab, pCNTO-Fab-lacI (Figura 2). Células M1061F' que alojan el fagémido pCNTO-Fab-lacI se cultivaron durante la noche en 2x medio YT/1 % de glucosa/Amp (100 ug/ml) a 37 °C con agitación. Se usó una alícuota de 5 ml del medio durante la noche como control sin inducir. Se inocularon 0,1 ml del cultivo durante la noche en 10 ml de 2x medio de cultivo YT/0,1 % de glucosa/Amp (100 ug/ml). El cultivo se cultivó a 37 °C con agitación a DO_{600nm} 0,8 - 1,0. Se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión de Fab. El cultivo continuó creciendo durante 16-20 horas adicionales a 30 °C con agitación. Se centrifugaron los cultivos

inducidos y cada sedimento de células se lisó añadiendo 0,4 ml de reactivo BPER II (Pierce). Se recogió el sobrenadante del lisado celular gastado y se analizó por transferencia Western para la expresión de Fab. Todos los Fab se expresaron bien a (> 2 ug/ml), con la excepción de aquellos que contenían LC de B3 que se expresaron a aproximadamente un nivel 10 veces menor. También se examinó la expresión de Fab usando un ELISA. Se añadieron 50 ul de lisado celular gastado, además de 6 diluciones sucesivas de 1:5 a pocillos de ELISA recubiertos con anti-Fd (específico de Hc). Se detectó Fab con tanto anticuerpos anti-kappa como anti-lambda conjugados con HRP. Las cantidades de Fab se cuantificaron con respecto a una curva estándar de control de Fab (Figura 3C).

Ejemplo 3. Diseño de diversidad en H-CDR3

Los presentes inventores diseñaron grandes diversidades de secuencia en H-CDR3 que imitan el repertorio inmunitario natural. Se recogieron un total de aproximadamente 5250 secuencias de anticuerpo humano no redundantes y completas (incluyendo la región V, CDR3 y región estructural 4) de diversas fuentes públicas. El conjunto de datos contuvo las 7 familias de Vh. Se escribieron programas patentados para extraer segmento de CDR3 basado en la definición de Kabat. Las secuencias de anticuerpos se analizaron adicionalmente basándose en la longitud de CDR3. Las longitudes de H-CDR3 oscilaron de 1 a 27 aminoácidos, y se mostraron como una distribución normal. El mayor número de anticuerpos contuvo 12 aa en H-CDR3. Se alinearon las secuencias de anticuerpos con la misma longitud y se agruparon. Se restaron las secuencias derivadas de JH6 de los grupos de longitud para minimizar las secuencias de JH6 que contenían tirosina asociadas, múltiples y consecutivas. Se escribieron programas para calcular la distribución de aminoácidos para cada longitud. Se clasificaron los residuos en cada posición del grupo de secuencia de longitud de H-CDR3 basándose en su frecuencia. Se usó un Weblogo internamente instalado (9-Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE WebLogo: A sequence logo generator, Genome Research, 14:1188-1190, (2004)) para representar una distribución para cada longitud de HCDR3. Los presentes inventores decidieron trabajar en las secuencias que contenían 7-14 aminoácidos de H-CDR3, que aproximadamente cubrieron aproximadamente el 65 % para el repertorio de anticuerpos humanos total.

Analizando la distribución de aminoácidos, los presentes inventores identificaron un patrón que describe la distribución de aminoácidos de H-CDR3 que contiene 7-14 aminoácidos. La Figura 4 mostró el patrón de H-CDR3. A pesar de los aminoácidos altamente diversos observados en H-CDR3, los aminoácidos glicina y alanina se usan frecuentemente en todas las posiciones. Además, el ácido aspártico (D) se usa frecuentemente en la posición 95 y la tirosina (Y) está frecuentemente codificada en las posiciones más próximas al segmento J en H-CDR3. Aunque la secuencia en la posición 99-101 varía, los aminoácidos fenilalanina (F), ácido aspártico (D) y tirosina (Y) se usan predominantemente en IgG en estas posiciones. Como estas posiciones frecuentemente sirven de soporte estructural para H-CDR3 y son menos accesibles al antígeno y/o a la superficie de IgG, los presentes inventores fijaron los aminoácidos F/L a 99, D a 100 e Y a 101, respectivamente.

Para imitar la distribución de aminoácidos altamente diversa en H-CDR3, los presentes inventores diseñaron oligonucleótido de bases mixtas para codificar la secuencia de H-CDR3 y los usaron en la construcción de bibliotecas. Se usa un procedimiento descrito por Wang & Saven (10-Wang W, Saven JG. Designing gene libraries from protein profiles for combinatorial protein experiments. Nucleic Acids Res. Vol 30, No 21, e120. 2002) para determinar los valores iniciales de las relaciones de mezcla de nucleótidos en cada posición de un triplete de codón en múltiples ensayos aleatorios de manera que los aminoácidos codificantes derivados de los tripletes de codón imitaran la distribución de aminoácidos dirigida. Con el fin de minimizar los codones de terminación (<3 %) y reducir el codón de cisteína por los oligonucleótidos de bases mixtas, los presentes inventores refinaron adicionalmente los valores de las relaciones de mezcla de nucleótidos en cada posición de un triplete de codón usando un script en Solver de MicroSoft Excel™ contra la misma función diana que el procedimiento de Wang & Saven. La composición de nucleótidos usada para las posiciones D y N se muestran en la Figura 5. Para las longitudes de H-CDR3 más cortas, por ejemplo, 7-8 aminoácidos, en su lugar se usa el codón NNS.

Los presentes inventores generaron entonces oligonucleótidos de bases mixtas basados en el diseño de codones. Además de la posición D y N, las posiciones ricas en tirosina (~ 18 % de Y) comparten de otro modo la distribución de aa similar como en las posiciones N. Se prepararon oligonucleótidos separados con codón de diseño N en la posición N más codón fijo TAT en cada posición de tirosina y se usaron para mezcla con los oligonucleótidos de codón de diseño N para bibliotecas que llevan longitudes de CDR de 11 a 14 aminoácidos. La relación usada para mezclar oligonucleótido de codón N y oligonucleótidos de codón N más TAT para una posición Y particular es aproximadamente 7:1. Como el codón N de diseño da aproximadamente el 4,7 % para tirosina, esta mezcla produce un 13 % de tirosina adicional a partir del codón TAT fijo en la posición Y.

Se usaron los oligonucleótidos para construir la biblioteca de Fab *de novo* usando los métodos descritos en el Ejemplo 6. Se obtuvieron secuencias de ADN de aproximadamente 100 colonias de cada sub-biblioteca y se analizaron. Los clones que se mutaron del codón de terminación TAA en H-CDR3 se consideraron clones positivos. Se usaron las secuencias de H-CDR3 traducidas para determinar las distribuciones de aminoácidos en las posiciones D, N y Y individuales o combinadas. El resultado mostró que la distribución de aminoácidos observada en estas posiciones imitó estrechamente la distribución encontrada en la base de datos y en el diseño (Figura 6). Por tanto, el oligonucleótido de bases mixtas diseñado mostró mejor imitación de la distribución de aminoácidos en estas posiciones para el diseño y base de datos que por los oligonucleótidos degenerados NNS (Figura 6).

Ejemplo 4. Diseño de la diversidad en H-CDR1 y H-CDR2.

Los presentes inventores diseñan las diversidades en H-CDR1 y H-CDR2 para imitar el repertorio de genes de la línea germinal. Las posiciones de H-CDR1 y CDR2 que son dirigidas para diversificación se determinan por 1) diversidad en genes de la línea germinal, (11-Vbase) y 2) frecuencia encontrada en la puesta en contacto con antígeno en los complejos anticuerpo-antígeno de estructura conocida determinada por el análisis de exposición a disolvente y por bibliografía (12-Almagro 2004). La diversidad de aminoácidos en las posiciones se determinan por 1) uso en la línea germinal (11), 2) aminoácidos que se usan lo más frecuentemente en las IgG derivadas de los genes de la línea germinal (base de datos patentada), 3) aminoácidos predichos que se derivan como resultado de mutaciones somáticas y 4) propiedades bioquímicas y biofísicas de aminoácidos que contribuyen al reconocimiento del antígeno. La diversidad de secuencias combinadas en H-CDR1 y CDR2 oscila de 10^2 a 10^5 . Se usó la frecuencia de uso como un filtro para limitar los aminoácidos que frecuentemente no se usan en IgG. Esto minimiza la secuencia no natural creada por mutaciones combinatorias. La Tabla 1 mostró el análisis de secuencias y los diseños de diversidad en H-CDR1 y CDR2.

Se diseñan y sintetizan los oligonucleótidos degenerados que mejor cubrieron el diseño de H-CDR1 y H-CDR2 (Tabla 1). Los oligonucleótidos se usan como cebadores en una reacción de mutagénesis dependiente de ADNmc de Kunkle individual. La degeneración diseñada en las posiciones de H-CDR1 y CDR2 definidas se introduce así en H-CDR1 y H-CDR2 como era de esperar. El análisis de secuencias que eligió aleatoriamente clones tras la reacción de mutagénesis de Kunkel mostró que del 31 % al 55,7 % de los clones secuenciados tuvieron mutaciones en regiones H-CDR1 y/o H-CDR2 (Tabla 2). Se encontró que el porcentaje de clones con tanto mutaciones de H-CDR1 como de H-CDR2 era igual o superior al de los clones que tenían mutaciones en solo una región CDR.

Ejemplo 5. Diseño de la diversidad en Lc

Se consideran los siguientes parámetros en el diseño de la diversidad en CDR de cadena ligera. Primero, los presentes inventores definieron que la diversidad en Lc combinada no debe superar 10^8 , ya que las bibliotecas de Lc se usan en la maduración por afinidad y así se combinan con un conjunto de aproximadamente 10^2 clones de Hc únicos derivados de la selección en fago durante la primera etapa de inmunopurificación de las bibliotecas. Por tanto, la complejidad de Hc y Lc combinada es aproximadamente $<10^{10}$, que puede ser capturada eficazmente en una biblioteca generada por una única reacción de mutagénesis de Kunkel. Segundo, los presentes inventores dirigieron las posiciones de diversificación frecuentemente encontradas en contacto con los antígenos en complejos de antígeno-anticuerpo de estructura conocida o los llamados residuos determinantes de la especificidad (SDR; 12); es decir, las posiciones 30-32, 50 y 91-94, para L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3, respectivamente. Tercero, la posición 96 también está diversificada debido a que está codificada en los genes de unión (J) y los cinco genes J humanos se diferencian entonces en esa posición. Cuarto, igual que el concepto usado en el diseño de H-CDR1 y H-CDR2, los presentes inventores minimizaron la diversidad de secuencias que probablemente no se producen en la naturaleza eligiendo los aminoácidos codificados por la línea germinal que también se encuentran frecuentemente en la IgG reordenada en las posiciones que van a diversificarse. Finalmente, los presentes inventores evalúan las propiedades bioquímicas y biofísicas de los aminoácidos adecuados para la unión al antígeno en las posiciones dadas (13-Tomlinson et al., 1995) y complementaron la diversidad de los genes de la línea germinal V con aquellos aminoácidos para alcanzar los criterios 10^8 . Las diversidades en Lc-CDR individualmente diseñadas se muestran en la Tabla 5.

Se usa un método de PCR de solapamiento para generar el Lc que contiene las diversidades diseñadas en las posiciones específicas. Pueden colocarse codones degenerados en las posiciones dentro de oligonucleótidos de amplificación que engloban CDR individuales. Estos codones degenerados codifican los aminoácidos diseñados en las posiciones de CDR. Alternativamente, pueden sintetizarse varios oligonucleótidos que codifican los codones deseados específicos en cada posición. Estos oligonucleótidos pueden entonces mezclarse para generar una biblioteca que se usará para amplificar el ADN de biblioteca usado en la PCR de solapamiento. Los oligonucleótidos diseñados se usan para amplificar fragmentos de un Lc, generar un conjunto de variantes de secuencia en las posiciones de SDR deseadas. Fragmentos de Lc que codifican la región estructural nº 1, región mutada en CDR1-2 y la región estructural mutada en nº 3-CDR3 se sintetizaron por PCR con oligonucleótidos degenerados. Los fragmentos de biblioteca de VL antes mencionados se combinaron entonces en una PCR de solapamiento con cebadores de amplificación flanqueantes. Esta reacción produce una biblioteca de VL de longitud completa con variaciones de secuencia en las tres CDR en las posiciones deseadas.

Alternativamente, puede usarse el método de síntesis de ADN, "GeneWriter" para sintetizar las bibliotecas de Lc individuales según los diseños. Las secuencias de nucleótidos pueden retro-traducirse a partir de las secuencias de aminoácidos diseñadas usando codón preferido de *E. coli*. Los oligonucleótidos, cada uno cubre una parte de la secuencia diseñada y contiene las variaciones de nucleótido diseñadas, pueden sintetizarse y ensamblarse como un gen usando una tecnología descrita en cualquier parte (14-Patente de EE.UU. 0165946 A1). Brevemente, las secuencias de oligonucleótidos y variaciones de secuencia diseñadas pueden procesarse mediante el software "MultiWriter" para la generación de oligonucleótidos. Puede generarse un diverso número de oligonucleótidos de biblioteca para la hebra codificante para representar todas las combinaciones de variaciones de secuencia deseadas

basadas. La hebra no codificante puede diseñarse y sintetizarse usando el mismo software. Los genes VL pueden ensamblarse mediante una serie de hibridación-ligación de los oligómeros sintéticos más pequeños como se describe como "Gene assembler" en la patente (14). Los ADN de VL de longitud completa se amplificaron por PCR y los productos de PCR pueden usarse bien como un cebador en el método de Kunkel o bien como una fuente para la clonación directa en los sitios diseñados en el vector pCANTO-pIX-lacI para la generación de bibliotecas. También pueden usarse síntesis de ADN alternativa y métodos de ensamblaje de genes grandes para generar los genes VL diseñados.

