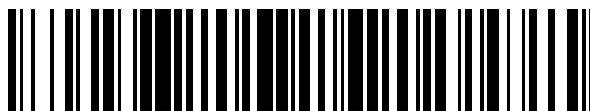


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 292**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2006 E 06837138 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1957531**

54 Título: **Polipéptidos de unión con secuencias hipervariables de VH/VL diversificadas y consenso**

30 Prioridad:

07.11.2005 US 734092 P
05.07.2006 US 806602 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2016

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

DENNIS, MARK;
LIANG, WEI-CHING y
WU, YAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 577 292 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de unión con secuencias hipervariables de VH/VL diversificadas y consenso.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a regiones hipervariables variantes de inmunoglobulinas que se diversifican selectivamente o que comprenden secuencias consenso humanas, y bibliotecas que comprenden una pluralidad de dichas secuencias de inmunoglobulina. La invención también se refiere a polipéptidos de fusión que comprenden estas regiones hipervariables variantes. La invención también se refiere a métodos y a composiciones útiles para identificar nuevos polipéptidos de unión que puedan usarse de forma terapéutica o como reactivos.

Antecedentes

15 La tecnología de presentación en fagos ha proporcionado una herramienta potente para generar y seleccionar nuevas proteínas que se unen con un ligando, tal como un antígeno. El uso de las técnicas de presentación en fagos permite la generación de grandes bibliotecas de variantes proteicas que pueden clasificarse rápidamente con respecto a las secuencias que se unen con un antígeno diana con alta afinidad. Se fusionan ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de recubrimiento viral, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de presentación en fagos monovalentes en los que la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman y Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). En un sistema de presentación en fagos monovalente, la fusión génica se expresa a bajos niveles y las proteínas del gen III de tipo silvestre se expresan también de modo que se conserve la infecciosidad de las partículas. Se han desvelado métodos para generar bibliotecas de péptidos y explorar esas bibliotecas en muchas patentes (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.723.286, patente de Estados Unidos n.º 5.432.018, patente de Estados Unidos n.º 5.580.717, patente de Estados Unidos n.º 5.427.908 y patente de Estados Unidos n.º 5.498.530).

30 La demostración de expresión de péptidos en la superficie de fagos filamentosos y la expresión de fragmentos de anticuerpos funcionales en el periplasma de *E. coli* fue importante en el desarrollo de bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos. (Smith *et al.*, *Science* (1985), 228: 1315; Skerra y Pluckthun, *Science* (1988), 240: 1038). Se han preparado bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión a antígeno de varias maneras incluyendo alterando un único gen insertando secuencias de ADN aleatorias o clonando una familia de genes relacionados. Se han descrito métodos para presentar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno usando presentación en fagos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717 y 5.658.727. La biblioteca se explora después con respecto a expresión de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno con características deseadas.

40 La tecnología de presentación en fagos tiene varias ventajas frente a los métodos convencionales de hibridoma y recombinantes para preparar anticuerpos con las características deseadas. Esta tecnología permite el desarrollo de grandes bibliotecas de anticuerpos con secuencias diversas en menos tiempo y sin el uso de animales. La preparación de hibridomas o preparación de anticuerpos humanizados puede requerir fácilmente varios meses de preparación. Además, ya que no se requiere inmunización, pueden generarse bibliotecas de anticuerpos en fagos para antígenos que son tóxicos o tienen baja antigenicidad (Hogenboom, *Immunotechniques* (1988), 4: 1-20). También pueden usarse bibliotecas de anticuerpos en fagos para generar e identificar nuevos anticuerpos humanos.

50 Los anticuerpos se han vuelto muy útiles como agentes terapéuticos para una amplia diversidad de afecciones. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados para HER-2, un antígeno tumoral, son útiles en el diagnóstico y tratamiento de cáncer. Otros anticuerpos, tales como anticuerpo anti INF- γ , son útiles en el tratamiento de afecciones inflamatorias tales como enfermedad de Crohn. Se han usado bibliotecas de presentación en fagos para generar anticuerpos humanos a partir de secuencias de línea germinal inmunizadas, humanas no inmunizadas, o repertorios de Ig de linfocitos B no tratados previamente (Barbas y Burton, *Trends Biotech* (1996), 14: 230; Griffiths *et al.*, *EMBO J.* (1994), 13: 3245; Vaughan *et al.*, *Nat. Biotech.* (1996), 14: 309; Winter documento EP 0368 684 B1). Se han generado bibliotecas de unión a antígenos no tratados previamente, o no inmunitarios, usando diversos tejidos linfoides. Algunas de estas bibliotecas están disponibles en el mercado, tales como las desarrolladas por Cambridge Antibody Technology and Morphosys (Vaughan *et al.*, *Nature Biotech* 14: 309 (1996); Knappik *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296: 57 (1999)). Sin embargo, muchas de estas bibliotecas tienen diversidad limitada.

60 La capacidad de identificar y aislar anticuerpos de alta afinidad a partir de una biblioteca de presentación en fagos es importante para aislar anticuerpos humanos nuevos para uso terapéutico. Se cree tradicionalmente que el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad a partir de una biblioteca depende, al menos en parte, del tamaño de la biblioteca, la eficacia de producción en células bacterianas y la diversidad de la biblioteca. Véase, por ejemplo, Knappik *et al.*, *J. Mol. Biol.* (1999), 296: 57. El tamaño de la biblioteca se reduce por la ineficacia de producción debido a plegamiento inapropiado del anticuerpo o proteína de unión a antígeno y la presencia de codones de terminación. La expresión en células bacterianas puede inhibirse si el anticuerpo o el dominio de unión a antígeno no

está plegado de forma apropiada. La expresión puede mejorarse mutando restos en turnos en la superficie de la interfaz variable/constante, o en restos de CDR seleccionados. (Deng *et al.*, J. Biol. Chem. (1994), 269: 9533, Ulrich *et al.*, PNAS (1995), 92: 11907-11911; Forsberg *et al.*, J. Biol. Chem. (1997), 272: 12430). La secuencia de la región marco conservada es un factor para proporcionar plegamiento apropiado cuando se produzcan bibliotecas de anticuerpos en fagos en células bacterianas.

La generación de una biblioteca diversa de anticuerpos o proteínas de unión un antígeno también es importante para el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad. Se han generado bibliotecas con diversificación de CDR limitadas usando diversos enfoques. Véase, por ejemplo, Tomlinson, Nature Biotech. (2000), 18: 989-994. Las regiones CDR-H3 son de interés en parte porque se encuentra con frecuencia que participan en unión a antígeno. Las regiones CDR-H3 en la cadena pesada varían en gran medida en su tamaño, secuencia y conformación estructural.

Otros han generado también diversidad seleccionando aleatoriamente regiones CDR de las cadenas pesadas y ligeras variables usando los 20 aminoácidos en cada posición. Se creía que el uso de los 20 aminoácidos daría como resultado una gran diversidad de secuencias de anticuerpos variantes y aumentaría la probabilidad de identificar anticuerpos nuevos. (Barbas, PNAS 91: 3809 (1994); Yelton, DE, J. Immunology, 155: 1994 (1995); Jackson, J.R., J. Immunology, 154: 3310 (1995) y Hawkins, RE, J. Mol. Biology, 226: 889 (1992)).

También ha habido intentos de crear diversidad restringiendo el grupo de sustituciones de aminoácidos en algunas CDR para reflejar la distribución de aminoácidos en anticuerpos de origen natural. Véase, Garrard y Henner, Gene (1993), 128: 103; Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. (1999), 296: 57. Sin embargo, estos intentos han tenido éxitos diversos y no se han aplicado de una manera sistemática y cuantitativa. La creación de diversidad de las regiones CDR minimizando al mismo tiempo el número de cambios de aminoácidos ha sido un reto. Además, en algunos casos, una vez que se ha generado una primera biblioteca de acuerdo con un conjunto de criterios, puede ser deseable potenciar adicionalmente la diversidad de la primera biblioteca. Sin embargo, esto requiere que la primera biblioteca tenga suficiente diversidad y permanezca aún con un tamaño suficientemente pequeño de modo que puede introducirse diversidad adicional sin exceder sustancialmente las limitaciones de la práctica tales como el rendimiento, etc.

Algunos grupos han presentado análisis teóricos y experimentales del número mínimo de repertorio de aminoácidos que es necesario para generar proteínas. Sin embargo, estos análisis han tenido un alcance y una naturaleza en general limitados, y sigue existiendo escepticismo y dudas sustanciales con respecto a la viabilidad de generar polipéptidos que tengan funciones complejas usando un conjunto restringido de tipos de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Riddle *et al.*, Nat. Struct. Biol. (1997), 4(10):805-809; Shang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), 91: 8373-8377; Heinz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), 89: 3751-3755; Regan y Degrado, Science (1988), 241: 976-978; Kamteker *et al.*, Science (1993), 262: 1680-1685; Wang y Wang, Nat. Struct. Biol. (1999), 6 (11): 1033-1038; Xiong *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995), 92: 6349-6353; Heinz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), 89: 3751-3755; Cannata *et al.*, Bioinformatics (2002), 18 (8): 1102-1108; Davidson *et al.*, Nat. Struct. Biol. (1995), 2 (10): 856-863; Murphy *et al.*, Prot. Eng. (2000), 13 (3): 149-152; Brown y Sauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96: 1983-1988; Akanuma *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (2002), 99 (21): 13549-13553; Chan, Nat. Struct. Biol. (1999), 6 (11): 994-996.

Más recientemente, se han generado bibliotecas útiles con diversidades significativamente mejoradas. Véase, por ejemplo, Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2000), 340: 1073-1093. Resulta interesante que bibliotecas resultantes de mutación de posiciones de CDR seleccionadas con dos o cuatro aminoácidos solamente también han mostrado características interesantes y útiles. Fellouse *et al.*, J Mol. Biol. (2005); 348 (5): 1153-62; Fellouse *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2004), 101 (34): 12467-72.

También se ha hecho evidente que existe la necesidad de más bibliotecas que abarquen un mayor y diferente espacio de diversidad de secuencias en comparación con las bibliotecas disponibles en la actualidad. La invención descrita en el presente documento cumple esta necesidad y proporciona otros beneficios.

Divulgación de la invención

La presente invención es como se expone en las reivindicaciones. Se describen en el presente documento métodos eficaces y selectivos para generar polipéptidos que comprenden HVR variantes que comprenden una combinación de secuencias con diversidad seleccionada y secuencias consenso, en los que los polipéptidos de inmunoglobulina que comprenden dichas HVR variantes muestran capacidad de unión a antígeno diana. A diferencia de métodos convencionales que se basan en la propuesta de que la diversidad adecuada de agentes de unión diana puede generarse solamente si se diversifican una o unas HVR/CDR particulares, o todas las HVR/CDR, y a diferencia de las nociones convencionales de que la diversidad adecuada depende del mayor intervalo de sustituciones de aminoácidos (generalmente por sustitución usando todos o la mayoría de los 20 aminoácidos), la invención proporciona métodos capaces de generar agentes de unión diana de alta calidad que no dependen necesariamente de la diversificación de una o unas HVR/CDR particulares o un número particular de HVR/CDR de un polipéptido de referencia o anticuerpo fuente. La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo sorprendente e inesperado de que pueden generarse bibliotecas de alta calidad y altamente diversas que comprenden polipéptidos funcionales

capaces de unirse con antígenos diana diversificando solamente un subconjunto de las HVR de un polipéptido de inmunoglobulina tal como un anticuerpo, sustituyendo al mismo tiempo con las HVR restantes con al menos una parte de secuencias consenso humanas las HVR correspondientes. El subconjunto diversificado de HVR se diversifica de manera selectiva, proporcionando en la mayoría de los casos un sesgo durante el proceso de diversificación hacia aminoácidos particulares, aumentando de este modo la probabilidad de que las posiciones seleccionadas en la HVR estén ocupadas por aminoácidos predeterminados, y dando como resultado además una población de agentes de unión polipeptídicos cuya composición está sesgada hacia combinaciones de secuencia particulares. Los métodos descritos en el presente documento son rápidos, convenientes y flexibles, basándose en el uso de conjuntos de codones selectivos, preferentes que codifican un número seleccionado de aminoácidos a prevalencia específica para alguno de estos aminoácidos. La diversidad de secuencia sesgada y menos redundante, y por lo tanto el tamaño en general más pequeño de las poblaciones (por ejemplo, bibliotecas) de polipéptidos generadas por métodos de la invención permite mayor diversificación de estas poblaciones, y mayor cobertura del número de secuencias diversificadas únicas que son teóricamente posibles pero que han estado limitadas previamente por las limitaciones prácticas de las técnicas de clonación de recombinación, (por ejemplo, limitación del número de transformantes bacterianos en el proceso de clonación, etc.). La eficacia potenciada en la generación de secuencias diversificadas funcionales también contribuye a una potenciación de la calidad de las bibliotecas. Estas ventajas no se proporcionan en general por métodos convencionales. Los polipéptidos agentes de unión candidatos generados por la invención poseen características de unión a diana de alta calidad y tienen características estructurales que proporcionan alto rendimiento de producción en cultivo celular. La invención proporciona métodos para generar estos polipéptidos de unión, métodos para usar estos polipéptidos y composiciones que los comprenden.