Ejemplo 6. Métodos para la generación de bibliotecas

Se usa un método de mutagénesis monocatenaria de Kunkel modificado para preparar la biblioteca individual basándose en cada Fab de andamiaje (15-Documento de Genentech, 16-Henry Lowman's book). Para minimizar el efecto del molde de Fab de andamiaje no mutagenizado sobre la función de biblioteca final, el codón de terminación TAA se insertó en la región H-CDR3 de los moldes. Se preparó ADN monocatenario de cada molde que contenía codón de terminación a partir de la cepa CJ236. Los oligonucleótidos codifican cada uno la diversidad en H-CDR1 y CDR2 diseñada y se usaron simultáneamente como cebadores en una reacción de polimerización de ADN usando ADN polimerasa T7 y T4 ligasa. La mezcla de reacción se usó para transformar células competentes MC1 061 F', dando normalmente $> 10^9$ colonias independientes por construcción de biblioteca. Las colonias se rasparon de las placas para inocular medios frescos, se preparó ADN de plásmido bicatenario y se usó para transformar células CJ236. Las células transformadas se infectaron con fago cooperador, y se preparó ADN monocatenario a partir de cultivo celular durante la noche y se usó como molde de reacción para introducir diversidad en H-CDR3. Se construyó individualmente la biblioteca de andamiaje/molde de Fab individual. Se construyeron las 8 longitudes diferentes de H-CDR3 en cuatro reacciones, en las que la longitud de H-CDR3 de 7 y 8, 9 y 10, 11 y 12 y 13 y 14 aa se agruparon, respectivamente. La Figura 7 muestra las arquitecturas de bibliotecas.

Aunque es eficaz, los presentes inventores encontraron que el actual método de Kunkel frecuentemente solo eliminaba ADNmc parentales no mutados al intervalo del 20-50 % cuando se construía una biblioteca de secuencias altamente compleja. El oligonucleótido corto usado en las reacciones de Kunkel escalonadas durante la generación de bibliotecas redujo adicionalmente la eficiencia del método. Para eliminar adicionalmente el ADN parental, se manipuló un palíndromo que contenía un sitio de enzima de restricción (XbaI) de 6 cortadores en las regiones de secuencias mutagénicas dirigidas, por ejemplo, VH y/o VL. Durante la hibridación del cebador con el ADNmc, el palíndromo forma una estructura de etapa bicatenaria-bucle y el cebador mutagénico engloba este palíndromo por hibridación con secuencias flanqueantes (Figura 8). La replicación de ADN avanza a partir del cebador hibridado usando ADN polimerasa T7. Se genera ADN circular cerrado por ADN ligasa T4. Este producto se digiere con la endonucleasa de restricción en su sitio (XbaI) dentro del bucle palindrómico, cortando así la hebra de ADN parental y destruyendo su potencial replicativo *in vivo*. La eliminación de la secuencia del palíndromo combinada y el método de Kunkel eliminan el ADN parental más del 95 %, una mejora significativa con respecto al actual método de Kunkel solo. Los presentes inventores también generaron mega-cebadores que cubren las tres CDR dirigidas para diversificación de secuencias por PCR de solapamiento y se usaron en la reacción de mutagénesis. Esto permite que toda la diversificación de secuencias combinatorias se lleve a cabo en una reacción, más eficaz que las reacciones escalonadas, usando oligonucleótidos cortos. Por ejemplo, los presentes inventores han generado fragmentos de bibliotecas de VL por PCR de solapamiento y/o por síntesis química usando GeneWriter™ y los usaron como mega-cebadores para la mutagénesis por hibridación. El megacebador se produce por PCR y la cadena menos se amplifica con un cebador biotinilado (Figura 9). La hebra biotinilada se captura sobre perlas magnéticas de estreptavidina (Dynal) y la hebra sin biotinilar se purifica por desnaturalización en NaOH 0,15 M. Entonces, la hebra eluida se usa entonces para la replicación de ADN mediada por mega-cebador sobre ADNmc (REStr420jw).

También pueden generarse bibliotecas con diversidad en VH y VL por métodos alternativos y fuentes. Por ejemplo, pueden amplificarse genes VH y VL a partir de tejidos de animal inmunizado y clonarse en marco con la región constante para preparar bibliotecas de Fab (17-winter). Alternativamente, las regiones CDR de animales inmunizados, por ejemplo, H-CDR3, pueden amplificarse por PCR y clonarse en la región correspondiente de la biblioteca *de novo* formando un híbrido de H-CDR3 inmunizado en una referencia de biblioteca *de novo* de H-CDR1, H-CDR2 y VL. La inmunopurificación en fago de tales bibliotecas puede aislar anticuerpos de unión de alta afinidad.

Ejemplo 7. Maduración por afinidad en línea

Los presentes inventores diseñaron la maduración por afinidad de los ligantes seleccionados de la biblioteca *de novo* como parte del proceso de inmunopurificación en fago, y llamaron el proceso "maduración en línea". El proceso empieza con un conjunto de anticuerpos de unión, con o sin caracterización detallada, seguido de la diversificación de secuencias de CDR en Lc de los ligantes, que se derivaron de uno de los cuatro Lc de la línea germinal usados como andamiajes de biblioteca. Las diversidades en CDR de Lc crearán actividades de unión adicionales que pueden seleccionarse mediante otra inmunopurificación en fago. Los procesos se describen más adelante y también se detallan más adelante (Figura 10). Primero, las regiones VH de anticuerpos conductores aisladas mediante inmunopurificación de la biblioteca *de novo* de Fab se subclonaron en vectores de bucle palindrómicos de VL. Los ADNmc de estos vectores se preparan para mutagénesis por hibridación con los megacebadores de la biblioteca de

VL o métodos adecuados descritos en el Ejemplo 6. Por ejemplo, la eliminación de la secuencia del palíndromo y el método de mutagénesis de Kunkel del mega-cebador combinados pueden usarse eficazmente para generar la biblioteca secundaria diversificada en CDR de VL para la maduración por afinidad en línea. Se elimina ADN parental por digestión con XbaI y por transformación posterior en la cepa huésped no permisiva. Este método permitió la creación altamente eficaz de una biblioteca que cubre diversidades de secuencia diseñadas. Entonces se prepararon bibliotecas de fago por infección de la biblioteca mutacional con el fago cooperador. A continuación, la biblioteca se sometió a rondas adicionales de inmunopurificación con mayor rigurosidad de selección para enriquecer en ligantes con afinidad de unión mejorada con respecto a los ligantes seleccionados inicialmente a partir de la biblioteca primaria. Éstos incluyen reducir las concentraciones de antígeno, aumentar el tiempo de lavado y frecuencia. Alternativamente, pueden incluirse competidores de unión u otros componentes del estrés de unión, por ejemplo, alterar la temperatura de unión y añadir detergentes, en el tampón de unión y/o de lavado para seleccionar ligantes con propiedades deseadas. También pueden incluirse otras condiciones bioquímicas y biofísicas adecuadas para su uso en la unión a fago y posterior infección por *E. coli* en la inmunopurificación. Después de la inmunopurificación, el ADN se recupera del fago. Los Fab se expresan y se someten a unión, además de a otras caracterizaciones bioquímicas, biofísicas y biológicas. El ADN recuperado del fago también puede clonarse directamente en vectores de IgG. En este caso, se expresará y caracterizará el mA b en lugar de Fab. Por ejemplo, los presentes inventores han generado fragmentos de bibliotecas de VL por métodos de PCR de solapamiento y los han usado como megacebadores para mutagénesis por hibridación. El mega-cebador se produce por PCR y la hebra menos se amplifica con un cebador biotinilado (véase el Ejemplo nº 6). La hebra biotinilada se captura sobre perlas magnéticas de estreptavidina (Dynal) y la hebra no biotinilada se purifica por desnaturalización en NaOH 0,15 M. La hebra eluida se usa entonces para la replicación de ADN mediada por megacebador sobre ADNmc. Las regiones VH de anticuerpos conductores aisladas mediante inmunopurificación de la biblioteca *de novo* de Fab se subclonaron en vectores de bucle de VL. Estos vectores de bucle de VH/VL seleccionados se prepararon en ADNmc para la mutagénesis por hibridación con los megacebadores de bibliotecas de VL. La eliminación de ADN parental, como se indica por la pérdida del palíndromo que contiene XbaI, se determinó del 100 % por secuencia de muestra de clones de bibliotecas aleatoriamente seleccionados. La mutagénesis de las tres CDR con una biblioteca de variantes fue del 75 %. Este método permitió la creación altamente eficaz de una biblioteca de 4×10^8 variantes. Los presentes inventores han observado resultados similares para la creación de bibliotecas en las otras 3 cadenas VL-k usadas en la biblioteca *de novo* de Fab. Las bibliotecas se transformaron a 2×10^9 y el fago se preparó a 10^{11} ufc/ml. Se inmunopurificó BSA con la biblioteca *de novo* de pIX y se aislaron éxitos (Tabla 3). Se construyeron dos bibliotecas de LC sobre éxitos primarios contra BSA usando los métodos descritos anteriormente. Las bibliotecas consistieron en HC de F4 con diversidad en LC de A27 y un conjunto de HC D6, F6, C2, C6 con diversidad de LC de B3.

Tabla 3. Ejemplos de BSA

| 169 modelo : | HC CDR1 | HC CDR2 | HC CDR3 | LC | H3 Largo | Frecuencia | K _D (nM) |
|--------------|-----------|-----------------------|-----------------------------|-----|----------|--------------|---------------------|
| D11 | S Y A I S | M G G I I P I F G T A | Q L W G Y Y A L E I | A27 | 13 | 12 out of 33 | 0,7 |
| D6 | - - - - - | - - - - - | I R W G G W F R G Y L D Y | B3 | 12 | 12 | 4 |
| F6 | - - - - - | - - - - - | G I I G I N L V V L D Y | B3 | 12 | 4 | 26 |
| F4 | - - G - - | - - - - - | G I I G T I T Y V F D Y | A27 | 14 | 3 | 9 |
| C2 | - - - - - | - - - - - N - N - | D F G V Y T W L G Q T F D Y | B3 | 14 | 1 | 26 |
| C6 | - - G - - | - - - - - | R A G M R V Q T Y Y F F D Y | B3 | 13 | 1 | n.d. |

| 169 modelo : | HC CDR1 | HC CDR2 | HC CDR3 | LC | H3 Largo | Frecuencia | K _D (nM) |
|--------------|-----------|-----------------------|-----------------------------|-----|----------|--------------|---------------------|
| D11 | S Y A I S | M G G I I P I F G T A | Q L W G Y Y A L E I | A27 | 13 | 12 out of 33 | 0,7 |
| D6 | - - - - - | - - - - - | I R W G G W F R G Y L D Y | B3 | 12 | 12 | 4 |
| F6 | - - - - - | - - - - - | G I I G I N L V V L D Y | B3 | 12 | 4 | 26 |
| F4 | - - G - - | - - - - - | G I I G T I T Y V F D Y | A27 | 14 | 3 | 9 |
| C2 | - - - - - | - - - - - N - N - | D F G V Y T W L G Q T F D Y | B3 | 14 | 1 | 26 |
| C6 | - - G - - | - - - - - | R A G M R V Q T Y Y F F D Y | B3 | 13 | 1 | n.d. |

Se realizaron tres rondas de inmunopurificación con 10 nM, 1 nM y 1 nM de antígeno, respectivamente, usando tanto condiciones de lavado no rigurosas como rigurosas. Se realizó la secuenciación de clones positivos para antígeno y se purificaron clones seleccionados para obtener datos de afinidad. Para la biblioteca de B3 inmunopurificada con condiciones menos rigurosas, la mayoría de los clones enriquecidos fueron no mutantes. De aquellos clones que no fueron no mutantes, ninguno mostró enriquecimiento, y los datos de Biacore confirmaron que no tenían mejora en la afinidad. Cuando las condiciones de inmunopurificación más rigurosas se aplicaron a esta misma biblioteca se observó enriquecimiento de clones con mutaciones en CDR1 de LC y análisis de Biacore posteriores mostraron una mejora en la afinidad de aproximadamente 3 veces (Tabla 4). Todos los clones aislados de esta biblioteca contuvieron la cadena pesada D6, que tuvo la mayor afinidad por BSA con respecto a las otras cadenas pesadas. Para la biblioteca A27, ni el método de inmunopurificación dio enriquecimiento clonal ni la recuperación de no mutante. Aunque no se observó enriquecimiento de clones individuales, se observó el enriquecimiento en aminoácido o características de aminoácido en posiciones de CDR particulares. Los clones seleccionados

demostraron una mejora de la afinidad de hasta 10 veces en comparación con la parental (Tablas 5 y datos no mostrados).