Se describen en el presente documento polipéptidos de fusión que comprenden HVR diversificadas y una secuencia polipeptídica heteróloga (preferentemente la de al menos una parte de un polipéptido viral), como polipéptidos individuales y como un miembro de una pluralidad de polipéptidos individuales únicos que son agentes de unión candidatos para dianas de interés. Las composiciones (tales como bibliotecas) que comprenden dichos polipéptidos encuentran uso en diversas aplicaciones, por ejemplo, como grupos de polipéptidos de inmunoglobulina candidatos (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo) que se unen con dianas de interés. Dichos polipéptidos también pueden generarse usando armazones no de inmunoglobulina (por ejemplo, proteínas, tales como hormona del crecimiento humana, etc.). Se describen en el presente documento polinucleótidos y polipéptidos generados de acuerdo con métodos descritos en el presente documento, y sistemas, kits y artículos de fabricación para practicar métodos y/o usar polipéptidos/ polinucleótidos y/o composiciones.

Se describe en el presente documento un método para generar un polipéptido que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las HVR variantes seleccionadas del grupo que consiste en H1, H2, H3, L1, L2 y L3, en el que dicho polipéptido es capaz de unirse con un antígeno diana de interés, comprendiendo dicho método identificar al menos una (o cualquier número hasta todas) posición de aminoácido accesible al disolvente y altamente diversa en un HVR de referencia correspondiente a la HVR variante; y (ii) variar el aminoácido en la posición accesible al disolvente y altamente diversa generando copias variantes de la HVR usando un conjunto de codones preferentes (la definición de "conjunto de codones preferentes" como se proporciona posteriormente).

Los métodos descritos en el presente documento son útiles para generar y/o usar un grupo que comprende una pluralidad de polipéptidos en particular para seleccionar e identificar agentes de unión candidatos para antígenos diana de interés. Por ejemplo, se describe en el presente documento un método para generar una composición que comprende una pluralidad de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las HVR variantes seleccionadas del grupo que consiste en H1, H2, H3, L1, L2 y L3, en el que dicho polipéptido es capaz de unirse con un antígeno diana de interés, comprendiendo dicho método identificar al menos una (o cualquier número hasta todas) posición de aminoácido accesible al disolvente y altamente diversa en una HVR de referencia correspondiente a la HVR variante; y (ii) variar el aminoácido en la posición accesible al disolvente y altamente diversa generando copias variantes de la HVR usando un conjunto de codones preferentes; en el que se genera una pluralidad de polipéptidos amplificando un polinucleótido molde con un conjunto de oligonucleótidos que comprenden degeneración altamente sesgada en la secuencia que codifica un aminoácido variante, en el que dicha degeneración sesgada refleja las secuencias codónicas preferentes del conjunto de codones preferentes.

También se describe en el presente documento un método que comprende: construir un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera, una cadena pesada o los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada de un anticuerpo fuente que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las HVR seleccionadas del grupo que consiste en HVR L1, L2, L3, H1, H2 y H3; y mutar al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las HVR del anticuerpo fuente en al menos una (o cualquier número hasta todas) posición de aminoácido accesible al disolvente y altamente diversa usando un conjunto de codones preferentes.

También se describe en el presente documento un método que comprende construir una biblioteca de partículas de fagos o fagémidos que presentan una pluralidad de polipéptidos; poner en contacto la biblioteca de partículas con un antígeno diana en condiciones adecuadas para unión de las partículas con el antígeno diana; y separar las

partículas que se unen de las que no se unen con el antígeno diana.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, una posición de aminoácido accesible al disolvente y/o altamente diversa puede ser cualquiera que cumpla los criterios como se describen en el presente documento, en particular cualquier combinación de las posiciones como se describen en el presente documento, por ejemplo cualquier combinación de las posiciones descritas para los polipéptidos de la invención (como se describe en más detalle en el presente documento). Los aminoácidos variantes adecuados pueden ser cualquiera que cumpla los criterios como se describen en el presente documento, por ejemplo aminoácidos variantes en polipéptidos de la invención como se describen en más detalle posteriormente.

El diseño de diversidad en HVR puede implicar diseño de diversidad en la longitud y/o en secuencia de la HVR. Por ejemplo, HVRH3 puede diversificarse en longitud para ser, por ejemplo, de 7 a 19 aminoácidos de longitud, y/o en su secuencia, por ejemplo variando posiciones accesibles a disolvente y/o altamente diversas con aminoácidos codificados por un conjunto de codones preferentes.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden estar en diversas formas siempre que la función de unión a diana de los polipéptidos se conserve. Un polipéptido puede ser un polipéptido de fusión (es decir, una fusión de dos o más secuencias de polipéptidos heterólogos). Pueden prepararse polipéptidos con HVR diversificadas como polipéptidos de fusión con al menos una parte de una proteína de cubierta viral, por ejemplo, para su uso en presentación en fagos. Las proteínas de cubierta viral que pueden usarse para presentación de los polipéptidos de la invención comprenden proteína p III, proteína de cubierta mayor pVIII, Soc (fago T4), Hoc (fago T4), gpD (fago lambda), pVI o variantes o fragmentos de las mismas. El polipéptido de fusión puede fusionarse con al menos una parte de una proteína de cubierta viral, tal como una proteína de cubierta viral seleccionada del grupo que consiste en pIII, pVIII, Soc, Hoc, gpD, pVI y variantes o fragmentos de las mismas.

Cuando el polipéptido con HVR diversificadas en uno o más dominios variables de anticuerpo, los dominios variables de anticuerpo pueden presentarse en la superficie del virus en diversos formatos incluyendo ScFv, Fab, Fab', scFv₂, F(ab')₂ y F(ab)₂. Para presentación de los polipéptidos de manera bivalente, la proteína de fusión preferentemente incluye un dominio de dimerización. El dominio de dimerización puede comprender una secuencia de dimerización y/o una secuencia que comprende uno o más restos de cisteína. El dominio de dimerización está preferentemente unido, directa o indirectamente, al extremo C terminal de un dominio variable o constante de cadena pesada (por ejemplo, CH1). La estructura del dominio de dimerización puede variar dependiendo de si el dominio variable de anticuerpo se produce como un componente de proteína de fusión con el componente de proteína de cubierta viral (sin un codón de terminación ámbar después del dominio de dimerización) o si el dominio variable de anticuerpo se produce predominantemente sin componente de proteína de cubierta viral (por ejemplo con un codón de terminación ámbar después del dominio de dimerización). Cuando el dominio variable de anticuerpo se produce predominantemente como una proteína de fusión con componente de proteína de cubierta viral, uno o más enlaces disulfuro y/o una única secuencia de dimerización posibilita la presentación bivalente. Para dominios variables de anticuerpo producidos predominantemente sin fusionarse con un componente de proteína de cubierta viral (por ejemplo con terminación ámbar), es preferible tener un dominio de dimerización que comprende tanto un resto de cisteína como una secuencia de dimerización.

Además, opcionalmente, un polipéptido de fusión puede comprender un marcador que puede ser útil en purificación, detección y/o exploración tal como FLAG, poly-his, gD tag, c-myc, proteína de fluorescencia o B-galactosidasa. Opcionalmente, un polipéptido de fusión comprende un dominio variable o constante de cadena ligera fusionado con un marcador polipeptídico.

También como se describe en el presente documento un polipéptido tal como un dominio variable de anticuerpo se obtiene a partir de una única molécula fuente o molde. La fuente o molécula molde se selecciona o diseña preferentemente para características tales como buen rendimiento y buena estabilidad cuando se produce en cultivo de células procariotas o eucariotas y/o para acomodar regiones HVRH3 de diversas longitudes. La secuencia de la molécula molde puede alterarse para mejorar el plegamiento y/o la presentación del dominio variable cuando se presente como una proteína de fusión con un componente de proteína de cubierta de fago. Por ejemplo, un anticuerpo fuente puede comprender secuencias de marco conservado de huMAb4D5-8 como se representa en las Figuras 7 u 8, comprendiendo las secuencias de HVR molde del molde una secuencia consenso de HVR humana. Las secuencias de marco conservado también pueden ser cualquiera que pueda combinarse con secuencias de HVR generadas de acuerdo con métodos del presente documento para obtener capacidad de unión a polipéptido diana. Por ejemplo, los restos de región marco conservada pueden modificarse o alterarse de la molécula fuente o molde para mejorar o alterar de otro modo el plegamiento, rendimiento, presentación o afinidad del dominio variable de anticuerpo. En algunas realizaciones, se seleccionan restos de marco conservado para modificarse a partir de la molécula fuente o molde cuando el aminoácido en la posición de marco conservado de la molécula fuente es diferente del aminoácido o los aminoácidos habitualmente hallados en esa posición en anticuerpos de origen natural o en una secuencia consenso de subgrupo. Los aminoácidos en esas posiciones pueden cambiarse a los aminoácidos más habitualmente hallados en los anticuerpos de origen natural o en una secuencia consenso de subgrupo en esa posición. En una realización, el resto de marco conservado 71 de la cadena pesada puede ser R, V o A. En otro ejemplo, el resto de marco conservado 93 de la cadena pesada puede ser S o A. En otro ejemplo más,

el resto de marco conservado 94 puede ser R, K o T o puede estar codificado por *MRT*. En otro ejemplo más, el resto de marco conservado 49 en la cadena pesada puede ser alanina o glicina. También pueden cambiarse restos de marco conservado en la cadena ligera. Por ejemplo, el aminoácido de la posición 66 puede ser arginina o glicina.

5 Los métodos descritos en el presente documento son capaces de generar una amplia diversidad de polipéptidos que comprenden un conjunto diverso de secuencias de HVR.

De acuerdo con la presente invención como se expone en las reivindicaciones, hay un polipéptido que es un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) a partir de un anticuerpo fuente, en el que VH comprende una HVR-H3, una HVR-H2 y una HVR-H1 y:

(i) HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos:

15 X1-X2-(X3)n-X4-D-X5 en la que X1-X5 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, y X1 es la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat y n=4-17;

(ii) HVR-H2 comprende una secuencia de aminoácidos:

V-S-X1-I-X2-X3-X4-X5-G-X6-T-X7-Y-A-D-S-V-K-G; en la que X1-X7 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, y X1 es la posición 50 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;

(iii) HVR-H1 comprende una secuencia de aminoácidos:

20 G-X1-X2-F-X3-X4-X5-X6-X7-S-W-V;

en la que X1-X7 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, en los que G es la posición 26 y X1 es la posición 27 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

25 En una realización de (i), n=16. En una realización de (i), X3 es Y G, S, A o V. En una realización de (i), X3 es Y, G o S. En una realización de (i), el resto X3 inmediatamente antes de X4 es Y, G o S. En una realización de (i), el resto X3 inmediatamente antes de X4 es A, G o V. En una realización de (i), X4 es F o M. En una realización de (i), X5 es Y o V.

También de acuerdo con la presente invención hay:

30 (4) Un polipéptido que es un fragmento de anticuerpo, en el que el VL comprende una HVR-L3, una HVR-L1 y una HVR-L2 y:

(i) HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos:

35 Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T;

en la que X1-X5 son cualesquiera aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, y X1 es la posición 91 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

(ii) HVR-L1 comprende una primera secuencia hipervariable consenso o variante de la misma que comprende sustitución en una o más posiciones en comparación con una secuencia hipervariable consenso correspondiente; y

40 (iii) HVR-L2 comprende una segunda secuencia hipervariable consenso o variante de la misma que comprende sustitución en una o más posiciones en comparación con una secuencia hipervariable consenso correspondiente.

45 En un aspecto, la invención proporciona una combinación del dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina como se describe en el presente documento (polipéptido (2) anterior) y cualquier HVR-L3 de cadena ligera como se describe en el presente documento (incluyendo, por ejemplo, un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina como se describe en el presente documento, tal como polipéptido (4) anterior).

50 En una realización, la primera secuencia hipervariable consenso del polipéptido de (4) comprende una secuencia de CDR-L1 consenso de Kabat. En una realización, la segunda secuencia hipervariable consenso comprende una secuencia de CDR-L2 consenso de Kabat. Están bien establecidas, públicamente disponibles y se proporcionan en la base de datos de Kabat secuencias consenso de CDR adecuadas (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).
55 Las secuencias consenso CDR-L1 y CDR-L2 de subgrupo III también se exponen en la Figura 1 y Figura 2 (las líneas indicadas como "consenso").

60 Para mayor claridad, en una HVR variante individual, el aminoácido X puede ser cualquiera de los aminoácidos codificados por un conjunto de codones particular. Por ejemplo, en una secuencia de HVR-H3 variante en la que X1 puede ser el aminoácido A, B, C o D, y n=4, la secuencia de X1X1X1X1 (es decir, (X1)₄) en la HVR-H3 variante puede ser, por ejemplo, AAAA, BBBB, CCCC, DDDD, ABCD, ACBD, ADDB, ACBD, ADDB, o cualquier combinación de uno o más de los cuatro aminoácidos A, B, C y D.

65 Los polipéptidos descritos anteriormente pueden comprender una HVR-L2 que comprende una secuencia de HVR consenso. Los polipéptidos pueden comprender una HVR-L2 variante que comprende un aminoácido variante en al menos una o ambas de las posiciones 50 y 53, numeración de posiciones de acuerdo con el sistema de Kabat.

Los polipéptidos pueden comprender una HVR-L1 que comprende una secuencia de HVR consenso. Los polipéptidos pueden comprender una HVR-L1 variante que comprende un aminoácido variante en al menos una (o cualquier número hasta todas) de las posiciones 28, 29, 30, 31 y 32, numeración de posiciones de acuerdo con el sistema de Kabat.

En los aspectos anteriores, las HVR variantes se varían de acuerdo a una secuencia consenso correspondiente, por ejemplo, secuencias consenso para la HVR correspondiente como se describe en la base de datos de Kabat (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Los polipéptidos comprenden dominios variables de anticuerpo tanto de cadena pesada como de cadena ligera, en los que el dominio variable de anticuerpo comprende HVR variantes como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, los polipéptidos (en particular, los que comprenden un dominio variable de anticuerpo) comprenden además una secuencia de marco conservado de anticuerpo, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4 para un dominio variable de anticuerpo correspondiente a la HVR variante, las secuencias de FR obtenidas de un único molde de anticuerpo. En una realización, las secuencias de FR se obtienen de un anticuerpo humano. En una realización, las secuencias de FR se obtienen de una secuencia consenso humana (por ejemplo, secuencia consenso del subgrupo III). En una realización, las secuencias de marco conservado comprenden una secuencia consenso modificada como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende modificaciones en las posiciones 49, 71, 93 y/o 94 en la cadena pesada, y/o posición 66 en la cadena ligera). Se representan secuencias de marco conservado ejemplares en las Figuras 5 y 6. En una realización, cada una de las FR tiene la secuencia del anticuerpo huMAb4D5-8, o una versión modificada del mismo (Figuras 7 y 8).

De acuerdo con la invención, se describen en el presente documento métodos para generar composiciones que comprenden polipéptidos y/o polinucleótidos. En consecuencia, se describe en el presente documento

(1) Un método para generar una composición que comprende una pluralidad de polipéptidos que son fragmentos de anticuerpo, que comprende:

a) generar una pluralidad de polipéptidos que comprenden

(i) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos:

X1-X2-(X3)_n-X4-D-X5;

en la que X1-X5 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, y X1 es la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, y n = un número adecuado que conservaría la actividad funcional del HVR (por ejemplo, n=4-17);

(ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos:

V-S-X1-I-X2-X3-X4-X5-G-X6-T-X7-Y-A-D-S-V-K-G

en la que X1-X7 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, y X1 es la posición 50 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;

(iii) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos:

G-X1-X2-F-X3-X4-X5-X6-X7-S-W-V;

en la que X1-X7 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, en los que G es la posición 26 y X1 es la posición 27 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

El método puede comprender además:

(b) generar una pluralidad de polipéptidos que son fragmentos de anticuerpo, que comprenden:

(i) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos:

Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T;

en la que X1-X5 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, y X1 es la posición 91 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;

(ii) HVR-L1 comprende una primera secuencia hipervariable consenso o variante de la misma que comprende sustitución en una o más posiciones en comparación con una secuencia hipervariable consenso correspondiente; y

(iii) HVR-L2 comprende una segunda secuencia hipervariable consenso o variante de la misma que comprende una sustitución en una o más posiciones en comparación con una secuencia hipervariable consenso correspondiente.

Opcionalmente, la primera secuencia hipervariable consenso de HVR-L1 comprende una secuencia de CDR-L1 consenso de Kabat. Opcionalmente, la segunda secuencia hipervariable consenso de HVR-L2 comprende una secuencia de CDR-L2 consenso de Kabat. Opcionalmente, la pluralidad de polipéptidos está codificada por una pluralidad de polinucleótidos. Opcionalmente, los polinucleótidos comprenden codones no redundantes para cada aminoácido en cada posición X. Opcionalmente, los codones no redundantes comprenden codones trinucleotídicos.

Opcionalmente, la generación de dicha pluralidad de polinucleótidos comprende mutar un ácido nucleico molde/de referencia que codifica las secuencias de HVR respectivas en una o más posiciones X dentro de dichas secuencias de HVR. Opcionalmente, el ácido nucleico molde/de referencia comprende uno o más codones de terminación en una HVR, y un ácido nucleico mutagénico (por ejemplo, un oligonucleótido) comprende uno o más codones que codifican un aminoácido o aminoácidos en la posición o las posiciones correspondientes al codón o los codones de terminación. Opcionalmente, dicha pluralidad de polipéptidos están codificados por oligonucleótidos mutagénicos que comprenden uno o más codones que codifican un aminoácido o aminoácidos en la posición o las posiciones correspondientes al codón o los codones de terminación del ácido nucleico molde/de referencia. Opcionalmente, el HVR es HVR-H3. Opcionalmente, solamente una HVR comprende el codón o los codones de terminación, en la que dicha HVR es HVR-H3.

Opcionalmente, la probabilidad de que X1 y/o X2 de HVR-H3 sea G es mayor que cualquier otro aminoácido individual. Opcionalmente, la pluralidad de polinucleótidos comprende (i) un primer conjunto de polinucleótidos que comprenden un codón que codifica G en X1 y/o X2 de HVR-H3, y (ii) un segundo conjunto de polinucleótidos que comprenden un codón que codifica un aminoácido distinto de G en X1 y/o X2 de HVR-H3, en el que el primer conjunto de polinucleótidos está presente en una cantidad mayor que la cantidad de cada subconjunto de polinucleótidos que tienen la misma secuencia de HVR-H3 dentro del segundo conjunto de polinucleótidos.

Opcionalmente, al menos aproximadamente el 20 % (hasta el 29 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H3 comprenden un codón que codifica G en X1 y/o X2. En una realización, no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H3 comprenden un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G en X1 y/o X2. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G en X1 y/o X2 de HVR-H3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G en X1 y/o X2 de HVR-H3 de la pluralidad de polipéptidos. En una realización, al menos aproximadamente el 10 % (hasta el 20 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H3 comprenden un codón que codifica G, S o Y en X3. En una realización, no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H3 comprenden un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G, S o Y en X3. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G, S o Y en X3 de HVR-H3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G, S y/o Y en X3 de HVR-H3 de la pluralidad de polipéptidos.

Opcionalmente, al menos aproximadamente el 15 % (hasta el 25 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H2 comprenden un codón que codifica S o Y en X2. En una realización, no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H2 comprenden un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de S o Y en X2. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica S o Y en X2 de HVR-H2 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de S y/o Y en X2 de HVR-H2 de la pluralidad de polipéptidos. En una realización, al menos aproximadamente el 10 % (hasta el 20 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H2 comprenden un codón que codifica G, S o Y en X3 y/o X4. En una realización, no más de aproximadamente 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H2 comprenden un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G, S o Y en X3 y/o X4. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G, S o Y en X3 y/o X4 de HVR-H2 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G, S y/o Y en X3 y/o X4 de HVR-H2 de la pluralidad de polipéptidos.

Opcionalmente, al menos aproximadamente el 50 % (hasta el 60 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprenden un codón que codifica S en X4. En una realización, no más de aproximadamente 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprenden un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de S en X4. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica S en X4 de HVR-H1 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de S en X4 de HVR-H1 de la pluralidad de polipéptidos. En una realización, al menos aproximadamente el 50 % (hasta el 60 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprenden un codón que codifica Y en X5. En una realización, no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprenden un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de Y en X5. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica Y en X5 de HVR-H1 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de Y en X5 de HVR-H1 de la pluralidad de polipéptidos. En una realización, al menos aproximadamente el 10 % (hasta el 20 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprenden un codón que codifica G, S o Y en X6. En una realización, no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprenden un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G, S o Y en X6. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G, S o Y en X6 de HVR-H1 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G, S o Y en X6 de HVR-H1 de la pluralidad de polipéptidos.

Opcionalmente, al menos aproximadamente el 15 % (hasta el 25 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprenden un codón que codifica G, S o Y en X2. En una realización, no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G, S o Y en X2. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G, S o Y en X2 de HVR-L3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G, S o Y en X2 de HVR-L3 de la pluralidad de polipéptidos. En una realización, al menos aproximadamente el 50 % (hasta el 55 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica S en X3. En una realización, no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de S en X3. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica S en X3 de HVR-L3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de S en X3 de HVR-L3 de la pluralidad de polipéptidos. En una realización, al menos aproximadamente el 15 % (hasta el 25 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica S o Y en X4. En una realización, no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de S o Y en X4. En una realización, la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica S o Y en X4 de HVR-L3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de S o Y en X4 de HVR-L3 de la pluralidad de polipéptidos.

En un aspecto, la invención proporciona una biblioteca de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpo como se reivindica.

Opcionalmente, y de acuerdo con la presente invención, un polipéptido es un scFv. Opcionalmente, es un fragmento Fab. Opcionalmente, es un $F(ab)_2$ o $F(ab')_2$. Opcionalmente, es un fragmento Fab. Opcionalmente, es un $F(ab)_2$ o $F(ab')_2$. Opcionalmente, un polipéptido de la invención comprende además un dominio de dimerización. Opcionalmente, el dominio de dimerización está localizado entre un dominio variable de cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo y al menos una parte de una proteína de cubierta viral. El dominio de dimerización puede comprender una secuencia de dimerización y/o una secuencia que comprende uno o más restos de cisteína. El dominio de dimerización está preferentemente unido, directa o indirectamente, con el extremo C terminal de un dominio variable o constante de cadena pesada. La estructura del dominio de dimerización puede variarse dependiendo de si el dominio variable de anticuerpo se produce como un componente de proteína de fusión con el componente de proteína de cubierta viral (sin un codón de terminación ámbar después del dominio de dimerización) o si el dominio variable de anticuerpo se produce predominantemente sin componente de proteína de cubierta viral (por ejemplo con un codón de terminación ámbar después del dominio de dimerización). Cuando el dominio variable de anticuerpo se produce predominantemente como una proteína de fusión con componente de proteína de cubierta viral, uno o más enlaces disulfuro y/o una secuencia de dimerización individual posibilita la presentación bivalente. Para dominios variables de anticuerpos producidos predominantemente sin fusionarse con un componente de proteína de cubierta viral (por ejemplo con terminación ámbar), es preferible, aunque no se requiere, tener un dominio de dimerización que comprende tanto un resto de cisteína como una secuencia de dimerización. Opcionalmente, las cadenas pesadas del $F(ab)_2$ dimerizan en un dominio de dimerización que no incluye una región bisagra. El dominio de dimerización puede comprender una secuencia de cremallera de leucina (por ejemplo, una secuencia GCN4 tal como GRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG (SEQ ID NO: 3)).

Opcionalmente, de acuerdo con la presente invención, un polipéptido comprende además un dominio constante de cadena ligera fusionado con un dominio variable de cadena ligera, que comprende opcionalmente al menos una, dos o tres HVR variantes. Opcionalmente, el polipéptido comprende un dominio constante de cadena pesada fusionado con un dominio variable de cadena pesada, que comprende tres HVR variantes.

En algunos casos, puede ser preferible mutar un resto de marco conservado de modo que sea variante con respecto a un polipéptido de referencia o anticuerpo fuente. Por ejemplo, el resto de marco conservado 71 de la cadena pesada puede ser el aminoácido R, V o A. En otro ejemplo, el resto de marco conservado 93 de la cadena pesada puede ser el aminoácido S o A. En otro ejemplo más, el resto de marco conservado 94 de la cadena pesada puede ser el aminoácido R, K o T. En otro ejemplo más, el resto de marco conservado 49 de la cadena pesada puede ser el aminoácido A o G. también pueden mutarse restos de marco conservado en la cadena ligera. Por ejemplo, el resto de marco conservado 66 en la cadena ligera puede ser el aminoácido R o G.