Table 4: Inmunopurificación rigurosa de la biblioteca B3

| clon # | HC CLON | WT MUTACIONES DESIGNADAS | L1 | | | | L2 | | L3 | | Afinidad KD (nM) |
|--------|---------|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------|
| | | | Y31 S,Y,H, FA | K31e K,T,N, E | Y32 Y,W,D,F,H,S, NA | Y91 Y,S, HA | Y92 Y,N,D,S,H,I,F,K,G | S93 S,N,T, D,G,H, | T94 T,Y,L,V,FA, S | L96 L96 W,Y, F,L,I, | |
| 27 | D6 | | - | T | W | - | - | - | - | - | 0.5 |
| 46 | D6 | | - | - | W | - | - | - | - | - | - |
| 42 | D6 | | F | - | W | - | - | - | - | - | 0.7 |
| 57 | D6 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | D6 | | - | T | W | - | - | - | - | - | - |

Table 5: Inmunopurificación no rigurosa de la biblioteca A27

| clon | # HCCLON | WT | MUTACIONES DESIGNADAS | S30 | S31 | S31a | Y32 | L2 | Y91 | G 92 | L3 | S94 | L 96 | Afinidad KD (nM) |
|------|----------|----|-----------------------|-----|-----|------|-----|----|-----|------|----|-----|------|------------------|
| 10 | F4 | 1 | | - | - | - | E | S | H | I | H | F | - | 0.18 |
| 13 | F4 | 1 | | T | - | - | E | D | H | - | - | Y | - | |
| 22 | F4 | 1 | | D | - | R | E | D | H | - | R | F | - | |
| 30 | F4 | 1 | | D | - | R | Q | D | - | R | R | Y | - | |
| 34 | F4 | 1 | | D | - | - | H | D | - | H | N | F | - | 0.75 |
| 35 | F4 | 1 | | T | N | H | - | D | - | Y | - | T | - | |
| 39 | F4 | 1 | | - | - | R | E | S | H | - | H | Y | - | |
| 52 | F4 | 1 | | R | - | H | Q | A | H | I | H | L | - | |
| 54 | F4 | 1 | | - | - | N | K | A | - | Y | - | T | - | |
| 70 | F4 | 1 | | N | - | A | Q | D | H | - | N | L | - | 0.13 |
| 74 | F4 | 1 | | - | - | - | S | D | H | - | H | L | - | |

Ejemplo 8. Inmunopurificación de bibliotecas paralela

5 Como la biblioteca de los presentes inventores se diseña y construye de tal forma que cada sub-biblioteca pueda usarse individualmente basándose en el andamiaje HC o LC usado, los presentes inventores diseñaron una estrategia de inmunopurificación paralela para inmunopurificar un conjunto de bibliotecas individuales, además de sub-reunidas, para maximizar la probabilidad de identificar diversos anticuerpos de unión.

10 Se eligieron BSA y Lysozyme como antígenos modelo para la validación inicial de bibliotecas. Los presentes inventores reunieron sub-bibliotecas de la región estructural 1-69 y 3-23 HC en 4 sub-conjuntos manteniendo la región estructural LC separada para la inmunopurificación paralela usando Kingfisher (). Como comparación, los presentes inventores también reunieron completamente todas las sub-bibliotecas 1-69 y 3-23 HC y asociaron LC en un conjunto y lo usaron para inmunopurificar contra BSA. Las perlas paramagnéticas recubiertas con antígenos biotinilados (Dyal) se incubaron con fago durante 1 h a TA. Se realizaron la unión y lavados en formato de alto rendimiento en un bloque de 96 pocillos. Después de varias etapas de lavado, los fagos unidos se eluyeron y se amplificaron infectando células MC1061F' para la siguiente ronda de selección (Ejemplo 2 para detalles). Después de las rondas de selección, se aisló ADN, se eliminó pIX por digestión con restricción y se ligó y transformó en MC1061F' para expresar Fab solubles. Se probaron clones individuales aislados para la expresión de Fab y unión al antígeno por ELISA. La expresión de Fab se detectó incubando extracto de células que contenían Fab sobre placa de ELISA recubierta con anti-Fd, seguido de HRP conjugado con anti-kappa. La especificidad por antígenos se probó capturando antígenos biotinilados sobre placas recubiertas con estreptavidina con la posterior adición de lisados celulares que contenían Fab. Para ELISA competitivo se incluyeron antígenos no biotinilados en cantidad en exceso para competir por la unión a Fab. Se detectó Fab unido usando HRP conjugado con anti-kappa.

25 Los resultados de inmunopurificación paralela mostraron 30 de los 90 clones cribados unidos a BSA, que representa el 33 % de la tasa de éxitos en este experimento. La tasa de éxitos es muy superior a una tasa de éxitos del 7 % cuando la inmunopurificación se completó usando una biblioteca reunida completa (Tabla 6). Aunque no hay comparación directa de dos estrategias de inmunopurificación para Lysozyme, donde solo se realizó una inmunopurificación de bibliotecas completamente reunidas, la tasa de éxitos representa el 4 %. (Tabla 6). En la Figura 11 se muestra que el análisis de secuencias identificó 6 anticuerpos únicos para BSA y 3 para Lysozyme.

35 Los ligantes de BSA y Lysozyme únicos se purificaron para determinar la afinidad de unión (KD). Se usó un procedimiento de purificación de Fab de dos etapas (REStm334bw.doc) para purificar los Fab. Brevemente, el lisado de *E. coli* se sometió primero a un procedimiento de IMAC de una única etapa. Después de la diálisis, el eluato de la columna de IMAC se sometió a una segunda etapa de purificación, intercambio aniónico usando resina QFF Sepharose, que mejoró la pureza del Fab a ~80-90 %. La Figura 12 muestra Fab para BSA y Lysozyme purificados.

40 Se usó análisis BIAcore para determinar la afinidad de los seis ligantes de BSA y tres de Lysozyme. Los resultados mostraron afinidades de unión de los Fab que oscilaron entre 0,1 y 28 nM para ligantes de BSA y 6-260 nM para los ligantes Lysozyme, respectivamente. No se detectó unión no específica de cualquier grupo de Fab a BSA, Lysozyme o la superficie de referencia (matriz de CM5 vacía, activada y bloqueada). La Tabla 7 y 8 muestran la unión cinética de los ligantes BSA y Lysozyme.

Ejemplo 9. Clasificación por afinidad

45 Para clasificar el orden de los Fab por la constante de disociación de la unión K_{dis} , se midieron sobrenadantes de *E. coli* en bruto que usa el sistema Octet (por ejemplo, como se describe en las páginas web públicas, tales como forteo.com). La sonda sensor SA se recubrió con antígeno biotinilado de prueba. Los cultivos de inducción de *E. coli* durante la noche se lisaron con un tampón 2x BBS/Lysozyme y se dispusieron en 96 pocillos de ensayo. Las puntas de sensor calibradas se sumergieron en los pocillos de ensayo que contenían el lisado de *E. coli* para medir la asociación de la unión. La punta de unión se colocó entonces por transferencia en tampón solo para medir la disociación de la unión. La cinética de unión se analizó usando el software del fabricante. Para referencia, la Tabla 6 compara los resultados de clasificación derivados de Octet y BIAcore con 3 muestras de Fab diferentes para el mismo antígeno. También se evaluó la unión cinética usando un instrumento BIND (por ejemplo, por sistemas srubio), los lisados celulares que expresan Fab se filtraron primero para eliminar células no lisadas, grandes residuos de células, lípidos y ácidos nucleicos cizallados. Se calibraron las placas del sensor recubiertas de estreptavidina y se incubaron con antígeno biotinilado. Los pocillos se leyeron durante 2 minutos a intervalos de 30 segundos y se lavaron 3x con 100 μ l/pocillo de 1xPBS. Entonces se añadieron los lisados de Fab tratados con filtro a los pocillos de ensayo para permitir la unión al antígeno presentado sobre la superficie de la placa del sensor con estreptavidina. Se vaciaron los pocillos y se añadieron 200 μ l de 1xPBS. Se midió la señal de unión al antígeno biotinilado de 2 a 5 minutos a intervalos de 30 s. La constante K_{dis} se obtiene ajustando los datos de disociación para múltiples cantidades conocidas de antígeno unido a la superficie del sensor. Aunque no pudieron obtenerse las constantes de asociación, las constantes de disociación, que son independientes de la concentración de Fab, fueron comparables a los resultados de BIAcore.

Formatos de ensayo alternativos a los descritos anteriormente son para presentar los Fab por anti-F(ab')₂, anti-Fd, o anti-HIS o anti-FLAG según convenga para las marcas incluidas sobre la proteína Fab. El anticuerpo puede conjugarse con una superficie reactiva con amina de la placa del sensor. Los lisados de *E. coli* filtrados o fracciones periplásmicas que contienen proteína Fab se capturan por anti-F(ab')₂ conjugado sobre la placa del sensor. Después de la incubación con antígeno, la cinética de unión puede medirse como se ha descrito anteriormente.

Se desarrollaron dos métodos para medir las constantes de disociación de la unión (K_{dis}) usando sobrenadantes de *E. coli* en bruto. Uno es un método basado en ELISA que usa sobrenadante de medio de *E. coli* en bruto y el otro es el sistema Octet (página web Fortebio), que es un instrumento de mesa capaz de medir la cinética de unión de múltiples muestras de una vez. Para un ELISA de clasificación por afinidad, se cuantificó la cantidad de Fab generada por micro-expresión (500 ul). Un ELISA de expresión de Fab muestra la cantidad de proteína Fab en la fracción de lisado celular y la fracción de medio gastada. Como ambas fracciones tienen cantidades similares de proteína Fab y el lisado celular es más laborioso de generar, se eligió la fracción de medio gastada para su uso en el ELISA de clasificación. Se usaron tres antígenos para establecer el método de clasificación de ELISA. Son ST2L de ratón, resistina humana y MCP-5 de ratón. Se usaron Fab únicos de secuencia para probar su capacidad para unirse a su antígeno respectivo. Se aplicaron diluciones múltiples de los medios gastados que contenían Fab expresado para cada muestra a cada ELISA. Cada dilución de Fab se dividió en dos, una alícuota para unirse al antígeno y la otra alícuota para medir la cantidad relativa de proteína Fab contenida en cada muestra diluida. Se calcularon los resultados de la unión del antígeno y los ELISA de expresión para establecer una relación de actividad específica para cada punto de dilución. El representar la relación de actividad específica con el clon correspondiente proporciona una visión global de todas las muestras de Fab. A partir de esta visión puede determinarse qué dilución se encuentra en un punto lineal de la curva y captura los candidatos de Fab más probables para la clasificación. Se probaron cincuenta y tres muestras de mST2L a diluciones 1:2 y 1:4.

Se usó la dilución 1:4 para determinar la clasificación de estos Fab debido a que pareció estar en el sector lineal de la curva de dilución. Se hizo la clasificación de ocho Fab mMCP-5 usando un intervalo de dilución más amplio, 1:2 y 1:10. El intervalo de dilución usado aquí estuvo fuera del intervalo lineal de la curva de unión. Se diluyeron ochenta Fab resistina a 1:2, 1:4, y 1:8, para determinar si tres diluciones establecerían mejor un intervalo lineal. Solo un subconjunto de estos Fab tuvo un comportamiento de actividad:concentración lineal en este intervalo de dilución. Los Fab resistina se expresaron de nuevo y los sobrenadantes gastados se diluyeron 1:5, 1:10 y 1:20. Las diluciones 1:5 y 1:10 no tuvieron muestras dentro de la curva de valoración lineal, pero 1:20 estuvo dentro del intervalo lineal. Las relaciones de actividad específica se calcularon para todas las muestras y se estableció un orden de clasificación (Tablas 9A, B y C). Las mediciones de afinidad sobre Biacore mostraron muy poca diferencia entre algunos de los Fab mST2L en cuanto a su cinética de unión, mientras que los datos del ELISA de clasificación mostraron poca diferencia (Tabla 9A). El desacuerdo en la clasificación de Fab 28 entre los resultados de ELISA y de Biacore podría ser debido a los formatos que se usaron para la orientación del antígeno. El ELISA tuvo el antígeno en disolución mientras que el formato de Biacore tuvo el antígeno presentado sobre la superficie. Fab 40 en los resultados de Biacore muestra una rápida constante de asociación (k_a) dando la peor KD global. Esto puede ser debido a una imprecisa concentración de proteína. Los Fab mMCP-5 muestran buena correlación en la clasificación entre los resultados de ELISA y de Biacore. Los Fab S10, S14 y S30 fueron los ligantes clasificados más bajos y los Fab P9, P12, P20 y S1 fueron los ligantes mejor clasificados en ambos ensayos (Tabla 9B). Aún cuando Fab P1 fue un buen ligante en el ensayo de clasificación de ELISA, también mostró una señal reducida a la dilución 1:10 y fue un ligante mediocre en Biacore.

Los Fab resistina muestran correlación entre las clasificaciones de ELISA y de Biacore (Tabla 9C). El clon 551-22 es el mejor y el clon 169-7 es el peor en las clasificaciones de ELISA y Biacore. Además, 323-7 y 323-32 son las siguientes mejores clasificaciones al clon 551-22 en tanto las clasificaciones de ELISA como de Biacore.