Como se describe en el presente documento, una HVR variante se refiere a un HVR con una variación de secuencia en comparación con la HVR correspondiente de un anticuerpo fuente/polipéptido de referencia individual, por ejemplo en el que el anticuerpo de referencia/fuente comprende HVR que comprenden secuencias de CDR consenso (por ejemplo, como se proporciona en la base de datos de Kabat). En consecuencia, las HVR de un único polipéptido preferentemente corresponden al conjunto de HVR de un único polipéptido de referencia o anticuerpo fuente. Los polipéptidos pueden comprender una cualquiera o combinaciones de HVR variantes. Un polipéptido de la invención puede comprender una HVR-H1 variante, HVR-H2 variante y HVR-H3 variante. En otro ejemplo, un polipéptido puede comprender una HVR-H1 variante, HVR-H2 variante, HVR-H3 variante y HVR-L3 variante. Cualquier polipéptido puede comprender además una HVR-L3 variante. Cualquier polipéptido puede comprender además una HVR-H3 variante.

Opcionalmente, un polipéptido comprende una o más secuencias de HVR variantes como se representa en las Figuras 2 y/o 3.

Los polipéptidos pueden estar en un complejo entre sí por ejemplo, un complejo polipeptídico que comprende dos polipéptidos, en el que cada polipéptido es un polipéptido y en el que uno de dichos polipéptidos comprende al menos una, dos o todas las HVR variantes H1, H2 y H3, y el otro polipéptido comprende una HVR de cadena ligera variante (por ejemplo, HVR-L3). Un complejo polipeptídico puede comprender un primer y un segundo polipéptidos, en los que el primer polipéptido comprende al menos una, dos o tres HVR de cadena ligera variantes, y el segundo polipéptido comprende al menos una. También se describen en el presente documento dos o tres HVR de cadena pesada variantes. También se describen en el presente documento complejos de polipéptidos que comprenden las mismas secuencias de HVR variantes. La formación de complejos puede estar mediada por cualquier técnica adecuada, incluyendo por dimerización/multimerización en un dominio de dimerización/multimerización tal como los descritos en el presente documento o por interacciones covalentes (tal como mediante un enlace disulfuro) (que en algunos contextos es parte de un dominio de dimerización, por ejemplo, un dominio de dimerización puede contener una secuencia de cremallera de leucina y una cisteína).

También se describen en el presente documento composiciones que comprenden polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención, por ejemplo, una composición que comprende una pluralidad de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. Dicha pluralidad puede comprender polipéptidos codificados por una pluralidad de polinucleótidos generados usando un conjunto de oligonucleótidos que comprenden degradación en la secuencia que codifica un ácido nucleico variante, en el que dicha degradación es la de las múltiples secuencias codónicas del conjunto de codones que codifican el aminoácido variante. Una composición que comprende una biblioteca de polinucleótidos o polipéptidos de la invención puede estar en forma de un kit o un artículo de fabricación (opcionalmente envasado con instrucciones, tampones, etc.).

También se describe en el presente documento un polinucleótido que codifica un polipéptido como se describe en el polipéptido. También se describe en el presente documento un vector que comprende una secuencia que codifica un polipéptido descrito en el presente documento. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de expresión replicable (por ejemplo, el vector de expresión replicable puede ser fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado del mismo o un fago lambdaide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado de los mismos). El vector puede comprender una región promotora unida a la secuencia que codifica un polipéptido de la invención. El promotor puede ser cualquiera que sea adecuado para expresión del polipéptido, por ejemplo, el sistema de promotor lac Z, el promotor de fosfatasa alcalina pho A (Ap), el promotor de bacteriófago λ_{pL} (un promotor sensible a la temperatura), el promotor de tac, el promotor de triptófano, y el promotor de bacteriófago T7. Por lo tanto, la invención también proporciona un vector que comprende un promotor seleccionado del grupo que consiste en los sistemas promotores anteriores.

Pueden presentarse polipéptidos en cualquier forma adecuada de acuerdo con la necesidad y el deseo del practicante. Por ejemplo, un polipéptido puede presentarse en una superficie viral, por ejemplo, una partícula viral de fago o fagémido. En consecuencia, se describen en el presente documento partículas virales que comprenden un polipéptido descrito en el presente documento y/o polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en el presente documento.

También se describe de acuerdo con la presente invención una población que comprende una pluralidad de polipéptidos o polinucleótidos, en los que cada tipo de polipéptido o polinucleótido es un polipéptido o polinucleótido como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, se proporcionan polipéptidos y/o polinucleótidos como una biblioteca, por ejemplo, una biblioteca que comprende una pluralidad de al menos aproximadamente 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 secuencias polipeptídicas y/o polinucleotídicas distintas. También se describe en el presente documento una biblioteca que comprende una pluralidad de los virus o partículas virales, presentando cada virus o partícula de virus un polipéptido descrito en el presente documento. Una biblioteca de la invención puede comprender virus o partículas virales que presentan cualquier número de polipéptidos distintos (secuencias), por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 polipéptidos distintos.

También se describen en el presente documento células hospedadoras que comprenden un polinucleótido o vector que comprende una secuencia que codifica un polipéptido descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para seleccionar con respecto a agentes de unión de alta afinidad para antígenos diana específicos tales como hormona del crecimiento, hormona del crecimiento bovina, efrina (por ejemplo, efrinaA2), neuropilina (por ejemplo, neuropilina 1), estigma, factores de crecimiento de tipo insulina, hormona del crecimiento humana, incluyendo hormona del crecimiento humana n-metionilo, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, amilina, una proteína de apoptosis, relaxina, prorrelaxina, hormonas glucoproteicas tales como hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hematopoyético, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, factores de necrosis tumoral, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-met), sustancia

inhibidora muleriana, polipéptido asociado a gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factores de crecimiento endotelial vascular, integrina, factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta, factor de crecimiento de tipo insulina I y II, eritropoyetina, factores osteoinductores, interferones, factores estimulantes de colonias, interleucinas, proteínas morfogenéticas del hueso, LIF, SCF, neutravidina, proteína de unión a maltosa, erbina GST, insulina, IgG, ligando de FLT-3, y ligando de kit.

Los métodos proporcionan poblaciones de polipéptidos (bibliotecas de polipéptidos (por ejemplo, dominios variables de anticuerpo)) con regiones HVR diversificadas. Estas bibliotecas se clasifican (seleccionan) y/o exploran para identificar agentes de unión de alta afinidad con un antígeno diana.

Se seleccionan agentes de unión polipeptídicos de la biblioteca con respecto a unión con antígenos diana, y con respecto a afinidad. Los agentes de unión polipeptídicos seleccionados usando una o más de estas estrategias de selección pueden explorarse después con respecto a afinidad y/o con respecto a especificidad (unión solamente con antígeno diana y no con antígenos no diana).

En un aspecto, un método de la invención comprende generar una pluralidad de polipéptidos con una o más HVR diversificadas, clasificar la pluralidad de polipéptidos con respecto a agentes de unión con un antígeno diana poniendo en contacto la pluralidad de polipéptidos con un antígeno diana en condiciones adecuadas para la unión, separar los agentes de unión con el antígeno diana de los que no se unen; aislar los agentes de unión; e identificar los agentes de unión de alta afinidad (o cualquier agente de unión que tenga una afinidad de unión deseada). La afinidad de los agentes de unión que se unen con el antígeno diana puede determinarse usando diversas técnicas conocidas en este campo, por ejemplo, ELISA de competición tal como se describe en el presente documento. Opcionalmente, los polipéptidos pueden fusionarse con un marcador polipeptídico, tal como gD, poli his o FLAG, que pueden usarse para clasificar agentes de unión en combinación con clasificación con respecto al antígeno diana.

También se describe en el presente documento un método para aislar o seleccionar con respecto a un dominio variable de anticuerpo que se une con un antígeno diana de una biblioteca de dominios variables de anticuerpo, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto una población que comprende una pluralidad de polipéptidos descritos en el presente documento con un antígeno diana inmovilizado en condiciones adecuadas para unión para aislar agentes de unión polipeptídicos de antígeno diana; b) separar los agentes de unión polipeptídicos de los que no se unen, y eluir los agentes de unión del antígeno diana; c) opcionalmente, repetir las etapas a-b al menos una vez (en algunas realizaciones, al menos dos veces).

Opcionalmente, un método puede comprender además: d) incubar los agentes de unión polipeptídicos con una concentración de antígeno diana marcado en el intervalo de 0,1 nM a 1000 nM en condiciones adecuadas para unión para formar una mezcla; e) poner en contacto la mezcla con un agente inmovilizado que se une con el marcador en el antígeno diana; f) eluir los agentes de unión polipeptídicos del antígeno diana marcado; g) opcionalmente, repetir las etapas d) a f) al menos una vez (por ejemplo, al menos dos veces), usando una concentración sucesivamente menor de antígeno diana marcado cada vez. Opcionalmente, el método puede comprender añadir un exceso de antígeno diana no marcado a la mezcla e incubar durante un periodo de tiempo suficiente para eluir agentes de unión de baja afinidad del antígeno diana marcado.

También se describe en el presente documento un método para aislar o seleccionar con respecto a agentes de unión de alta afinidad (o agentes de unión que tienen una afinidad de unión deseada) para un antígeno diana. Por ejemplo, dicho método comprende: a) poner en contacto una población que comprende una pluralidad de polipéptidos con un antígeno diana, en el que el antígeno se proporciona a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 nM a 1000 nM para aislar agentes de unión polipeptídicos para el antígeno diana; b) separar los agentes de unión polipeptídicos del antígeno diana; c) opcionalmente, repetir las etapas a-b al menos una vez (por ejemplo, al menos dos veces), cada vez con una concentración sucesivamente menor de antígeno diana para aislar agentes de unión polipeptídicos que se unen con la menor concentración de antígeno diana; d) seleccionar el agente de unión polipeptídico que se une con la menor concentración del antígeno diana para alta afinidad (o cualquier afinidad deseada) incubando los agentes de unión polipeptídicos con varias diluciones diferentes del antígeno diana y determinar la CI50 del agente de unión polipeptídico; y e) identificar un agente de unión polipeptídico que tiene una afinidad deseada por el antígeno diana. Dicha afinidad puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 nM a 200 nM, 0,5 nM a 150 nM, 1 nM a 100 nM, 25 nM a 75 nM.

También se describe en el presente documento un ensayo para aislar o seleccionar agentes de unión polipeptídicos que comprende (a) poner en contacto una población que comprende una pluralidad de polipéptidos con un antígeno diana marcado, en el que el antígeno diana marcado se proporciona a una concentración en un intervalo de 0,1 nM a 1000 nM, en condiciones adecuadas para unión para formar un complejo de un agente de unión polipeptídico y el antígeno diana marcado; b) aislar los complejos y separar el agente de unión polipeptídico del antígeno diana marcado; c) opcionalmente, repetir las etapas a-b al menos una vez, usando cada vez una concentración menor de antígeno diana. Opcionalmente, el método puede comprender además poner en contacto el complejo de agente de unión polipeptídico y el antígeno diana con un exceso de antígeno diana no marcado. Opcionalmente, las etapas del método se repiten dos veces y la concentración de diana en un primer ciclo de selección está en el intervalo de aproximadamente 100 nM a 250 nM, y, en un segundo ciclo de selección (si se realiza), está en el intervalo de

aproximadamente 25 nM a 100 nM, y el tercer ciclo de selección (si se realiza) está en el intervalo de aproximadamente 0,1 nM a 25 nM.

5 También se describe en el presente documento un método para explorar una población que comprende una pluralidad de polipéptidos, comprendiendo dicho método: a) cultivar una primera muestra de la población de polipéptidos con un antígeno diana en condiciones adecuadas para unión de los polipéptidos con el antígeno diana; b) someter una segunda muestra de la población de polipéptidos a una incubación similar pero en ausencia del antígeno diana; (c) poner en contacto cada una de la primera y segunda muestra con antígeno diana inmovilizado en condiciones adecuadas para unión de los polipéptidos con el antígeno diana inmovilizado; d) detectar la cantidad de polipéptidos unidos con antígeno diana inmovilizado para cada muestra; e) determinar la afinidad de un polipéptido particular para el antígeno diana calculando la relación de la cantidad del polipéptido particular que se une en la primera muestra frente a la cantidad del polipéptido particular que se une en la segunda muestra.

15 Las bibliotecas generadas como se describe en el presente documento también pueden explorarse con respecto a unión con una diana específica y con respecto a falta de unión con antígenos no diana. En un aspecto, la invención proporciona un método para explorar con respecto a un polipéptido, tal como un dominio variable de anticuerpo de la invención, que se une con un antígeno diana específico de una biblioteca de dominios variables de anticuerpo, comprendiendo dicho método: a) generar una población que comprende una pluralidad de polipéptidos de la invención; b) poner en contacto la población de polipéptidos con un antígeno diana en condiciones adecuadas para unión; c) separar un polipéptido de unión en la biblioteca de polipéptidos no de unión; d) identificar un polipéptido de unión específico de antígeno diana determinando si el polipéptido de unión se une con antígeno no diana; y e) aislar un polipéptido de unión específico de antígeno diana. En algunas realizaciones, la etapa (e) comprende eluir el polipéptido de unión del antígeno diana, y amplificar un vector de expresión replicable que codifica dicho polipéptido de unión.

25 Las combinaciones de cualquiera de los métodos de clasificación/selección descritos anteriormente pueden combinarse con los métodos de exploración. Por ejemplo, los agentes de unión polipeptídicos se seleccionan en primer lugar con respecto a unión con un antígeno diana inmovilizado. Los agentes de unión polipeptídicos que se unen con el antígeno diana inmovilizado pueden después explorarse con respecto a unión con el antígeno diana y con respecto a falta de unión con antígenos no diana. Los agentes de unión polipeptídicos que se unen específicamente con el antígeno diana pueden amplificarse según sea necesario. Estos agentes de unión polipeptídicos pueden seleccionarse con respecto a mayor afinidad por contacto con una concentración de un antígeno diana marcado para formar un complejo, en el que el intervalo de concentración de antígeno diana marcado es de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 1000 nM, y los complejos se aíslan por contacto con un agente que se une con el marcador en el antígeno diana. Un agente de unión polipeptídico puede después eluirse del antígeno diana marcado y, opcionalmente, los ciclos de selección se repiten, usándose cada vez una concentración menor del antígeno diana marcado. Los polipéptidos de unión que pueden aislarse usando este método de selección pueden después explorarse con respecto a alta afinidad usando por ejemplo, un ensayo de ELISA de fase de solución u otros métodos convencionales conocidos en la técnica. Pueden proporcionarse poblaciones de polipéptidos descritos en el presente documento, usados en métodos descritos en el presente documento, en cualquier forma adecuada para las etapas de selección/exploración. Por ejemplo, los polipéptidos pueden estar en forma soluble libre, unidos a matriz o presentes en la superficie de una partícula viral, tal como una partícula de fago o fagémido. Como se describe en el presente documento, la pluralidad de polipéptidos está codificada por una pluralidad de vectores replicables proporcionados en forma de una biblioteca. En métodos de selección / exploración descritos en el presente documento, los vectores que codifican un polipéptido de unión pueden amplificarse adicionalmente para proporcionar suficientes cantidades de polipéptido para su uso en repeticiones en las etapas de selección/exploración.

50 En una realización, la invención proporciona un método de selección de un polipéptido que se une con un antígeno diana que comprende:

- a) generar una composición que comprende una pluralidad de polipéptidos de la invención como se describe en el presente documento;
- b) seleccionar un agente de unión polipeptídico que se une con un antígeno diana de la composición;
- 55 c) aislar el agente de unión polipeptídico de los que no se unen;
- d) identificar agentes de unión de la afinidad deseada de los agentes de unión polipeptídicos aislados.

60 Para mayor claridad, en la descripción del presente documento, a no ser que se indique específica o contextualmente de otro modo, todas la numeraciones de aminoácidos son de acuerdo con Kabat *et al.* (véase desarrollo adicional en "Definiciones" posteriormente).

Breve descripción de las figuras

65 La Figura 1 (A) ilustra secuencias molde consenso para un anticuerpo de referencia/fuente, en el que las secuencias consenso se basan en el subgrupo III de anticuerpos humanos en la base de datos de Kabat. Las líneas marcadas "consenso" se refieren a las secuencias consenso de Kabat, y las líneas marcadas "h4D5 temp

(V0350-4)" se refieren a un molde de anticuerpo huMAb4D5-8. huMAb4D5-8 también se denomina HERCEPTIN® (Genentech, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos) (también referido en la patente de Estados Unidos n.º 6.407.213 y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073-93). (B) Secuencia consenso de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1 y CDR-H2 en el molde de la biblioteca de VH/VL. Los restos de CDR

consenso se determinan seleccionando los aminoácidos más prevalentes existentes en anticuerpos humanos naturales. Se muestra la prevalencia (%) de cada resto en anticuerpos humanos en una posición dada, que se calcula a partir del alineamiento de aproximadamente 1600 secuencias de cadena ligera humanas y 3500 secuencias de cadena pesada humanas en la base de datos de Kabat (34).

La Figura 2 ilustra diversidades que pueden generarse en HVR de la cadena ligera. Los números entre

paréntesis en la línea marcada "selección aleatoria" se refieren a las diversidades diseñadas para selección

aleatoria como se ilustra en la Figura 4.

La Figura 3 ilustra diversidades que pueden generarse en HVR de la cadena pesada. Los números entre

paréntesis en las líneas marcadas "selección aleatoria" se refieren a las diversidades diseñadas para selección

aleatoria como se ilustra en la Figura 4. En algunas realizaciones, se indican conjuntos de codones degradados

para ciertas posiciones en las líneas marcadas "selección aleatoria".

La Figura 4 (A) representa diversidades diseñadas para selección aleatoria usando diversas combinaciones de

nucleótidos (por ejemplo, de acuerdo con el esquema trinucleotídicos). Los alfabetos (A, D, E, F, etc.) se refieren

a tipos de aminoácidos (es decir, alanina, ácido aspártico, etc.). 5: Gly (~50:50) más aminoácidos restantes

excepto Cys; 6: Ser (~50:50) más aminoácidos restantes excepto Cys; 7: Tyr (~50:50) más aminoácidos

restantes excepto Cys; 8: todos los aminoácidos excepto Cys. (B) El porcentaje de composición de aminoácidos

en cada mezcla de trinucleótidos [NOTA: la designación "X" para mezclas de trinucleótidos como se representa

en la Figura 4 es separada y distinta de la designación "X" para posiciones de aminoácidos de HVR particulares

como se usa en otra parte en la presente memoria descriptiva]. X3: mezcla igual de los 19 aminoácidos excepto

Cys; X0: mezcla igual de X3 y Gly; X1: mezcla igual de X3 y Ser, X2: mezcla igual de X3 y Tyr. Basándose en las

anteriores cuatro mezclas de trinucleótidos, se generaron otras cuatro mezclas. X4: $(X0 + X3)/2$; X5: $(X0 + X1$

$+X2)/3$; X6: $(X1 + X2 + X3)/3$; X7: $(X0 + X1 + X2 + X3)/4$. (C) Diversidad diseñada de CDR-L3; CDR-H1, CDR-H2

y CDR-H3 para biblioteca de VH/VL. Las posiciones de CDR seleccionadas para selección aleatoria en CDR-L3,

CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 se enumeran con restos consenso en el molde de la biblioteca. La diversidad

diseñada es un grupo de restos codificado por un codón degradado adaptado (cursiva) o 19 aminoácidos sin

cisteína codificados por mezclas de codones trinucleotídicos (texto en negrita) de modo que el porcentaje de

tipos de aminoácidos codificados en cada posición sea cercano a o mayor del 50 % de tipos de aminoácidos

hallados en la base de datos. Para posiciones particulares, los 19 aminoácidos sin cisteína se introducen usando

mezclas de codones trinucleotídicos con diferente preferencia para Tyr (Y), Gly (G) y Ser (S).

Las Figuras 5 y 6 representan secuencias de marco conservado consenso humanas aceptoras ejemplares para

su uso en la práctica de la presente invención con identificadores de secuencia de la siguiente manera:

Marcos conservados consenso pesados variables (VH) (FIG. 5A, B)

marco conservado consenso de subgrupo I de VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 19; 122-124)

marco conservado consenso de subgrupo I de VH humano sin regiones variables extendidas (SEQ ID NO:

20-22;

125-139)

marco conservado consenso de subgrupo II de VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 23; 134-136)

marco conservado consenso de subgrupo II de VH humano sin regiones variables extendidas (SEQ ID NO:

24-26; 137-145)

marco conservado consenso de subgrupo II de VH humano sin extendida

marco conservado consenso de subgrupo III de VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 27; 146-148)

marco conservado consenso de subgrupo III de VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID

NO: 28-30; 149-157)

marco conservado aceptor de VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 31; 158-160)

marco conservado aceptor de VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 32-33; 161-

166)

marco conservado aceptor 2 de VH humano sin CDR de Kabat (SEQ ID NO: 34; 167-169)

marco conservado aceptor 2 de VH humano sin regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO: 35-37; 170-

178)

Marcos conservados consenso ligeros variables (VL) (FIG. 6A, B)

marco conservado consenso del subgrupo I de VL kappa humano (SEQ ID NO: 38; 179-181)

marco conservado consenso del subgrupo II de VL kappa humano (SEQ ID NO: 39; 182-184)

marco conservado consenso del subgrupo III de VL kappa humano (SEQ ID NO: 40; 185-187)

marco conservado consenso del subgrupo IV de VL kappa humano (SEQ ID NO: 41; 188-190)

La Figura 7 representa secuencias de región marco conservada de cadenas ligeras y pesadas de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos según Kabat.

La Figura 8 representa secuencias de región marco conservada variantes/modificadas de cadenas pesadas y ligeras de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat. Las posiciones/aminoácidos modificados están subrayados.

Modos de llevar a cabo la invención

La invención proporciona métodos nuevos, no convencionales, muy simplificados y flexibles para diversificar secuencias de HVR (incluyendo secuencias de dominio variable de anticuerpo) basándose en una secuencia molde fuente que comprende secuencias consenso de HVR/CDR, y bibliotecas que comprenden una multiplicidad, en general una gran multiplicidad de HVR diversificadas (incluyendo secuencias de dominio variable de anticuerpos). Dichas bibliotecas proporcionan bibliotecas combinatorias útiles para, por ejemplo, seleccionar y/o explorar con respecto a clones de anticuerpos sintéticos con actividades deseables tales como afinidades y avidedces de unión. Estas bibliotecas son útiles para identificar secuencias polipeptídicas de inmunoglobulina que son capaces de interactuar con cualquiera de una amplia diversidad de antígenos diana. Por ejemplo, las bibliotecas que comprenden polipéptidos de inmunoglobulina diversificados de la invención expresados como presentaciones en fagos son particularmente útiles para, y proporcionan sistemas de alto rendimiento, eficaces y automatizables para seleccionar y/o explorar con respecto a moléculas de unión a antígeno de interés. Los métodos de la invención se diseñan para proporcionar agentes de unión de alta afinidad para antígenos diana con cambios mínimos a una molécula fuente o molde y proporcionan buenos rendimientos de producción cuando el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno se producen en cultivo celular.

Los métodos y composiciones de la invención proporcionan numerosas ventajas adicionales. Por ejemplo, pueden generarse secuencias de HVR variantes relativamente sencillas, usando conjuntos de codones que codifican una prevalencia sesgada de aminoácidos, conservando al mismo tiempo suficiente diversidad de secuencias de unión a diana únicas. La naturaleza simplificada de las poblaciones de secuencia generadas de acuerdo con la invención permite una diversificación adicional una vez que se ha identificado que una población, o subpoblación de la misma, posee las características deseadas.

Definiciones

Se representan en el presente documento aminoácidos como un código de una única letra o como el código de tres letras o ambos.

La expresión "purificación de afinidad" significa la purificación de una molécula basada en una atracción específica o unión de la molécula con un producto químico o un compañero de unión para formar una combinación o un complejo que permite que la molécula se separe de impurezas permaneciendo al mismo tiempo unido o atraído al resto compañero.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales individuales (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos con afinidad madurada, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, así como fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, scFv y Fv), siempre que muestren la actividad biológica deseada. En una realización, el término "anticuerpo" también incluye anticuerpos humanos.

La expresión "región hipervariable" "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Varias delineaciones de región hipervariable están en uso y están abarcadas en el presente documento. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En algunos casos, y como se usa en el presente documento, HVR y CDR son términos que se usan indistintamente. Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35

55

(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H1101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los restos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionado anteriormente para cada una de estas definiciones.

Los restos de "marco conservado" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se definen en el presente documento.

La expresión "numeración de resto de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácido como en Kabat", y variaciones de las mismas, se refiere al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a una acortamiento de, una inserción en, una FR o HVR de dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo restos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de FR de cadena pesada. La numeración de restos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "convencional".

Las "regiones marco conservadas" (en lo sucesivo en el presente documento FR) son los restos de dominio variable distintos de los restos de HVR. Cada dominio variable normalmente tiene cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las HVR se definen de acuerdo con Kabat, los restos de FR de cadena ligera se sitúan aproximadamente en los restos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) y 98-107 (LCFR4) y los restos de FR de cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) en los restos de cadena pesada. Si las HVR comprenden restos de aminoácidos de bucles hipervariables, los restos de FR de cadena ligera se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) en la cadena ligera y los restos de FR de cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) en los restos de cadena pesada. En algunos casos, cuando la HVR comprende aminoácidos tanto de una CDR como se define por Kabat como los de un bucle hipervariable, los restos de FR pueden ajustarse en consecuencia. Por ejemplo, cuando HVR-H1 incluye aminoácidos H26-H35, los restos de FR1 de cadena pesada están en las posiciones 1-25 y los restos de FR2 están en las posiciones 36-49.