Tabla 9A. Diagrama de comparación de Fab mST2L con resultados de Biacore

| Fab | Ranking ELISA | SArazón 1:4 diln | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-4} s^{-1}$ | K_D (nM) |
|-----|---------------|------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------|
| 16 | 3 | 41 | 2.41 | 7.2 | 3 |
| 17 | 1 | 233 | 1.67 | 5.9 | 3.5 |
| 26 | 1 | 220 | 1.47 | 6.31 | 4.3 |
| 28 | 4 | 4 | 2.12 | 0.6 | 3.1 |
| 40 | 2 | 94 | 0.57 | 5.27 | 9.2 |
| 45 | 2 | 71 | 1.44 | 3.8 | 2.6 |

Tabla 9B. Diagrama de comparación de Fab mMCP-5 con resultados de Biacore

| Fab | Ranking ELISA | SArazón1:4 diln | $k_a \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ | K_D (nM) |
|-----|---------------|-----------------|---|-------------------------------------|------------|
| P1 | 2 | 111 | 7.7 | 2.009 | 2.6 |
| P9 | 1 | 136 | 20.7 | 0.42 | 0.2 |
| P12 | 2 | 105 | 74.7 | 2.81 | 0.38 |
| P20 | 1 | 151 | 11.28 | 0.62 | 0.55 |
| S1 | 3 | 91 | 28.2 | 1.71 | 0.6 |
| S10 | 6 | 10 | 25 | 15.0 | 0.6 |
| S14 | 5 | 30 | 4.8 | 4 | 8 |
| S17 | nd | nd | 30.1 | 7.5 | 2.5 |
| S24 | nd | nd | 12.6 | 1.88 | 1.5 |
| S30 | 4 | 49 | 93 | 13 | 1.4 |

Tabla 9C. Diagrama de comparación de Fab resistina con resultados de Biacore

| Ejemplo Fab | Ranking ELISA | SArazón1:8 diln | $k_a \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ | K_D (nM) |
|-------------|---------------|-----------------|---|-------------------------------------|------------|
| 3 | 4 | 8 | 8.06 | .07 | .5 |
| 7 | 5 | 5 | 1.39 | .41 | .8 |
| | No | | Unión pobre | | |
| 2 | unión | o unión | | | |
| 5 | 2 | 13 | 11.4 | .6 | .5 |
| 8 | 2 | 11 | 5.4 | .4 | .7 |
| 8 | 3 | 4 | 12.8 | .99 | .8 |
| 6 | 1 | 25 | 34.8 | .6 | .2 |
| 5 | 3 | 5 | 14.8 | .33 | .6 |

- 5 Los datos de clasificación de ELISA se correlacionaron mejor con los valores de disociación estimados a partir del análisis de interacción Biacore, excepto por algunas excepciones. El método de clasificación basado en ELISA optimizado soporta el apropiado cribado y gestión de grandes números de candidatos de Fab. Usando el instrumento Octet, se desarrollaron dos formatos para clasificar candidatos de Fab por actividad de unión cinética. El formato de disolución se realiza con el Fab aplicado a la superficie del sensor de punta y el Ag está presente en disolución. Las
- 10 velocidades de asociación se calculan cuando el Ag está uniéndose al Fab mediante la medición de biomasa añadida a la superficie del sensor durante un periodo de tiempo. Las velocidades de disociación se calculan cuando el sensor se coloca en un tampón (es decir, 1xPBS) después de que el Ag se una al Fab, produciendo una disminución en la biomasa sobre el sensor con el tiempo. En el ensayo de unión cinético inmovilizado, el antígeno se aplica a la superficie del sensor de punta y el Fab está presente en disolución. Las velocidades de asociación y de
- 15 disociación se determinan por el Fab que aumenta y luego que disminuye la biomasa sobre la punta con el tiempo.

El protocolo básico para las puntas de sensor reactivas con amina empieza estableciendo un nivel de referencia inicial, seguido de la etapa de activación en la que la primera molécula (es decir, rgt secundario, Fab, o Ag) se aplica al sensor de punta. Se realiza una etapa de extinción después de unirse la primera molécula al sensor de punta y se establece otro nivel de referencia antes de permitir que se produzca una interacción por unión con otra molécula. A continuación se realiza tanto una etapa de carga (es decir, añadir un Fab o Ag a un sensor de punta recubierto con reactivo secundario) como de asociación (es decir, sensor recubierto de Fab o Ag). Si esto es una etapa de carga, entonces se establece otro nivel de referencia antes de hacerse una etapa de asociación. Una vez se completa una etapa de asociación, se realiza una etapa de disociación y se completa el experimento. El ensayo de unión cinético en disolución usa puntas de sensor recubiertas con SA de alta unión. Se prepara una placa de 96 pocillos de muestra (cat n° 675076, Greiner Bio-One) del siguiente modo: la columna 1 se llena con 100 ul de 1xPBS hasta el nivel de referencia de los sensores de la punta, la columna 2 se llena con Bt-anti-F(Ab)₂ humano (cat n° 109-066-097, Jackson Immunological) a una concentración de 10 ug/ml en 1xPBS para cargar la superficie de la punta de sensor recubierta de SA, la columna 3 se llena con 100 ul de 1xPBS para el segundo nivel de referencia, la columna 4 se llena con 100 ul de 10 ug/ml de muestras Fab en 1xPBS para la segunda etapa de carga, la columna 5 se llena con 100 ug/ml de 1xPBS para el tercer nivel de referencia, la columna 6 se llena con 10 ug/ml de Ag en 1xPBS para la etapa de asociación, y los pocillos de la columna 6 contienen 1xPBS para la etapa de disociación. Se establece el protocolo cinético para cada etapa para ejecutar a 30 °C y se agita a 1000 rpm. El primer nivel de referencia se realiza durante 100 segundos. La primera etapa de carga (anti-F(Ab)₂ humano) se ejecuta durante 600 segundos. El segundo nivel de referencia se ejecuta durante 200 segundos. La segunda etapa de carga (candidatos a Fab) se ejecuta durante 600 o 900 segundos. El tercer nivel de referencia se ejecuta durante no más de 300 segundos. La etapa de asociación (Ag) se ejecuta durante 600 segundos y la etapa de disociación se ejecuta durante hasta 900

segundos. El ensayo de unión cinético inmovilizado usa puntas de sensor reactivas con amina. La caja de sensor de punta se incubó primero en disolución de MES a pH apropiado (kit de acoplamiento de amina, Fortebio) a TA durante 10 minutos. Se prepara una placa de 96 pocillos de muestra (cat nº 675076, Greiner Bio-One) del siguiente modo: la columna 1 se llena con la disolución de MES a pH apropiado hasta el nivel de referencia de los sensores de punta, la columna 2 se llena con una relación 1:50 de EDC/NHS (kit de acoplamiento de amina, Fortebio) en la disolución de MES a pH del nivel de referencia para activar la superficie de sensor, la columna 3 se llena con 10 ug/ml de Ag en la disolución de MES a pH para cargar la punta del sensor, la columna 4 se llena con disolución de etanolamina (kit de acoplamiento de amina, Fortebio) para extinguir la superficie no ocupada del sensor cargado con Ag, la columna 5 se llena con 100 ul de 1xPBS para el segundo nivel de referencia, la columna 6 se llena con 10 ug/ml de muestra de Fab en 1xPBS para la etapa de asociación, los pocillos de la columna 7 se llenan con 1xPBS para la etapa de disociación. Se establece el protocolo cinético para cada etapa para ejecutar a 30 °C y se agita a 1000 rpm. El primer nivel de referencia se ejecuta durante 100 segundos. La etapa de activación se ejecuta durante hasta 900 segundos. La etapa de carga de Ag se ejecuta durante 600 segundos. La etapa de extinción se ejecuta durante hasta 300 segundos. El segundo nivel de referencia se ejecuta durante hasta 300 segundos. La etapa de asociación (Ag) se ejecuta durante 600 segundos y la etapa de disociación se ejecuta durante hasta 900 segundos. Se realizó el ensayo cinético en disolución contra antígenos de 3 tamaños diferentes. Esta variable adicional (tamaño de antígeno) se usó para ganar entendimiento sobre cómo las diferentes construcciones de biomasa afectarían los resultados calculados finales para la clasificación de candidatos para Fab. Los presentes inventores encontraron que el mayor tamaño del antígeno dio mejor señal (eje y) y valor de R^2 (Tabla 13A-C). La amina que acopla los Fab directamente al sensor podría ayudar a aumentar la señal de asociación en el ensayo cinético en disolución debido a la eliminación de la molécula de 1009 kDa, anti-F(Ab)₂, de la superficie del sensor, aumentando, por tanto, la capacidad de ver el efecto de la adición de la masa de la última molécula. Octet puede mostrar diferencias entre los Fab según sus curvas de señales de asociación y disociación y se correlacionan con las constantes de velocidad calculadas. Los Fab mST2L 16, 26, y 28 tienen mejores velocidades de unión que los Fab 1 y 38 (Figura 13a). Los Fab resistina 323-11 y 551-7 son los mejores y los Fab 169-1 y 551-38 son los peores ligantes (Figura 13b). Con los Fab mMCP-5 no puede distinguirse en este formato la clasificación para la unión a Ag, excepto que Fab 14 es el peor (Figura 13c). Como se ha tratado previamente, este formato para medir mMCP-5 puede no ser el mejor. El tamaño de mMCP-5 es considerablemente más pequeño que un Fab, 9 kDa frente a 50 kDa, más la punta que está recubierta con un reactivo secundario de 100 kDa empeorará incluso el ser capaz de medir una diferencia de señal.

El formato de ensayo inmovilizado proporciona otro medio para evaluar la cinética de unión al Fab. Cuando el Ag es más pequeño, por ejemplo, mMCP-5, que el Fab como se observa en la Figura 13C del ensayo en el formato de disolución, la señal es reducida. El intentar leer una proteína pequeña encima de una gran masa ya establecida sobre el sensor tiene un efecto pequeño. Girando los componentes de unión alrededor de donde la molécula más pequeña, mMCP-5, está sobre el sensor y entonces leyendo la actividad de unión de la molécula mayor, por ejemplo un Fab, debe producirse una señal más significativa. Este efecto se observa en la Figura 14, en la que mMCP-5 acopla la amina a la superficie del sensor y la asociación se mide cuando se añade el Fab. El aumento de señal en este formato de ensayo es al menos dos veces superior al observado en el formato de disolución. Adicionalmente, los valores de R^2 de asociación son ahora superiores a 0,85, mientras que estuvieron promediando 0,57 en el formato de disolución (Tabla 14).

Biacore es actualmente el estándar para determinar la cinética de unión. Los presentes inventores compararon los datos de Octet para los Fab anteriormente mencionados con los datos de Biacore. Parece haber una diferencia en la sensibilidad entre Biacore y Octet (Figura 15). La constante de afinidad, KD, para Biacore es generalmente superior a la constante de afinidad de Octet. En los experimentos de Octet, el analito se usó a una concentración de 10 ug/ml y 1 ug/ml con Biacore. El usar diez veces el analito para Octet puede hacer que la constante de la velocidad de asociación parezca más rápida. Por tanto, la constante de la velocidad de disociación puede afectarse indirectamente debido al analito en exceso que compite en el ensayo. En combinación, esto hace que las constantes de afinidad parezcan peor para Octet en comparación con Biacore. Aunque no se ha demostrado directamente, esta cuestión de sensibilidad también puede tener un efecto sobre la clasificación. En cuanto a la clasificación, los Fab resistina mostraron alguna correlación entre Biacore y Octet. La única diferencia entre la resistina y los otros ejemplos de Ag fue la diferencia en el tamaño de molécula entre Fab y Ag. Los Fab tienen 50 kDa y la resistina tiene 66 kDa, haciéndolas más próximas en tamaño, mientras que mST2L a 100 kDa y mMCP-5 a 9 kDa son de tamaño diferente.

También se midió la cinética de unión usando BIND (www.srbiosystems.com), otro instrumento de mesa, que puede medir 96 muestras de una vez. Se filtraron primero los lisados celulares que expresan Fab para eliminar células no lisadas, grandes residuos de células, lípidos y ácidos nucleicos cizallados. Se calibraron las placas del sensor recubiertas con estreptavidina y se incubaron con antígeno biotinilado. Los pocillos se leyeron durante 2 minutos a intervalos de 30 segundos y se lavaron 3x con 100 μ l/pocillo de 1xPBS. A continuación se añadieron los lisados de Fab tratados con filtro a los pocillos de ensayo para permitir la unión al antígeno presentado sobre la superficie de la placa del sensor con estreptavidina. Los pocillos se vaciaron y se añadieron 200 μ l de 1xPBS. Las señales para unirse al antígeno biotinilado se midieron durante 2-5 minutos a intervalos de 30 segundos. Un software SRU-BIND resta la señal de tamaño obtenida de los pocillos de referencia, en los que se añadieron los lisados celulares sin Fab. La K_{dis} se obtuvo ajustando los datos de disociación a múltiples antígenos conocidos

unidos a la superficie del sensor. Aunque las velocidades de asociación son muy difíciles de obtener, las velocidades de disociación, que son independientes de la concentración de Fab, fueron comparables con los resultados de Biacore.

5 Hay varios formatos de ensayo alternativos a los descritos anteriormente. Por ejemplo, con el instrumento BIND, los Fab pueden capturarse por anti-F(ab')₂, anti-Fd o anti-HIS o anti-FLAG inmovilizado sobre la placa del sensor según convenga. Se dejan capturar los lisados de *E. coli* filtrados o fracciones periplásmicas que contienen proteína Fab por anti-F(ab')₂ conjugado sobre la placa del sensor. Después de la incubación con antígeno, la cinética de unión pueden medirse como se ha descrito anteriormente. Por tanto, los Fab purificados pueden conjugarse directamente con una superficie reactiva con amina de la placa del sensor y se usan en este formato para medir la unión al antígeno.

15 También se midieron las cinéticas de unión usando BIND™ (sitio web de Sribiosystems), otro instrumento de mesa, que puede medir 96 muestras de una vez. Los lisados celulares que expresan primero Fab se expresan primero para eliminar células no lisadas, residuos de células grandes, lípidos y ácidos nucleicos cizallados. Se calibraron las placas del sensor recubiertas con estreptavidina y se incubaron con antígeno biotinilado. Los pocillos se leyeron durante 2 minutos a intervalos de 30 segundos y se lavaron 3x con 100 µl/pocillo de 1xPBS. A continuación se añadieron los lisados de Fab tratados con filtro a los pocillos de ensayo para permitir la unión al antígeno presentado sobre la superficie de la placa del sensor con estreptavidina. Se vaciaron los pocillos y se añadieron 200 µl de 1xPBS. Las señales para unirse al antígeno biotinilado se midieron durante 2-5 minutos a intervalos de 30 segundos. Un software SRU-BIND™ resta la señal de tamaño obtenida de los pocillos de referencia, en los que se añadieron lisados celulares sin Fab. La K_{dis} se obtuvo ajustando los datos de disociación a múltiples antígenos conocidos unidos a la superficie de sensor. Aunque las velocidades de asociación son muy difíciles de obtener, las velocidades de disociación, que son independientes de la concentración de Fab, fueron comparables con los resultados de Biacore.

20 Hay varios formatos de ensayo alternativos a los descritos anteriormente. Por ejemplo, con el instrumento BIND, los Fab pueden capturarse por anti-F(ab')₂, anti-Fd o anti-HIS o anti-FLAG inmovilizados sobre la placa del sensor según convenga. Se dejan capturar los lisados de *E. coli* filtrados o fracciones periplásmicas que contienen proteína Fab por anti-F(ab')₂ conjugado sobre la placa del sensor. Después de la incubación con antígeno, la cinética de unión puede medirse como se ha descrito anteriormente. Por tanto, los Fab purificados pueden conjugarse directamente con una superficie reactiva con amina de la placa del sensor y usarse en este formato para medir la unión al antígeno.

35 **Ventajas**

La biblioteca *de novo* de Fab humanos descrita anteriormente es distinta de tales otras bibliotecas debido a que la presentación es mediante la proteína pIX del fago M13. El uso de línea germinal humana representativa y secuencias de la estructura canónica como andamiajes de biblioteca y el diseño de secuencias de CDR que imitan la distribución natural de aminoácidos en H-CDR3 hace la biblioteca exhaustiva en la cobertura del repertorio inmunitario humano. Este diseño de biblioteca aumenta la probabilidad del descubrimiento de anticuerpos para dirigir a antígenos en comparación con otras bibliotecas *de novo* informadas en la bibliografía que se construyeron sobre un único gen o consenso de genes de la línea germinal o un andamiaje de mAb maduros. Las sub-bibliotecas separadas, cada una compuesta de un único andamiaje (par VH/VL) y/o longitudes de H-CDR3, acopladas con inmunopurificación paralela de las bibliotecas maximiza la probabilidad de descubrimiento de anticuerpos de secuencia diversa para el antígeno diana. Además, esto proporciona un mecanismo para el estudio detallado de la funcionalidad de cada par VH/VL y sus secuencias respectivas y estructura en la unión anticuerpo/antígeno. El proceso de maduración por afinidad en línea integrada es un método eficaz para aislar anticuerpos de alta afinidad mientras que se mantiene la diversidad.

50 **Referencias:**

1. Kretschmar & von Ruden, Current Opin Biotechnol. 13:598-602, 2002)
- 55 2. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE WebLogo: A sequence logo generator, Genome Research, 14:1188-1190, (2004)
3. Wang W, Saven JG. Designing gene libraries from protein profiles for combinatorial protein experiments. Nucleic Acids Res. Vol 30, No 21, e120. 2002
- 60 4. Hennie R Hoogenboom. Nature Biotech. (2005) 23:1105. Selecting and screening antibody libraries.
5. V. Lee, Wei-Ching Liang, Mark S. Dennis, Charles Eigenbrot, Sachdev S. Sidhu and Germaine Fuh JMB (2004) 340:1073-1093. High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold.
- 65

6. Michela Silacci, Simon Brack, Giulia Schirru, Jessica Mårlind, Anna Ettore, Adrian Merlo, Francesca Viti and Dario Neri. *Proteomics* (2005) 5: 2340-2350. Design, construction, and characterization of a large synthetic human antibody phage display library
- 5 7. Eskil Soderlind and Carl A.K. Borrebaek. *Nature Biotech.* (2000). 18:852. Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody library.
8. Achim Knappik, Liming Ge, Annemarie Honegger, Peter Pack, Melanie Fischer, Gunter Wellnhofer, Adolf Hoess, Joachim Wolle, Andreas Pluckthun and Bernhard Virnekas *JMB* (2000) 296:57-86. Fully Synthetic Human Combinatorial Antibody Libraries (HuCAL) Based on Modular Consensus Frameworks and CDRs Randomized with Trinucleotides.
- 10 9. Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, Prospero TD, Hoogenboom HR, Missim A, Cox JPL, Harrison JL, Zacco, Gherardi E and Winter G. *EMBO J* 1994; 13(14): 3245-3260. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires.
- 15 10. Hans J. de Haard, Nicole van Neer, Anneke Reurs, Simon E. Hufton, Rob C. Roovers, Paula Henderikx, Adriaan P. de Bruyne, Jan-Willem Arends, and Hennie R. Hoogenboom *JBC* (1999). 274:18218-18230. A Large Non-immunized Human Fab Fragment Phage Library That Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies*
- 20 11. Rene Michael Hoet and Robert Ladner, et al., *Nature Biotech.* (2005) 23:344. Generation of high affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining region diversity.
- 25 12. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE *WebLogo: A sequence logo generator*, *Genome Research*, 14:1188-1190, (2004)
- 30 13. Wang W, Saven JG. Designing gene libraries from protein profiles for combinatorial protein experiments. *Nucleic Acids Res.* Vol 30, No 21, e120. 2002
14. Vbase: The database of human antibody genes. Public website: vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk
- 35 15. Juan Carlos Almagro. *J. Mol. Recognit.* (2004) 17:132-143. Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires.
- 40 16. Ian M. Tomlinson, Jonathan RL. Cox, Ermanno Gherardi, Arthur M. Lesk and Cyrus Chothia. *The EMBO Journal* (1995) 14:4628-4638. The structural repertoire of the human VK domain.
17. US patent 0165946 A1.
18. European Patent application 90201671.6.
- 45 19. US Pat No. 5,942,609.
20. Dillon et al., *BioTechniques* 9(3): 298-300(1990);
- 50 21. Prodomou et al., *Protein Engineering* 5(8): 827-829 (1992);
22. Chen et al., *JACS* 116:8799-8800 (1994);
23. Hayashi et al., *BioTechniques* 17(2):310-315 (1994).
- 55 24. Stemmer, *Nature* 370:370:389-391 (1994)
25. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751 (1994).
- 60 26. Sidhu et al, *Methods in Enzymology.* (2000) 328: 333-363. Phage display for selection of novel binding peptides.
27. Tim Clackson and Henry B Lowma. 2004. *Phage display-a practical approach*. Oxford University Press
- 65 28. Figini et al, *J. Mol. Bio.* (1994) 239:68-78. In vitro assembly of repertoires of antibody chains on the surface of phage by renaturation.

29. William F. Dall'Acqua, Melissa M. Damschroder, Jingli Zhang, Robert M. Woods, Lusiana Widjaja, Julie Yu, Herren Wu. Methods (2005) 36:43-60. Antibody humanization by framework shuffling.

TABLAS

Modelo 3-23
Table 1. Diseño de CDR 1 y CDR2 de la cadena pesada
Posición Prevalente de aminoácidos en IgGs derivado de la línea germinal subfamilia(%) Design Codon Encoded Coverage (. Aminoácidos de 3-23 subfamilias de la línea germinal son mostrados en negrita roja .)

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|------------|-----------|
| H1-31 | S | D | N | T | R | R | G,K,A,V,I,H,M,F,Y,Q,C,L,W,PSD | RRC | SDNG | 89 | | |
| | 68 | 11 | 9 | 6 | 2 | <1 | | | | | | |
| H1-33 | A | G | W | S | Y | T | V,E,N,F,C,P,Q,D,R | KSG | AGWS | 93 | | |
| | 42 | 23 | 22 | 6 | 4 | 1 | <1 | | | | | |
| H1-35 | H | S | N | T | Y | R,Q,C,D,G,I,F | | MRC | SHNR | 95 | | |
| | 44 | 40 | 9 | 5 | 1 | <1 | | | | | | |
| H2-50 | V | A | N | G | Y | R | L | FI, | T VANG | GBG | VAG | 56 |
| | 27 | 21 | 16 | 8 | 7 | 5 | 3 | 2 | 2 | | | |
| H2-52 | S | K | N | W | R | T | Y | D,G,I,A | SKN | ARK/ITGG SKNRW | 96 | |
| | 64 | 14 | 8 | 8 | 2 | 1 | 1 | <1 | | | | |
| H2-53 | Y | G | S | Q | W | F | E | H,N,P,D,T,A YGS | RGC/TAT GSY | | | 70 |
| | 29 | 26 | 15 | 12 | 6 | 2 | 2 | 1 | | | | |
| H2-54 | D | S | N | G | T | H,E,R,A,B,K,Y,C | | SD | RRC | SDNG | 98 | |
| | 56 | 34 | 7 | 2 | 1 | <1 | | | | | | |
| H2-56 | S | G | T | N | D | R,Y,I,A,H,E,V,K,L,F,B,Q | | SG | RGC | SG | 85 | |
| | 53 | 32 | 7 | 3 | 1 | <1 | | | | | | |
| H2-58 | T | K | I | R | E | A,N,V,M,L,Q,S,G, | | TKI | AHA | KTI | 99 | |
| | 99 | 1 | <1 | | | | | | | | | |

Modelo 5-51
Posición Prevalente de aminoácidos en IgGs derivado de la línea germinal subfamilia(%) Design Codon Encoded Coverage (. Aminoácidos de 5-51 subfamilias de la línea germinal son mostrados en negrita roja .)

| | | | | | | | | | | | |
|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|-----------|
| H1-31 | S | N | T | D | G | I | R | SNT | AVC | SNT | 94 |
| | 66 | 17 | 11 | 2 | 2 | 1 | 1 | | | | |
| H1-35 | G | S | A | N | D | T | F | GS | RGT | GS | 84 |
| | 65 | 19 | 10 | 3 | 1 | 1 | 1 | | | | |
| H2-50 | I | R | V | M | F | K | S | IR | ATT | I | 91 |
| | 69 | 21 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | | CGT | R | |
| H2-52 | Y | D | F | G | N | H | | YD | KAT | YD | 91 |
| | 71 | 20 | 4 | 3 | 1 | 1 | | | | | |

(continua)

Modelo 5-51

Posición Prevalente de aminoácidos en IgGs derivado de la línea germinal subfamilia 3-23 (%) Design Codon Encoded Coverage (Aminoácidos de 5-51 subfamilias de la línea germinal son mostrados en **negrita roja**.)

| | G | S | Y | D | A | G | RGT | GS | 94 |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|-----------|-----------|
| H2-54 | 69 | 25 | 3 | 2 | 1 | | | | |
| H2-57 | D | Y | E | N | S | DY | KAT | DY | 91 |
| H2-R59 | R | N | T | K | S | RN | CGT | R | 94 |
| | 72 | 22 | 2 | 2 | 1 | AAT | | N | |

Modelo 1-69

Posición Prevalente de aminoácidos en IgGs derivado de la línea germinal subfamilia 3-23 (%) Design Codon Encoded Coverage (Aminoácidos de 1-69 subfamilias de la línea germinal son mostrados en **negrita roja**.)

| | A | G | T | S | V | Y | P | F | AG | GST | AG | 87 |
|-------|----------|----------|----------|----------|--------------------|------------------|----------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| H1-33 | 57 | 30 | 5 | 3 | 2 | 2 | 1 | <1 | | | | |
| H2-50 | G | W | R | V | L | A | D,T,N,K | | GW | KGG | GW | 89 |
| | 66 | 23 | 7 | 1 | 1 | 1 | <1 | | | | | |
| H2-52 | I | S | T | V | M | N | D | K | IS | ART | IS | 89 |
| | 68 | 22 | 5 | 2 | 1 | 1 | 1 | <1 | | | | |
| H2-53 | P | A | V | T | G | N,IS, | D | | PA | SCG | PA | 93 |
| | 77 | 16 | 2 | 2 | 1 | <1 | | | | | | |
| H2-54 | I | Y | M | L | F | V | TES | K | IY | ATC | I | 83 |
| | 61 | 22 | 4 | 3 | 3 | 3 | 1 | <1 | | | | |
| H2-55 | F | N | L | D | S,K,Y,A,T,V | | | | FN | TTT | F | 91 |
| | 69 | 22 | 5 | 2 | <1 | | | | | | | |
| H2-57 | T | N | I | K | D | S | E | RP | TN | AMT | TN | 87 |
| | 65 | 20 | 5 | 2 | 2 | 2 | 1 | <1 | | | | |
| H2-58 | A | T | P | G | V | S,R,K,Q,I | | | AT | RCT | AT | 92 |
| | 65 | 26 | 4 | 2 | 1 | <1 | | | | | | |

Modelo 3-53

Posición Prevalente de aminoácidos en IgGs derivado de la línea germinal subfamilia 3-23 (%) Design Codon Encoded Coverage (Aminoácidos de 3-53 subfamilias de la línea germinal son mostrados en **negrita roja**.)

| | N | Y | S | D | K | V | NY | WAC | NY | 92 |
|-------|----|----|---|---|---|---|----|-----|----|----|
| H1-32 | 51 | 39 | 5 | 2 | 2 | 1 | | | | |

(continua)

Modelo 3-53

Posición Prevalente de aminoácidos en IgGs derivado de la línea germinal subfamilia 3-23 (%) Design Codon E nooded Coverage (Aminoácidos de 3-53) subfamilias
 . . . de la línea germinal son mostrados en **negrita roja** .)

| | Y | A | N | H | F | C | YD | KA | C | YD | 92 |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------------|-----------|-----------|----|
| H1-33 | 50 | 42 | 2 | 2 | 1 | 1 | | | | | |
| H2-50 | V | A | I | G | T | L | VA | GYT | VA | VA | 85 |
| | 48 | 38 | 7 | 3 | 2 | 2 | | | | | |
| H2-52 | Y | A | F | H | D | R | YG | TAC/GGC | YG | YG | 92 |
| | 53 | 39 | 2 | 2 | 1 | 1 | | | | | |
| H2-S53 | S | T | N | P | R | Y | ST | TMC | ST | ST | 86 |
| | 50 | 36 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | | | | |
| H2-54 | G | D | T | V | C | S | GA | GST | GA | GA | 82 |
| | 49 | 33 | 6 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | | |
| H2-56 | D | T | G | E | R | A | DS | TCC/GAC | SD | SD | 82 |
| | 42 | 40 | 7 | 5 | 2 | 2 | 1 | | | | |

bold: appeared in germline sequences of the same family

italic: nucleotides

Tabla 2. Diseño de CDR de la cadena ligera.