Como se usa en el presente documento, "conjunto de codones" se refiere a un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usados para codificar aminoácidos variantes deseados. Puede sintetizarse un conjunto de oligonucleótidos, por ejemplo, por síntesis de fase sólida, incluyendo secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. Una forma convencional de designación de codones es la del código IUB, que se conoce en la técnica y se describe en el presente documento. Un conjunto de codones normalmente está representado por 3 letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* y similares. La síntesis de oligonucleótidos con "degradación" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones se conoce bien en la técnica, por ejemplo, el enfoque de TRIM (Knappek *et al.*; *J. Mol. Biol.* (1999), 296: 57-86); Garrard y Henner, *Gene* (1993), 128: 103). Dichos conjuntos de oligonucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácido nucleico comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen un conjunto de codones particular incluirá normalmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se usan de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir, pero no incluyen necesariamente, sitios de enzimas de restricción útiles para, por ejemplo, fines de clonación.

La expresión "conjunto de codones preferentes", y variaciones de la misma, como se usa en el presente documento se refiere a un conjunto de codones que codifica un número predeterminado de aminoácidos, en el que hay un sesgo de la prevalencia en el aminoácido específico que se codifica. Dichos conjuntos de codones preferentes se usan para conseguir diversidades diseñadas para selección aleatoria en posiciones seleccionadas en una HVR en métodos y composiciones de la invención. Un método bien establecido para conseguir un sesgo en la codificación de un aminoácido deseado entre un número predeterminado de aminoácidos codificado por un conjunto de codones se basa en el uso de codones trinucleotídicos. Véase, por ejemplo, Knappik *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2000), 296: 57-86. En una realización de la invención, se diseñan conjuntos de codones preferentes para que no codifiquen cisteína. Se

ejemplifican diversidades diseñadas y conjuntos de codones preferentes en la Figura 4. Por ejemplo, el conjunto de codones preferentes designado 5/6/7 codifica cada uno de G, S e Y a una prevalencia teórica de aproximadamente 19.2 %, respectivamente, siendo la prevalencia teórica de los 16 tipos de aminoácidos de origen natural restantes (sin cisteína) de aproximadamente 2,5 %. Este conjunto de codones preferentes es una combinación de 3 conjuntos de codones preferentes: conjunto de codones 5, que codifica G a una prevalencia teórica de aproximadamente 52,5 %, y 2,5 % para los 16 tipos de aminoácidos de origen natural restantes (sin cisteína); conjunto de codones 6, que codifica S a una prevalencia teórica de aproximadamente 52,5 %, y 2,5 % para los 16 tipos de aminoácidos de origen natural restantes (sin cisteína); y conjunto de codones 7, que codifica Y a una prevalencia teórica de aproximadamente 52,5 %, y 2,5 % para los 16 tipos de aminoácidos de origen natural restantes (sin cisteína). La determinación de codones preferentes adecuados, y la identificación de aminoácidos específicos codificados por un codón preferente particular, se conocen bien y resultaría evidente para un experto en la materia. La determinación de conjuntos de aminoácidos adecuados para usar para diversificación de una secuencia de HVR puede ser empírica y/o guiarse por criterios conocidos en la técnica (por ejemplo, inclusión de una combinación de tipos de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos, etc.).

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo en scFv. Las tres CDR de cada dominio variable interactúan en esta configuración para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . De forma colectiva, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque habitualmente a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento "Fab" contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ comprenden un par de fragmentos Fab que se unen en general de forma covalente cerca de sus extremos carboxilo terminales por cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen en la técnica otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión de antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol 113, Rosenburg y Moore eds. SpringerVerlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H y V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos más completamente, por ejemplo, en los documentos, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, Protein Eng., 8 (10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H - C_H1 - V_H - C_H1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

"Célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente en el presente documento y dichas designaciones incluyen toda la descendencia de una célula o línea celular. Por lo tanto, por ejemplo, expresiones como "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica con respecto a la que se ha explorado en la célula transformada originalmente. Cuando se pretende tener designaciones distintas, resultará evidente a partir del contexto.

Las "secuencias de control" cuando se refieren a expresión significa secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión a ribosomas y, posiblemente, otras secuencias aún escasamente entendidas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

La expresión "proteína de la cubierta" significa una proteína, al menos una parte de la cual está presente en la superficie de la partícula viral. Desde una perspectiva funcional, una proteína de cubierta es cualquier proteína que

se asocia con una partícula viral durante el proceso de ensamblaje viral en una célula hospedadora, y permanece asociada con el virus ensamblado hasta que infecta otra célula hospedadora. La proteína de cubierta puede ser la proteína de cubierta mayor o puede ser una proteína de cubierta menor. Una proteína de cubierta "mayor" es generalmente una proteína de cubierta que está presente en la cubierta viral preferentemente a al menos aproximadamente 5, más preferentemente al menos aproximadamente 7, aún más preferentemente al menos aproximadamente 10 copias de la proteína o más. Una proteína de cubierta mayor puede estar presente en decenas, centenares o incluso miles de copias por virión. Un ejemplo de una proteína de cubierta mayor es la proteína p8 del fago filamentoso.

El "límite de detección" para una entidad química en un ensayo particular es la concentración mínima de esa entidad que puede detectarse por encima del nivel de fondo para ese ensayo. Por ejemplo, en el ELISA de fagos, el "límite de detección" para un fago particular que presenta un fragmento de unión a antígeno particular es la concentración del fago a la que el fago particular produce una señal de ELISA por encima de la producida por un fago de control que no presentan el fragmento de unión a antígeno.

Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos partes unidas covalentemente entre sí, en el que cada una de las partes es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una propiedad química o física sencilla, tal como unión con un antígeno diana, catálisis de una reacción, etc. Las dos partes pueden unirse directamente por un único enlace peptídico o mediante un enlazador peptídico que contiene uno o más restos de aminoácidos. En general, las dos partes y el enlazador estarán en fase de lectura entre sí. Preferentemente, las dos partes del polipéptido se obtienen de polipéptidos heterólogos o diferentes.

"ADN heterólogo" es cualquier ADN que se introduce en una célula hospedadora. El ADN puede derivar de diversas fuentes incluyendo ADN genómico, ADNc, ADN sintético y fusiones o combinaciones de estos. El ADN puede incluir ADN de la misma célula o el mismo tipo celular que la célula hospedadora o receptora o ADN de un tipo celular diferente, por ejemplo, de un mamífero o una planta. El ADN puede incluir, opcionalmente, genes marcadores o de selección, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a temperatura, etc.

Como se usa en el presente documento, "posición altamente diversa" se refiere a una posición de un aminoácido localizado en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas que tienen varios aminoácidos diferentes representados en la posición cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno conocidos y/o de origen natural. Las posiciones altamente diversas están normalmente en las regiones CDR. En un aspecto, la capacidad para determinar posiciones altamente diversas en anticuerpos conocidos y/o de origen natural se facilita por los datos proporcionados por Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Una base de datos basada en Internet localizadas en <http://im-muno.bme.nwu.edu> proporciona una colección extensiva y alineamiento de secuencias de cadena ligera y pesada humanas y facilita la determinación de posiciones altamente diversas en estas secuencias. Como se usa en el presente documento, una posición de aminoácido es altamente diversa si tiene preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 11, preferentemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 y preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 variaciones de restos de aminoácidos posibles diferentes en esa posición. Opcionalmente, una posición de aminoácido es altamente diversa si tiene preferentemente al menos aproximadamente 2, preferentemente al menos aproximadamente 4, preferentemente al menos aproximadamente 6 y preferentemente al menos aproximadamente 8 variaciones de restos de aminoácidos posibles diferentes en esa posición.

Como se usa en este documento, "biblioteca" se refiere a una pluralidad de secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, polipéptidos de la invención), o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, siendo las secuencias diferentes en la combinación de aminoácidos variantes que se introducen en estas secuencias de acuerdo con los métodos de la invención.

El "ligamiento" es el proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico. Para ligamiento de los dos fragmentos, los extremos de los fragmentos deben ser compatibles entre sí. En algunos casos, los extremos serán directamente compatibles después de digestión con endonucleasa. Sin embargo, puede ser necesario en primer lugar convertir los extremos escalonados habitualmente producidos después de digestión con endonucleasa en extremos romos para hacerlos compatibles para ligamiento. Para hacer los extremos romos, el ADN se trata en un tampón adecuado durante al menos 15 minutos a 15 °C con aproximadamente 10 unidades del fragmento de Klenow de ADN polimerasa I o ADN polimerasa T4 en presencia de los cuatro desoxirribonucleótido trifosfatos. El ADN se purifica después por extracción de fenol-cloroformo y precipitación de etanol o por purificación en sílice. Los fragmentos de ADN que se van a ligar entre sí se ponen en solución en cantidades aproximadamente equimolares. La solución también contendrá ATP, tampón de ligasa y una ligasa tal como ADN ligasa T4 a aproximadamente 10 unidades por cada 0,5 µg de ADN. Si el ADN se va a ligar en un vector, el vector se linealiza en primer lugar por digestión con la endonucleasa o las endonucleasas de restricción apropiadas. El fragmento linealizado se trata después con fosfatasa alcalina bacteriana o fosfatasa intestinal de ternero para evitar el autoligamiento durante la etapa de ligamiento.

Una "mutación" es una supresión, inserción o sustitución de un nucleótido o nucleótidos en relación con una

secuencia de nucleótidos de referencia tal como una secuencia de tipo silvestre.

Como se usa en el presente documento, los anticuerpos “naturales” o “de origen natural”, se refieren a anticuerpos identificados de una fuente no sintética, por ejemplo, de un linfocito B específico de antígeno diferenciado obtenido *ex vivo*, o su línea celular de hibridoma correspondiente o de anticuerpos obtenidos del suero de un animal. Estos anticuerpos pueden incluir anticuerpos generados en cualquier tipo de respuesta inmunitaria, bien natural o bien inducida de otro modo. Los anticuerpos naturales incluyen las secuencias de aminoácidos, y las secuencias de nucleótidos que constituyen o codifican estos anticuerpos, por ejemplo, como se identifica en la base de datos de Kabat. Como se usa en el presente documento, los anticuerpos naturales son diferentes de los “anticuerpos sintéticos”, haciendo referencia los anticuerpos sintéticos a secuencias de anticuerpos que se han cambiado de una fuente o secuencia molde, por ejemplo, mediante el reemplazo, la supresión o la adición de un aminoácido, o más de un aminoácido, en una cierta posición con un aminoácido diferente, proporcionando el aminoácido diferente una secuencia de anticuerpo diferente de la secuencia de anticuerpo fuente.

“Unido operativamente” cuando se refiere a ácidos nucleicos significa que los ácidos nucleicos se colocan en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder secretor está unido operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente con una secuencia codificante si se sitúa para facilitar la traducción. En general, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contingentes y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. Se consigue enlace por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, los adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

“Presentación en fagos” es una técnica por la que se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión para al menos una parte de proteína de cubierta en la superficie del fago, por ejemplo, fago filamentoso, partículas. Una utilidad de presentación en fagos está en el hecho de que bibliotecas grandes de variantes proteicas aleatorias pueden clasificarse rápida y eficazmente con respecto a las secuencias que se unen con un antígeno diana con alta afinidad. Se ha usado presentación de bibliotecas peptídicas y proteicas en fagos para explorar millones de polipéptidos con respecto a los que tengan propiedades de unión específicas. Se han usado métodos de presentación en fagos polivalentes para presentar péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas mediante fusiones con el gen III o el gen VIII de fago filamentoso. Wells y Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3: 355-362 (1992), y referencias citadas en la misma. En la presentación en fago monovalente, se fusiona una biblioteca de proteínas o péptidos con un gen III o una parte del mismo, y se expresa a bajos niveles en presencia de proteína del gen III de tipo silvestre de modo que las partículas de fagos presenten una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Se reducen los efectos de avididad en relación con fago polivalente de modo que la clasificación se base en la afinidad de ligando intrínseca, y se usan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman y Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991).

Un “fagémido” es un vector plasmídico que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, Co1E1 y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido puede usarse en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófago filamentoso y bacteriófago lambdaoide. El plásmido también contendrá generalmente un marcador seleccionable para resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN clonado en estos vectores pueden propagarse como plásmidos. Cuando las células que albergan estos vectores están provistas de todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a replicación en círculo rodante para generar copias de una cadena del ADN plasmídico y partículas de fagos empaquetadas. El fagémido puede formar partículas de fagos infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de cubierta de fago o fragmento del mismo unido con un gen de polipéptido heterólogo como una fusión génica de modo que el polipéptido heterólogo se presenta en la superficie de la partícula de fago.

La expresión “vector de fago” significa una forma replicativa bicatenaria de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y capacidad de replicación. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación de fagos y formación de partículas de fagos. El fago es preferentemente un bacteriófago filamentoso, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado del mismo, o un fago lambdaoide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado del mismo.