| posición | 012 | L6 | posición | A27 | posición | B3 |
|------------|-----------------------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|---------------------|
| 30 | SRNAD | RNAD | 0 | SRNTD | | |
| 31 | NSKD | SKD | 1 | NSR | 1 | SYHFA |
| | | | 1a | SRNADH | 1e | KTNE |
| 32 | YWDFHSNA | WDFHSNA | 2 | YFHQSEK | 2 | YWDFHSNA |
| 50 | ADGKYFTN | DGKYFTN | 0 | ADGS | 0 | ADWSRY |
| 91 | YSHA | SGFR | 1 | YSHA | 1 | YSHA |
| 92 | YNDSHIFK | SNHLR | 2 | YNDSHIFK | 2 | YNDSHIFK |
| 93 | SNTDGHR | NTDGHR | 3 | SNTDGHR | 3 | SNTDGHR |
| 94 | TYLVFAS | WA | 94 | TYLVFAS | 94 | TYLVFAS |
| 96 | WYFLIR | WYFLIR | 96 | WYFLIR | 96 | WYFLIR |
| Diversidad | 1.2 x 10 ⁷ | 1.5 X 10 ⁶ | | 2.4 X 10 ⁷ | | 9 X 10 ⁶ |

Lambda

| Posición | 1e | Posición | 1b | Posición | 2a2 | Posición | 3L |
|------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| 31b | GATND | 31a | NS | 31a | GS | 29 | STNR |
| 32 | DG | 32 | YTA | 31c | ND | | |
| 34 | HN | 34 | SN | 32 | YLR | 33 | SN |
| 50 | GSAD | 50 | DESR | 50 | ED | | |
| 51 | SN | 51 | ND | 53 | NK | 52 | NS |
| 53 | NHY | 52 | ND | | | | |
| | | 53 | KQ | | | | |
| | | 89 | GA | | | | |
| | | 90 | TA | 92 | TA | | |
| 93 | SNRTI | 93 | SD | 93 | SG | 93 | SNTG |
| 94 | SNRTI | | | | SN | 94 | SGT |
| 95a | SHN | 95a | SN | 95a | TN | 95a | ND |
| 95b | GAV | 95b | AG | 95b | FLSPYHVAE | | |
| 95c | SHPL | 95c | DHSGAFNL | | | | |
| 96 | DESIGNADO | 96 | DESIGNADO | 96 | DESIGNADO | 96 | DESIGNADO |
| Diversidad | 9.20E+06 | | 2.30E+06 | | 1.50E+05 | | 4.00E+04 |

Tabla 6. Resumen de los resultados de inmunopurificación de BSA y Lysozyme

| | Total screened | Bind to Ag |
|-----------------------------|----------------|------------|
| BSA | | |
| sub-piscina: individual 4Lc | 90 | 30 (33%) |
| BSA | | |
| Piscina completa | 180 | 12 (7%) |
| | | |
| Lisozima | | |
| Piscina completa | 180 | 7 (4%) |

Tabla 7: Actividad de Fab purificado y su K_D aparente de unión a BSA (40 UR)

| Fab | k _a x 10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹ | k _d x 10 ⁻³ s ⁻¹ | K _D (nM) | R _{max} (RU) |
|---------------|--|---|---------------------|-----------------------|
| C2 | 0.60 (3) | 1.69 (1) | 28 | 4* |
| C6 | - | - | NB | NB |
| D6 | 5.72 | 1.95 (1) | 4 | 40 |
| D11 | 56.16 (2) | 0.53 (1) | 0.09 | 44 |
| F4 | 0.51 (2) | 0.48 (1) | 9 | 10* |
| F6 | 4.3 (1) | 11.3 (1) | 26 | 43 |
| NB: sin unión | | | | |

Tabla 8: Actividad de Fab purificado y su K_D aparente de unión a Lysozyme (10 UR)

| Fab | $k_a \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ | K_D (nM) | R_{max} (RU) |
|-----|---|-------------------------------------|------------|-----------------------|
| E5 | 2.27 (1) | 2.33 (1) | 10 | 51 |
| E7 | 4.6 (1) | 120 (2) | 260 | 50 |
| E8 | 4.24 (2) | 2.49 (1) | 6 | 50.5 |

Tabla 13A

| Rastro ID | k_d | Error k_d | k_a | K_D | Assoc R^2 |
|-----------|----------|-------------|----------|----------|-------------|
| | [1/s] | | [1/Ms] | [M] | |
| 16 | 2.65E-04 | 9.36E-06 | 9.03E+04 | 2.93E-09 | 0.96962 |
| 26 | 1.86E-04 | 1.27E-05 | 1.02E+05 | 1.83E-09 | 0.95989 |
| 28 | 1.86E-04 | 1.65E-05 | 5.08E+04 | 3.67E-09 | 0.98932 |
| 1 | 3.12E-04 | 4.12E-05 | 1.08E+04 | 2.90E-08 | 0.96172 |
| 38 | 2.15E-04 | 2.55E-05 | 1.46E+04 | 1.47E-08 | 0.97907 |

Tabla 13B

| Rastro ID | k_d | Error k_d | k_a | K_D | Assoc R^2 |
|-----------|----------|----------------|----------|----------|-------------|
| | [1/s] | | [1/Ms] | [M] | |
| 169-3 | 5.69E-03 | 5.24E-04 | 5.37E+05 | 1.06E-08 | 0.61771 |
| 169-7 | 8.47E-04 | 3.47E-05 | 1.93E+05 | 4.39E-09 | 0.77696 |
| | [1/s] | Error in k_d | [1/Ms] | [M] | Assoc R^2 |
| 323-11 | 4.47E-04 | 2.37E-05 | 2.99E+05 | 1.50E-09 | 0.79693 |
| 323-32 | 9.89E-04 | 2.69E-05 | 3.07E+05 | 3.22E-09 | 0.80572 |
| 551-7 | 1.16E-03 | 3.23E-05 | 6.97E+05 | 1.67E-09 | 0.69629 |
| 551-22 | 5.39E-03 | 4.48E-04 | 8.79E+05 | 6.13E-09 | 0.66241 |
| 551-38 | 6.29E-03 | 7.70E-04 | 1.59E+05 | 3.97E-08 | 0.45525 |

Tabla 13C

| Rastro ID | k_d | Error k_d | k_a | K_D | Assoc R^2 |
|-----------|----------|-------------|----------|----------|-------------|
| | [1/s] | | [1/Ms] | [M] | |
| P1 | 6.63E-03 | 4.65E-04 | 2.40E+04 | 2.77E-07 | 0.73206 |
| P9 | 3.31E-03 | 1.19E-03 | 2.18E+04 | 1.51E-07 | 0.6118 |
| P12 | 5.76E-03 | 7.73E-04 | 1.93E+04 | 2.98E-07 | 0.57348 |
| P20 | 9.54E-03 | 6.49E-04 | 2.21E+04 | 4.32E-07 | 0.53367 |
| S1 | 5.60E-03 | 6.81E-04 | 2.07E+04 | 2.71E-07 | 0.58443 |
| S14 | 1.01E-02 | 1.16E-03 | 6.03E+03 | 1.68E-06 | 0.43719 |
| S30 | 7.66E-03 | 8.22E-04 | 1.13E+04 | 6.77E-07 | 0.52738 |

La Tabla 13A-C muestra los datos cinéticos en formato de disolución de Octet. A) Fab, Fab 26, Fab 28, Fab 1, Fab 38 que se unen a ST2L de 100 kDa se clasificaron usando Octet por las constantes de la velocidad de asociación y disociación. B) Fab 169-3, Fab 169-7, Fab 323-11, Fab 323-32, Fab 551-7, Fab 551-22 y Fab 551-38 que se unen a resistina de 66 kDa se clasificaron usando Octet por las constantes de la velocidad de asociación y disociación. C) Fab P1, Fab P9, Fab P12, Fab P20, Fab S1, Fab S14 y Fab S30 que se unen a MCP-5 de 9 kDa se clasificaron usando Octet por las constantes de la velocidad de asociación y disociación.

5

Tabla 14:

| Rastro ID | k_d [1/s] | Error k_d | k_a [1/Ms] | K_D [M] | Assoc R ² |
|-----------|-------------|-------------|--------------|-----------|----------------------|
| P1 | 1.87E-03 | 4.27E-05 | 6.78E+04 | 2.76E-08 | .95439 |
| P9 | 2.69E-03 | 7.78E-05 | 3.88E+04 | 6.93E-08 | .97197 |
| P12 | 6.97E-03 | 1.29E-04 | 1.08E+05 | 6.46E-08 | .85772 |
| P20 | 5.97E-03 | 1.04E-04 | 2.39E+05 | 2.50E-08 | .86825 |
| neg Fab | 6.70E-03 | 2.49E-03 | -2.38E4* | -- | .85597 |
| no Fab | 3.66E-3* | 2.33E-03 | - | -- | .07006 |

5 Tabla 14: Datos cinéticos en formato inmovilizado de Octet. Fab P1, Fab P9, Fab P12, Fab P20, Fab S1, Fab S14 y Fab S30 que se unen a MCP-5 de 9 kDa se clasificaron usando Octet por las constantes de la velocidad de asociación y disociación.

Tabla 15A: mST2L

| Biacore | | SA muestra de Bt-Ag | | | Octeto solución | | |
|-------------|--------------------------------|-----------------------------|------------|--------------------------------|-----------------------------|------------|--|
| Ejemplo Fab | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-4} s^{-1}$ | K_D (nM) | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-4} s^{-1}$ | K_D (nM) | |
| 16 | 2.41 | 7.2 | 3 | 0.903 | 2.65 | 2.9 | |
| 26 | 1.469 | 6.31 | 4.3 | 1.02 | 1.86 | 1.8 | |
| Ejemplo Fab | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-4} s^{-1}$ | K_D (nM) | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-4} s^{-1}$ | K_D (nM) | |
| 28 | 2.12 | 0.6 | 0.31 | 0.508 | 1.86 | 3.6 | |

Tabla 15B: Resistina

| Biacore | | solución | | | Octeto solución | | |
|-------------|--------------------------------|-----------------------------|------------|--------------------------------|-----------------------------|------------|--|
| Ejemplo Fab | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3} s^{-1}$ | K_D (nM) | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-4} s^{-1}$ | K_D (nM) | |
| 169-3 | 8.06 | 2.07 | 2.5 | 5.37 | 56.9 | 0.6 | |
| 169-7 | 1.39 | 0.41 | 2.8 | 1.93 | 8.47 | .3 | |
| 323-11 | 11.4 | 0.6 | 0.5 | 2.99 | 4.47 | .5 | |
| 323-32 | 5.4 | 0.4 | 0.7 | 3.07 | 3.89 | .2 | |
| 551-7 | 12.8 | 0.99 | 0.8 | 6.97 | 11.6 | .6 | |
| 551-22 | 34.8 | 0.6 | 0.2 | 8.79 | 53.9 | .1 | |
| 551-38 | 14.8 | 2.33 | 1.6 | 1.59 | 62.9 | 9.7 | |

Tabla 15C: mMCP-5

| Biacore | | Inmovilizado | | | Octeto Inmovilizado | | |
|------------|--------------------------------|-----------------------------|------------|--------------------------------|-----------------------------|------------|--|
| Fab sample | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3} s^{-1}$ | K_D (nM) | $k_a \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3} s^{-1}$ | K_D (nM) | |
| P1 | 7.7 | 2.009 | 2.6 | 0.67 | 1.87 | 27.6 | |
| P9 | 20.7 | 0.42 | 0.2 | 0.38 | 2.69 | 69.3 | |
| P12 | 74.7 | 2.81 | 0.38 | 1.08 | 6.79 | 64.6 | |
| P20 | 11.28 | 0.62 | 0.55 | 2.39 | 5.97 | 25 | |
| S1 | 28.2 | 1.71 | 0.6 | 0.39 | 1.63 | 41.3 | |
| S10 | 25 | 15.0 | 0.6 | 1.86 | 3.92 | 21.1 | |
| S14 | 4.8 | 4 | 8 | 6.97 | 19.6 | 28.1 | |
| S30 | 93 | 13 | 1.4 | 3.65 | 16.8 | 46.1 | |