Los “oligonucleótidos” son polidesoxinucleótidos de longitud corta, mono o bicatenarios que se sintetizan químicamente por métodos conocidos (tales como química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita, usando técnicas de fase sólida tales como las descritas en el documento EP 266.032 publicado el 4 de mayo de 1988, o mediante intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato como se describe en Froeshler *et al*, *Nucl Acids, Res.*, 14: 5399-5407 (1986)). Los métodos adicionales incluyen la reacción en cadena de la polimerasa definida posteriormente y otros métodos de autocebadores y síntesis de oligonucleótidos en soportes sólidos. Todos estos métodos se describen en Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989). Estos métodos se usan si se conoce la secuencia de ácido nucleico completa del gen, o está disponible la secuencia del ácido nucleico complementario de la cadena codificante. Como alternativa, si la secuencia de aminoácidos diana se conoce, se pueden inferir secuencias de

ácido nucleico potenciales usando restos codificantes conocidos y preferidos para cada resto de aminoácido. Los oligonucleótidos pueden purificarse en geles de poliacrilamida o columnas de separación por tamaños moleculares o por precipitación.

- 5 El ADN se “purifica” cuando el ADN se separa de impurezas distintas de ácido nucleico. Las impurezas pueden ser polares, no polares, iónicas, etc.

10 Un “anticuerpo fuente”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno cuya secuencia de unión a antígeno sirve como la secuencia molde sobre la que se realiza diversificación de acuerdo con los criterios descritos en el presente documento. Una secuencia de unión a antígeno generalmente incluye una región variable de anticuerpo, preferentemente al menos una CDR, preferentemente incluyendo regiones marco conservadas.

15 Como se usa en el presente documento, “posición accesible al disolvente” se refiere a una posición de un resto de aminoácido en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo fuente o fragmento de unión a antígeno que se determina, basándose en la estructura, conjunto de estructuras y/o estructura modelada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como potencialmente disponible para acceso al disolvente y/o contacto con una molécula, tal como un antígeno específico de anticuerpo. Estas posiciones se encuentran normalmente en las CDR y en el exterior de la proteína. Las posiciones accesibles al disolvente de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como se define en el presente documento, pueden determinarse usando cualquiera de varios algoritmos conocidos en la técnica. Preferentemente, las posiciones accesibles al disolvente se determinan usando coordenadas de un modelo tridimensional de un anticuerpo (o parte del mismo, por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo, o segmento o segmentos de CDR), preferentemente usando un programa informático tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). También pueden determinarse posiciones accesibles al disolvente usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards, *J. Mol. Biol.* 55, 379 (1971) y Connolly, *J. Appl. Cryst* 16, 548 (1983)). Puede realizarse determinación de posiciones accesibles al disolvente usando software adecuado para modelización de proteínas e información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo (o parte del mismo). El software que puede utilizarse para estos fines incluye software de Módulos de biopolímeros SYBYL (Tripos Associates). En general y preferentemente, cuando un algoritmo (programa) requiere un parámetro de tamaño introducido por el usuario, el “tamaño” de una sonda que se usa en el cálculo se establece en aproximadamente 1,4 Angstrom de radio o menor. Además, se ha descrito determinación de regiones accesibles al disolvente y métodos de área usando software para ordenadores personales en Pacios ((1994) “ARVOMOL/CONTOUR: molecular surface areas and volumes on Personal Computers.” *Comput. Chem.* 18(4): 377-386; y (1995). “Variations of Surface Areas and Volumes in Distinct Molecular Surfaces of Biomolecules.” *J. Mol. Model.* 1: 46-53.)

40 Un “elemento regulador de la transcripción” contendrá uno o más de los siguientes componentes: un elemento potenciador, un promotor, una secuencia operadora, un gen represor y una secuencia de terminación de la transcripción. Estos componentes se conocen bien en la técnica. Patente de Estados Unidos n.º 5.667.780.

Un “transformante” es una célula que ha captado y mantenido ADN como se demuestra por la expresión de un fenotipo asociado con el ADN (por ejemplo, resistencia a antibióticos conferida por una proteína codificada por el ADN).

45 “Transformación” significa un proceso por el que una célula capta ADN y se convierte en un “transformante”. La captación de ADN puede ser permanente o transitoria.

50 Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

55 Un anticuerpo “con afinidad madurada” es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa alteración o esas alteraciones. Los anticuerpos con afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Se producen anticuerpos con afinidad madurada por procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* *BiolTechnology* 10: 779-783 (1992) describe maduración de afinidad por redistribución de dominios VH y VL. Se describe mutagénesis aleatoria de restos de CDR y/o marco conservado en: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

65 Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Los anticuerpos de bloqueo preferidos o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un “anticuerpo agonista”, como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las

actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Para aumentar la semivida de los anticuerpos o polipéptido que contiene las secuencias de aminoácido de la presente invención, se puede unir un epítipo de unión a receptor de recuperación con el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión a receptor de recuperación puede unirse en fase con un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de la presente invención de modo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico modificada técnicamente comprenda el epítipo de unión a receptor de recuperación y una secuencia polipeptídica de la presente invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG (por ejemplo, Ghetie, V *et al.*, (2000) *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766, Tabla 1). También se describen anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas en suero aumentadas en los documentos WO00/42072 (Presta, L.), WO 02/060919; Shields, R. L., *et al.*, (2001) *JBC* 276(9): 6591-6604; Hinton, P. R., (2004) *JBC* 279(8): 6213-6216). En otra realización, la semivida en suero también puede aumentarse, por ejemplo, uniendo otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, pueden unirse anticuerpos u otros polipéptidos que contengan las secuencias de aminoácidos con albúmina de suero o una parte de albúmina de suero que se une con el receptor FcRn o un péptido de unión a albúmina de suero de modo que la albúmina de suero se una con el anticuerpo o polipéptido, por ejemplo, dichas secuencias polipeptídicas se desvelan en el documento WO01/45746. En una realización preferida, el péptido de albúmina de suero para unir comprende una secuencia de aminoácidos de DICLPRWGCLW. La semivida de un Fab puede aumentarse por estos métodos. Véase también, Dennis, M.S., *et al.*, (2002) *JBC* 277(38): 35035-35043 para secuencias peptídicas de unión a albúmina de suero.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye enfermedades o trastornos crónicos y agudos incluyendo las condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos para tratar en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; tumores malignos distintos de leucemias y linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrófágicos, epiteliales, del estroma y del blastocele; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros relacionados con la angiogénesis.

Las expresiones "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con algún grado de proliferación celular anómala. Por ejemplo, el trastorno proliferativo celular puede ser cáncer.

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento celular neoplásico y proliferación, bien maligna o benigna, y todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos. Las expresiones "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en el presente documento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B, cáncer de cerebro, así como de cabeza y cuello, y metástasis asociadas.

La desregulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que pueden tratarse por composiciones y métodos descritos en el presente documento. Estos trastornos incluyen afecciones tanto neoplásicas como no neoplásicas. Las neoplásicas incluyen pero sin limitación las descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen pero sin limitación hipertrofia indeseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas psoriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatías diabéticas y otras proliferativas incluyendo retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización de la córnea, neovascularización de injerto de la córnea, rechazo de injerto de la córnea, neovascularización retiniana/coloidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante de tejido corneano y otros, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/SDRA, septicemia, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado con ictus agudo/lesión de cabeza cerrada/traumatismo), inflamación sinovial, formación de cataratas en RA, miositis

osificante, formación de hueso hipertrófico, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, tercera separación de enfermedades de fluidos (pancreatitis, síndrome de compartimento, quemaduras, enfermedad del intestino), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica tal como EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome nefrótico, crecimiento de masa tisular indeseada o aberrante (no canceroso), lesiones hemófilas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del cabello, síndrome de Osler-Weber, fibroplasias retrolentales de granuloma piógeno, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, líquido ascítico, efusión pericárdica (tal como la asociada con pericarditis) y efusión pleural.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” se refiere a intervención clínica en un intento de alterar el ciclo natural del individuo o la célula que se trata, y puede realizarse bien para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen evitar la aparición o reaparición de enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, reducción de la velocidad de progresión de enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. Los anticuerpos pueden usarse para retardar el desarrollo de una enfermedad o un trastorno.

Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una sustancia/molécula, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente pero no necesariamente, ya que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en un estadio anterior de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², p³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Se describen otros agentes citotóxicos posteriormente. Un agente tumoricida provoca destrucción de células tumorales.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida Cytoxan®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, Marinol®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, cazelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, carbinaficina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomocinas, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, cactinomicina, carbinomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina,

5 enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una
 10 epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbicina; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina;
 15 tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, Roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), formulación de paclitaxel en nanopartículas modificadas técnicamente con albúmina, sin Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como
 20 cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una
 25 abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir
 25 los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer, y están con frecuencia en forma de tratamiento sistémico, o de cuerpo completo. Pueden ser hormonas en sí mismas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno Nolvadex®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores negativos de receptores de
 30 estrógenos (ERD); agentes que actúan para suprimir o detener los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolide LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las
 35 glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo,
 BONEFOS® u OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; así como
 40 troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna
 LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (una molécula pequeña inhibidora de tirosina quinasa doble ErbB-2 y EGFR también conocida como
 45 GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una
 50 composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento depende de la actividad de una molécula diana de interés, bien *in vitro* o bien *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células dependientes de moléculas diana en fase S. Los ejemplos de
 55 agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se
 60 extienden a detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo
 65 celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos" de Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

"Doxorubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.
 65

Una "variante" o un "mutante" de un polipéptido de partida o de referencia (por ejemplo, un anticuerpo fuente o su dominio o sus dominios variables/CDR), tal como una proteína de fusión (polipéptido) o un polipéptido heterólogo (heterólogo de un fago), es un polipéptido que 1) tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la del polipéptido de partida o de referencia y 2) derivó del polipéptido de partida o de referencia mediante su mutagénesis natural o artificial (realizada por el hombre). Dichas variantes incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés. Por ejemplo, un polipéptido de fusión generado usando un oligonucleótido que comprende un conjunto de codones preferentes que codifica una secuencia con un aminoácido variante (con respecto al aminoácido hallado en la posición correspondiente en un anticuerpo/fragmento de unión a antígeno fuente) sería un polipéptido variante con respecto a un anticuerpo y/o fragmento de unión a antígeno fuente y/o CDR. Por lo tanto, una CDR variante se refiere a una CDR que comprende una secuencia variante con respecto a una secuencia polipeptídica de partida o de referencia (tal como la de un anticuerpo fuente y/o fragmento de unión a antígeno y/o CDR). Un aminoácido variante, en este contexto, se refiere a un aminoácido diferente del aminoácido en la posición correspondiente en una secuencia polipeptídica de partida o de referencia (tal como la de un anticuerpo y/o fragmento de unión a antígeno fuente y/o CDR). Puede realizarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la variante o construcción mutante final, siempre que la construcción final posea las características funcionales deseadas. En algunos de los ejemplos descritos en el presente documento, las secuencias de unión contienen mutaciones puntuales tales como supresiones o adiciones. Por ejemplo, un clon de VEGF de la biblioteca de YADS muestra una Q ausente en CDRL3 que no fue el resultado de construcción de vector. En otro ejemplo, la Q en la posición 89 de la CDRL3 4D5 se suprimió intencionalmente en la construcción del vector. Los cambios de aminoácidos pueden alterar procesos postraduccionales del polipéptido, tal como cambiando el número o la posición de sitios de glucosilación. Se describen métodos para generar variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos en la Patente de Estados Unidos n.º 5.534.615.

Una secuencia de "tipo silvestre" o de "referencia" o la secuencia de una proteína/polipéptido de "tipo silvestre" o "de referencia", tal como una proteína de cubierta, o una CDR o dominio variable de un anticuerpo fuente, puede ser la secuencia de referencia de la que los polipéptidos variantes derivan mediante la introducción de mutaciones. En general, la secuencia de "tipo silvestre" para una proteína dada es la secuencia que es más habitual en la naturaleza. De forma similar, una secuencia génica de "tipo silvestre" es la secuencia para ese gen que se encuentra más habitualmente en la naturaleza. Pueden introducirse mutaciones en un gen de "tipo silvestre" (y por lo tanto la proteína que codifica) mediante procesos naturales o mediante medios inducidos por el hombre. Los productos de dichos procesos son formas "variantes" o "mutantes" de la proteína o el gen de "tipo silvestre" original.

Un "pluralidad" de una sustancia, tal como un polipéptido o polinucleótido, como se usa en el presente documento, se refiere en general a una colección de dos o más tipos o variedades de la sustancia. Existen dos o más tipos o variedades de una sustancia si dos o más de las sustancias difieren entre sí con respecto a una característica particular, tal como el aminoácido variante hallado en una posición de aminoácido particular. Por ejemplo, existe una pluralidad de polipéptidos si hay dos o más polipéptidos que son sustancialmente iguales, preferentemente idénticos, en secuencia excepto por la secuencia de una CDR variante o excepto por el aminoácido variante en una posición de aminoácido particular accesible al disolvente y altamente diversa. En otro ejemplo, existe una pluralidad de polinucleótidos si hay dos o más polinucleótidos que son sustancialmente iguales, preferentemente idénticos, en su secuencia excepto por la secuencia que codifica una CDR variante o excepto por la secuencia que codifica un aminoácido variante para una posición de aminoácido particular accesible al disolvente y altamente diversa.