10

Tabla 15A-C: Diagramas de comparación de las constantes de velocidad cinética entre Biacore y Octet. Diagramas de arriba a abajo grupos de Fab mST2L, resistina y mMCP-5.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de fago de ácido nucleico recombinante manipulado por ingeniería para expresar secuencias de aminoácidos de fragmentos fab de anticuerpos de fusión con pIX de presentación en fago que se unen a ligandos biológicamente activos seleccionados, que comprende
- (i) a. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el conductor de fago recombinante; operativamente enlazada a:
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica marca recombinante, promotor o de selección; operativamente enlazada a:
- c. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la línea germinal de la cadena pesada variable que se une selectivamente a dicho ligando biológicamente activo; operativamente enlazada a:
- d. una porción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la línea germinal de la cadena pesada constante que se une selectivamente a dicho ligando biológicamente activo; operativamente enlazada a:
- e. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica conector peptídico; operativamente enlazada a:
- f. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica pIX recombinante; y
- (ii) a. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la línea germinal de la cadena ligera variable que se une selectivamente a dicho ligando biológicamente activo; operativamente enlazada a:
- b. una porción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la línea germinal de la cadena ligera constante que se une selectivamente a dicho ligando biológicamente activo.
2. Un vector de fago de ácido nucleico manipulado por ingeniería según la reivindicación 1;
- i) en el que dicha secuencia codificante de conductor de fago es una secuencia pelB,
- ii) en el que la secuencia de marca recombinante o de selección es una secuencia de marca FLAG,
- iii) en el que dicho promotor es un promotor inducible,
- iv) en el que dicho promotor inducible es un promotor lac, y/ o
- v) en el que dichos ligandos biológicamente activos median en al menos una actividad biológica *in vivo*.
3. Una célula huésped bacteriana que comprende un vector de fago de ácido nucleico manipulado por ingeniería según la reivindicación 1.
4. Una biblioteca de fagos de células huésped bacterianas que comprende una pluralidad de vectores de fago de ácido nucleico manipulados por ingeniería según la reivindicación 1.
5. Una biblioteca de fagos según la reivindicación 4, en la que la variante de fragmento de anticuerpo fab biológicamente activa se expresa como una pluralidad de fragmentos de anticuerpos fab.
6. Una biblioteca de fagos según la reivindicación 5, en la que dicha pluralidad es al menos una seleccionada de al menos 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o 10^{13} de dichas variantes.
7. Una biblioteca de fagos según la reivindicación 5, en la que dichas variantes se generan usando un método de mutagénesis de Kunkel.
8. Una biblioteca de fagos según la reivindicación 5, en la que dichas variantes comprenden una pluralidad de diversas variantes de la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de cadena pesada comprendidas en dichos fragmentos de anticuerpos fab, en la que opcionalmente dichas diversas variantes de CDR3 comprenden aproximadamente 10^9 a 10^{18} variaciones de secuencia.
9. Una biblioteca de fagos según la reivindicación 5, en la que dichas variantes comprenden una pluralidad de diversas variantes de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 y 2 de cadena pesada comprendidas en dichos fragmentos de anticuerpos fab, en la que opcionalmente dichas diversas variantes CDR1 y 2 comprenden aproximadamente 10^2 a 10^5 variaciones de secuencia.
10. Una biblioteca de fagos según la reivindicación 5, en la que dicha biblioteca de fagos comprende adicionalmente fragmentos de anticuerpos fab madurados por afinidad que tienen afinidad de unión mejorada con respecto a versiones previas de dicha biblioteca de fagos.
11. Una biblioteca de fagos según la reivindicación 10, en la que dichos fragmentos de anticuerpos fab se inmunopurifican para aumentar la afinidad o actividad biológica.
12. Una biblioteca de fagos según la reivindicación 11, en la que dicha inmunopurificación se realiza como parte del proceso de generación de bibliotecas o en paralelo usando un subconjunto de dicha biblioteca de fagos.

13. Un método de cribado de una biblioteca de fragmentos de anticuerpos en fago para fragmentos de anticuerpos Fab que tienen una actividad biológica deseada, que comprende (a) expresar fragmentos de anticuerpos Fab de una biblioteca de fagos según la reivindicación 9, y (b) seleccionar células bacterianas que expresan dichos fragmentos de anticuerpos Fab que tienen dicha actividad biológica deseada.

VH:H3-23

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYLEIWGQGTLVTVSSAST

VH:H1-69

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFGQGRVTIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARQLWGYYLEIWGQGTLVTVSSAST

VH:H5-51

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYNIQWVRQMPGKGLEMMGIIYPGDSDRYSFQGVQVTTIS
ADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQLWGYYLEIWGQGTLVTVSSAST

VH:3-53

VQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYLEIWGQGTLVTVSSAST

VL:Lk012

DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLHWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK

VL:Lk-A27

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSPATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSTPLTFGQGTKVEIK

VL:Lk-L6

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDF
TLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK

VL:Lk-B3

QADIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFS
GSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK

FIGURA 1

FIG. 2

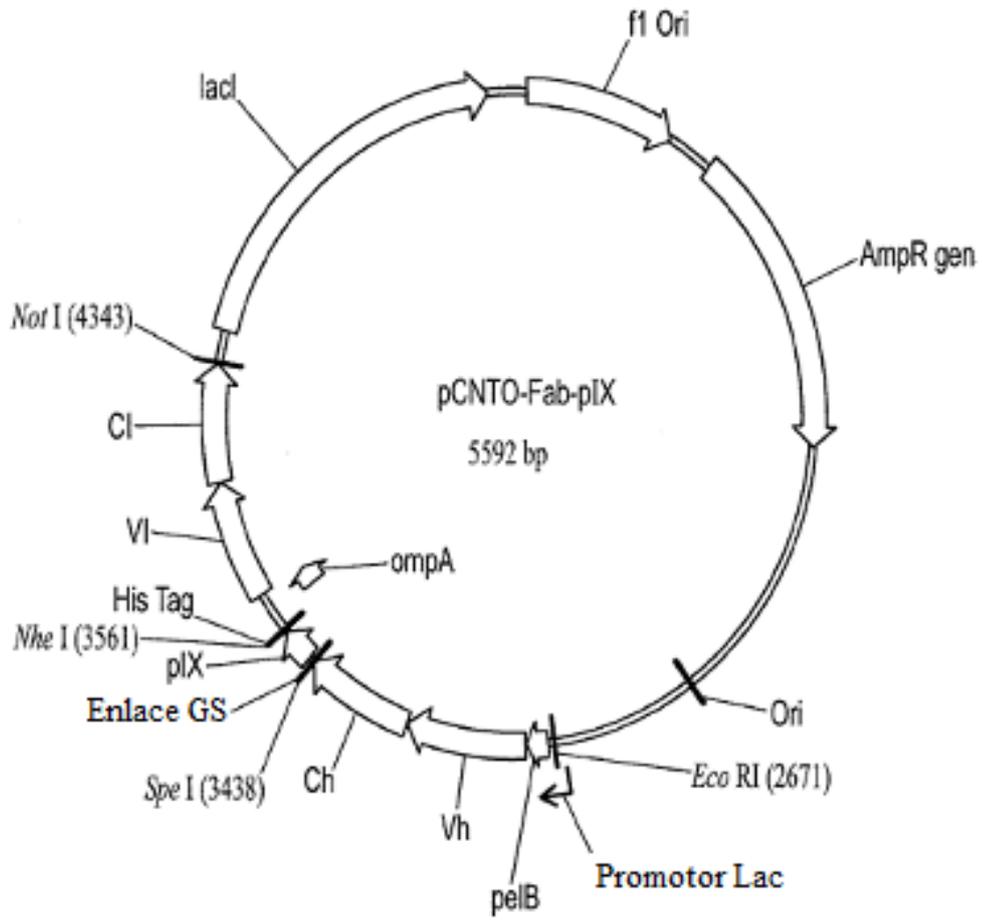


FIG. 3A

Detección de cada estructura Hc y Lc con fagopIX

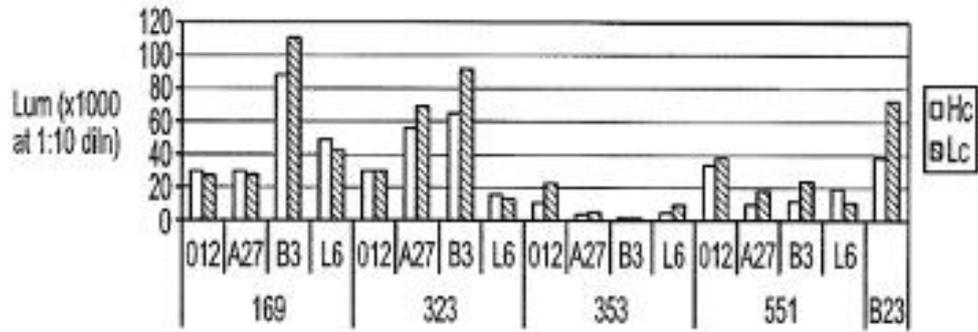


FIG. 3B

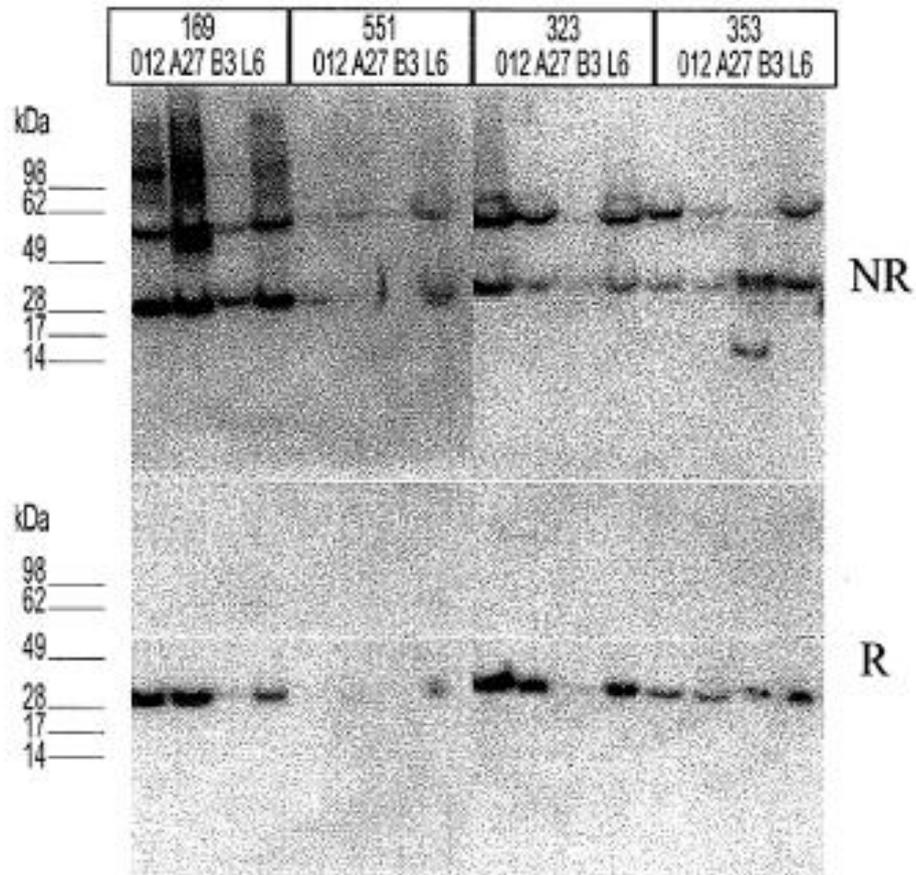


FIGURA 3C

Niveles de Expresión de andamiaje

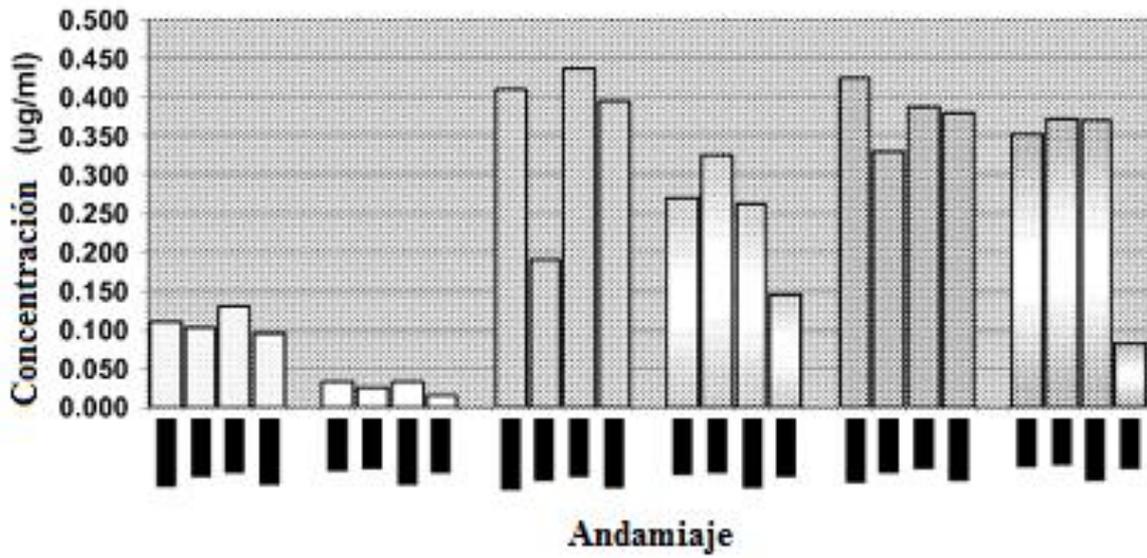


FIG. 4

H-CDR3 patrón designado.

H-CDR3
95- (D) (N)_n(N+Y)_m(F)DY -101

El patrón H-CDR3 esta subrayado. Los aminoácidos variables están mostrados con "()"

Where:

- (D) = La Asp (d) y Gly (G) posición fertil.
- (N)_n = Ala (A) and Gly (G) posición fertil n=3-7.
- (Y)_m = Igual que (N) excepto también fertil en Y (Tyr). m= 1-4.
- (F) = La Phe (F) posición dominante

FIG. 5

| H-CDR3 length | 95 | 95a | 95b | 95c | 95d | 95e | 95f | 95g | 96 | 97 | 98 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 7 | nns | - | - | - | - | - | - | - | nns | nns | nns |
| 8 | nns | nns | - | - | - | - | - | - | nns | nns | nns |
| 9 | D | N | N | - | - | - | - | - | N | N | N |
| 10 | D | N | N | N | - | - | - | - | N | N | N |
| 11 | D | N | N | N | N | - | - | - | N | N | N+Y |
| 12 | D | N | N | N | N | N+Y | - | - | N+Y | N+Y | N+Y |
| 13 | D | N | N | N | N | N | N | - | N+Y | N+Y | N+Y |
| 14 | D | N | N | N | N | N | N | N | N | N+Y | N+Y |

Oligoelementos en la posición D:

1: [ACGT]= [15-15-68-2]

2: [ACGT]= [43-11-33-13]

3: [ACGT]= [2-29-24-45]

Oligoelementos en la posición N:

1: [ACGT]= [19-14-41-26]

2: [ACGT]= [28-25-33-14]

3: [ACGT]= [0-34-36-30]

nns son garantizadores IUB

FIG. 6A

distribución aa en la posición 393 D

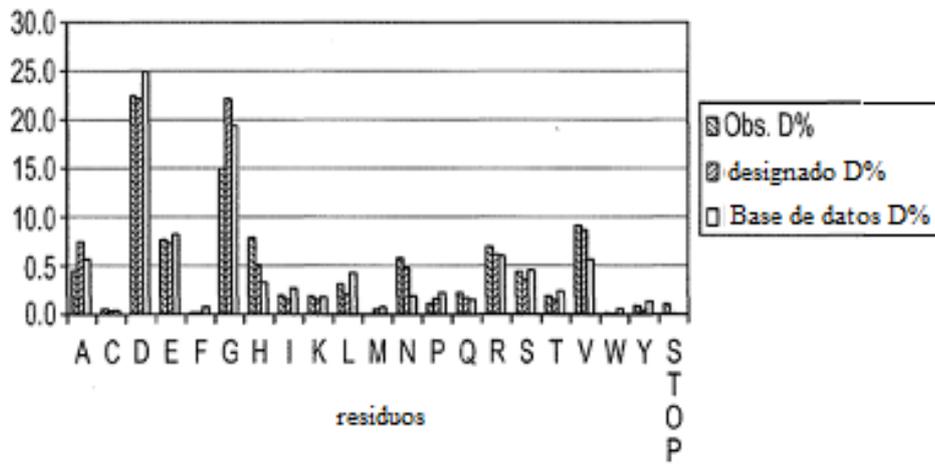


FIG. 6B

distribución AA en la posición 2163 N

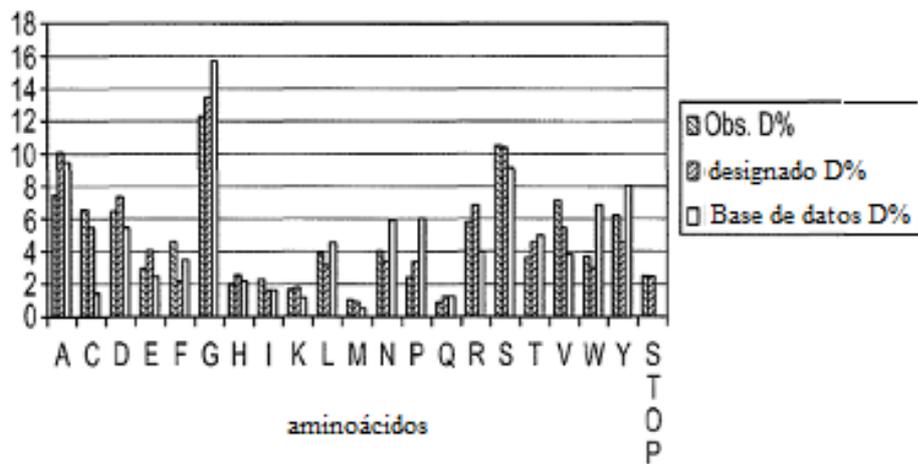


FIG. 6C

distribución AA en la posición 973 Y

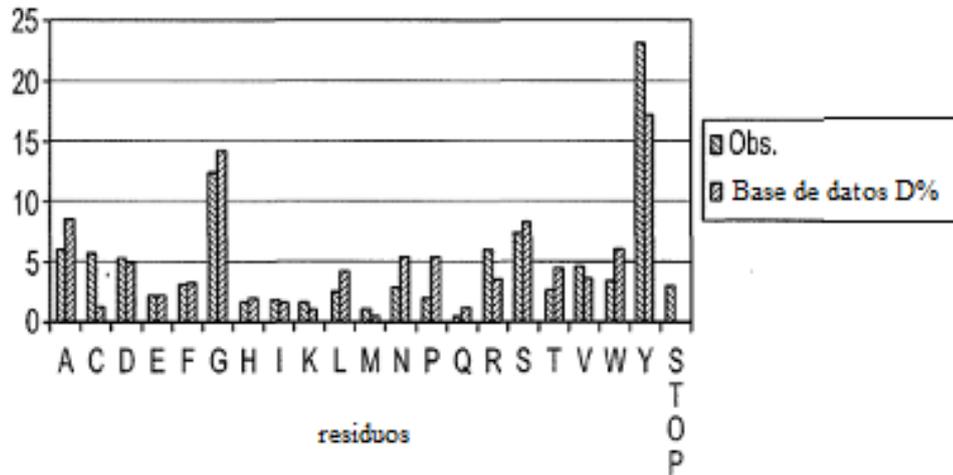


FIG. 6D

distribución AA de garantizadores NNS

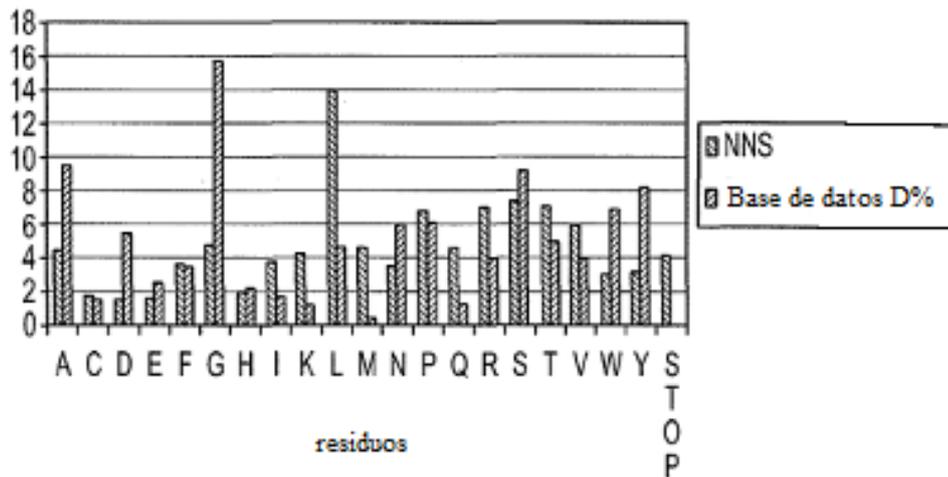
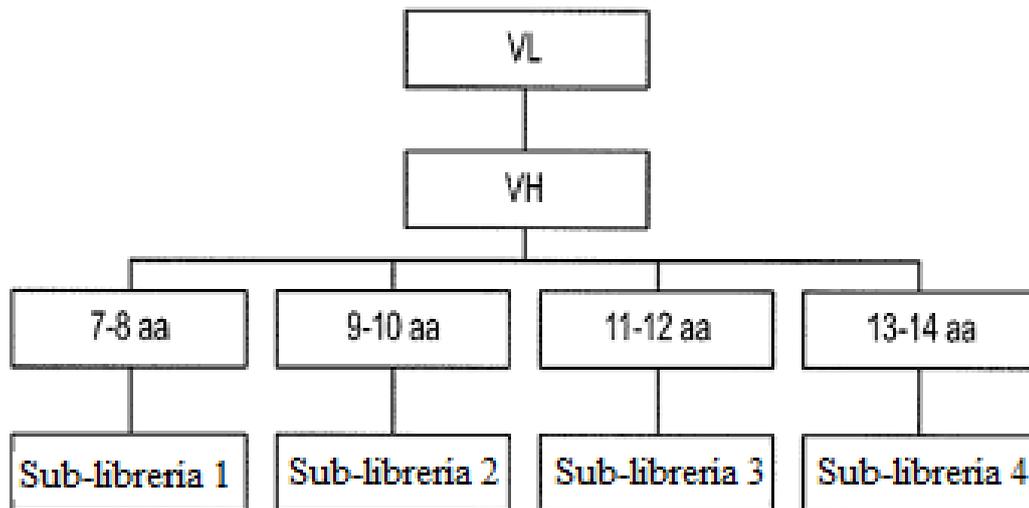


FIG. 7

Organización de librería V2
(Uno los 16 grupos de las Fabs)



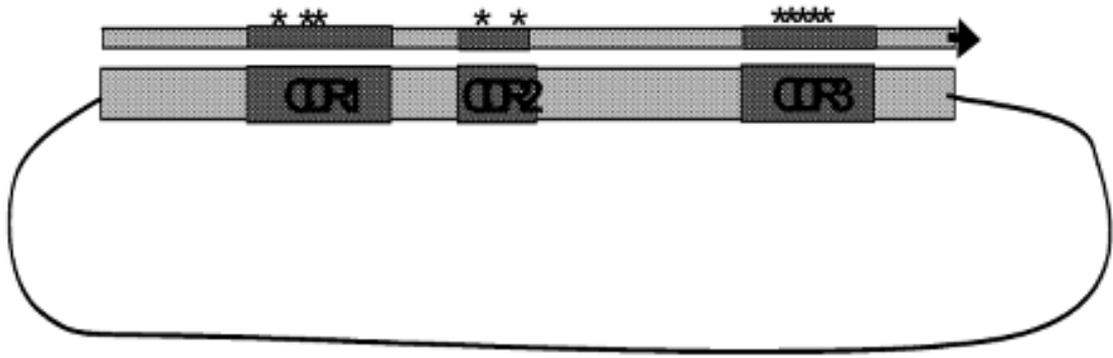
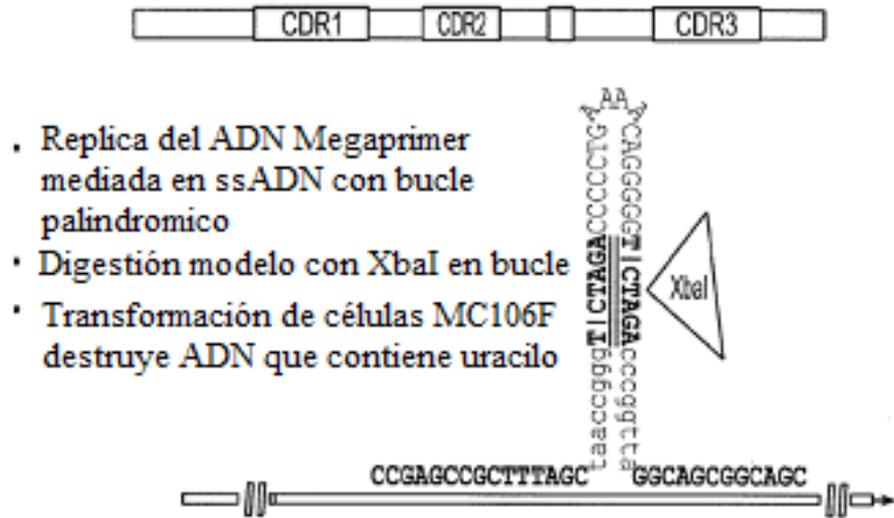


FIGURA 8

FIG. 9



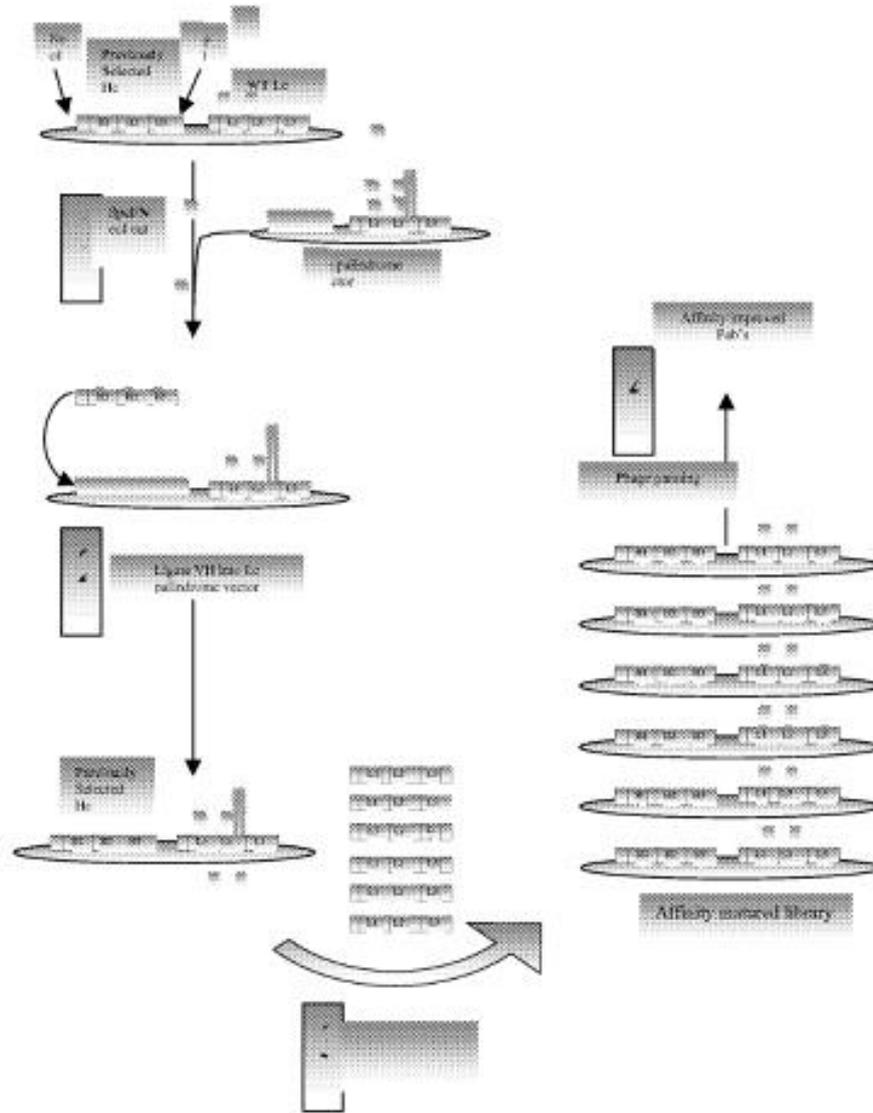


FIGURA 10