La invención proporciona métodos para generar y aislar nuevos polipéptidos de unión a antígeno diana, tales como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, que pueden tener una alta afinidad por un antígeno seleccionado. Se prepara una pluralidad de polipéptidos de unión diferentes mutando (diversificando) una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas en un dominio variable de cadena ligera y/o dominio variable de cadena pesada de anticuerpo fuente con conjuntos de codones seleccionados (por ejemplo, preferentes) para generar una biblioteca con aminoácidos variantes en al menos una secuencia de CDR, en el que el número de tipos de aminoácidos variantes se mantiene al mínimo (es decir, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos o solamente 2, pero generalmente al menos 2). Las posiciones de aminoácidos incluyen las que son accesibles al disolvente, por ejemplo como se determina analizando la estructura de un anticuerpo fuente, y/o que son altamente diversas entre polipéptidos de inmunoglobulina conocidos y/o de origen natural. Una ventaja adicional aportada por la naturaleza limitada de la diversificación es que posiciones de aminoácidos adicionales distintas de las que son altamente diversas y/o accesibles al disolvente puede también diversificarse de acuerdo con la necesidad o el deseo del practicante; se describen ejemplos en el presente documento.

Las posiciones de aminoácidos que son accesibles al disolvente y altamente diversas son preferentemente las de las regiones HVR en los dominios variables de anticuerpo seleccionados del grupo que consiste en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, y mezclas de los mismos. Las posiciones de aminoácidos se mutan cada una usando un conjunto de codones seleccionado (por ejemplo, preferentes) que codifican un número predeterminado de aminoácidos. Las secuencias de HVR también pueden diversificarse variando la longitud, por ejemplo, para HVR-H3, pueden generarse regiones HVR-H3 variantes que tienen diferentes longitudes y/o se seleccionan aleatoriamente en posiciones seleccionadas usando conjuntos de codones preferentes.

La diversidad de la biblioteca de los polipéptidos que comprenden HVR variantes se diseña usando conjuntos de codones seleccionados que codifican un número predeterminado de aminoácidos con una prevalencia sesgada de cierto aminoácido, de modo que se introduzca una probabilidad deseada de un aminoácido seleccionado (y por lo tanto diversas secuencias seleccionada) en una HVR. El número de posiciones mutadas en la HVR se minimiza y los aminoácidos variantes en cada posición se diseñan para incluir un número limitado de aminoácidos. Preferentemente, se usa un único anticuerpo, incluyendo al menos una HVR, como el anticuerpo fuente. Es sorprendente que una biblioteca de dominios variables de anticuerpo que tienen diversidad de secuencias y tamaños puede generarse usando un único anticuerpo fuente como un molde que comprende secuencias de HVR consenso, y dirigiendo diversidad a posiciones particulares usando un número limitado y sesgado de forma no convencional de sustituciones de aminoácidos.

Diseño de diversidad de dominios variables de anticuerpo

En un aspecto de la invención, se generan bibliotecas de alta calidad de dominios variables de anticuerpos. Las bibliotecas tienen diversidad sesgada de diferentes secuencias de secuencias de HVR, por ejemplo, diversidad de los dominios variables de anticuerpo. Las bibliotecas incluyen dominios variables de anticuerpo de unión de alta afinidad para uno o más antígenos, incluyendo, por ejemplo, neutravidina, una proteína de apoptosis (AP), proteína de unión a maltosa 2 (MBP2), erbina-GST, insulina, VEGF murino y humano. La diversidad de la biblioteca se diseña seleccionando posiciones de aminoácidos que son accesibles al disolvente y altamente diversas en un único anticuerpo fuente y mutando esas posiciones en al menos una HVR usando conjuntos de codones preferentes.

Un anticuerpo fuente es un anticuerpo que comprende HVR consenso humanas con secuencias marco conservadas del anticuerpo anti-HER2 huMAb4D5-8 (véase Figura 7/8), pero los métodos para diversificación pueden aplicarse a otros anticuerpos fuente cuya secuencia se conoce. Un anticuerpo fuente puede ser un anticuerpo de origen natural, anticuerpo sintético, anticuerpo recombinante, anticuerpo humanizado, anticuerpo derivado de línea germinal, anticuerpo quimérico, anticuerpo de afinidad madurada o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos pueden obtenerse de diversas especies mamíferas incluyendo seres humanos, ratones y ratas. En algunas realizaciones, un anticuerpo fuente es un anticuerpo que se obtiene después de uno o más ciclos de exploración de afinidad iniciales, pero antes de una etapa o etapas de maduración de afinidad. Un anticuerpo fuente puede seleccionarse o modificarse para proporcionar alto rendimiento y estabilidad cuando se produce en cultivo celular.

El anticuerpo 4D5 es un anticuerpo humanizado específico para antígeno asociado a cáncer conocido como Her-2 (erbB2). El anticuerpo incluye dominios variables que tienen regiones marco conservadas consenso; algunas posiciones se revierten a secuencia de ratón durante el proceso de aumento de la afinidad del anticuerpo humanizado. La secuencia y estructura cristalina del anticuerpo humanizado 4D5 se han descrito en el documento U.S. 6.054.297, Carter *et al*, PNAS 89: 4285 (1992), la estructura cristalina se muestra en J Mol. Biol. 229: 969 (1993) y en línea en [www.ncbi.nlm.nih.gov/structure.mmdb\(MMDB#s-990-992\).or](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/mmdb(MMDB#s-990-992).or) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=Structure> usando el término "4D5" como la consulta.

Un criterio para generar diversidad en dominios variables de anticuerpos es mutar restos en posiciones que son accesibles al disolvente (como se ha definido anteriormente). Estas posiciones se encuentran normalmente en las CDR y están normalmente en el exterior de la proteína. Preferentemente, las partes accesibles al disolvente se determinan usando coordenadas de un modelo tridimensional de un anticuerpo, usando un programa informático tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). Las posiciones accesibles al disolvente también pueden determinarse usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards, J. Mol. Biol. 55, 379 (1971) y Connolly, J. Appl. Cryst. 16,548 (1983)). La determinación de posiciones accesibles al disolvente puede realizarse usando software adecuado para modelización de proteínas e información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo. El software que puede utilizarse para estos fines incluye software de Módulo de biopolímeros SYBYL (Tripos Associates). En general y preferentemente, cuando un algoritmo (programa) requiere un parámetro de tamaño introducido por el usuario, el "tamaño" de una sonda que se usa en el cálculo se establece a un radio de aproximadamente 1,4 Angstrom o menor. Además, se ha descrito la determinación de regiones accesibles al disolvente y métodos de área usando software para ordenadores personales en Pacios ((1994) "ARVOMOL/CONTOUR: molecular surface areas and volumes on Personal Computers", Comput. Chem. 18(4): 377-386; y "Variations of Surface Areas and Volumes in Distinct Molecular Surfaces of Biomolecules". J. Mol. Model. (1995), 1: 46-53).

En algunos casos, la selección de restos accesibles al disolvente se refina adicionalmente eligiendo restos accesibles al disolvente que forman colectivamente un tramo contiguo mínimo, por ejemplo, cuando el polipéptido de referencia o el anticuerpo fuente está en su estructura tridimensional plegada. Por ejemplo, un tramo contiguo compacto (mínimo) se forma por restos seleccionados para CDRH1/H2/H3/L1/L2/L3 de 4D5 humanizado. Un tramo contiguo compacto (mínimo) puede comprender solamente un subconjunto (por ejemplo, 2-5 CDR) del intervalo completo de CDR, por ejemplo, CDRH1/H2/H3/L3. Los restos accesibles al disolvente que no contribuyen a la formación de dicho tramo pueden excluirse opcionalmente de la diversificación. El refinamiento de la selección por este criterio permite que el practicante minimice, según se desee, el número de restos para diversificar. Por ejemplo, el resto 28 en H1 puede excluirse opcionalmente en la diversificación debido a que está en el límite del tramo. Sin

embargo, también puede usarse este criterio de selección, cuando se desee, para elegir restos para diversificar que pueden no considerarse necesariamente accesibles al disolvente. Por ejemplo, un resto que no se considera accesible al disolvente, pero forma un tramo contiguo en la estructura plegada tridimensional con otros restos que se consideran accesibles al disolvente pueden seleccionarse para diversificación. Un ejemplo de esto es CDRL1-29. La selección de dichos restos resultaría evidente para un experto en la materia, y su adecuación puede determinarse también de forma empírica y de acuerdo con las necesidades y deseos del practicante experto.

Las posiciones accesibles al disolvente identificadas a partir de la estructura cristalina del anticuerpo humanizado 4D5 para cada CDR son las siguientes (posición de resto de acuerdo con Kabat):

CDRL1: 28, 30, 31, 32
 CDRL2: 50, 53
 CDRL3: 91, 92, 93, 94, 96
 CDRH1: 28, 30, 31, 32, 33
 CDRH2: 50, 52, 52A, 53, 54, 55, 56, 57, 58.

Además, en algunas realizaciones, el resto 29 de CDRL1 también puede seleccionarse basándose en su inclusión en un tramo contiguo que comprende otros restos accesibles al disolvente. Todas o un subconjunto de las posiciones accesibles al disolvente como se ha expuesto anteriormente pueden diversificarse en métodos y composiciones de la invención.

Otro criterio para seleccionar posiciones para mutar son las posiciones que muestran variabilidad en la secuencia de aminoácidos cuando se comparan las secuencias de anticuerpos conocidos y/o naturales. Una posición altamente diversa se refiere a una posición de un aminoácido localizado en las regiones variables de las cadenas ligeras o pesadas que tienen varios aminoácidos diferentes representados en la posición cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de anticuerpos/fragmentos de unión a antígeno conocidos y/o naturales. Las posiciones altamente diversas están preferentemente en las regiones HVR. Las posiciones de HVR-H3 se consideran todas altamente diversas. Como se describe en el presente documento, los restos de aminoácidos son altamente diversos si tienen preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 11 (aunque los números pueden variar como se describe en el presente documento) diferentes variaciones de restos de aminoácidos posibles en esa posición.

Opcionalmente la identificación de posiciones altamente diversas en anticuerpos conocidos y/o de origen natural se facilita por los datos proporcionados en Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Una base de datos basada en Internet localizada en <http://immuno.bme.nwu.edu> proporciona una colección extensiva y alineamiento de secuencias de cadena ligera y pesada humanas y facilitan la determinación de posiciones altamente diversas en estas secuencias. La diversidad en las posiciones accesibles al disolvente del anticuerpo humanizado 4D5 en cadenas ligeras y pesadas conocidas y/o de origen natural se muestra en las Figuras 22 y 23.

En un aspecto de la invención, los restos accesibles al disolvente y altamente diversos en al menos tres, cuatro, cinco o todas las HVR seleccionadas del grupo que consiste en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, H3-HVR, y mezclas de las mismas se mutan (es decir, se seleccionan aleatoriamente usando conjuntos de codones preferentes como se describe en el presente documento). Por ejemplo, puede generarse una población de polipéptidos diversificando al menos un resto accesible al disolvente y/o altamente diverso en HVR-L3 y HVR-H3 usando codones preferentes. En consecuencia, la invención proporciona un gran número de secuencias de anticuerpos nuevas formadas reemplazando al menos una posición accesible al disolvente y altamente diversa de al menos una HVR del dominio variable de anticuerpo fuente con aminoácidos variantes codificados por un codón preferente. Por ejemplo, una HVR variante o dominio variable de anticuerpo puede comprender un aminoácido variante en una o más posiciones de aminoácidos 28, 30, 31, 32 y/o 33 de HVR-H1; y/o en una o más posiciones de aminoácidos 50, 52, 53, 54, 56 y/o 58 de CDRH2; y/o en una o más posiciones de aminoácidos 28, 29, 30 y/o 31 de HVR-L1; y/o en una o más posiciones de aminoácidos 50 y/o 53 en HVR-L2; y/o en una o más posiciones de aminoácidos 91, 92, 93, 94 y/o 96 en HVR-L3. Los aminoácidos variantes en estas posiciones pueden codificarse por conjuntos de codones preferentes, como se describe en el presente documento.

Como se ha analizado anteriormente, los aminoácidos variantes se codifican por conjuntos de codones preferentes. Un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos que pueden usarse para formar un conjunto de oligonucleótidos usados para codificar el grupo deseado de aminoácidos. Un conjunto de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, por síntesis en fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones y que codificará el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con "degradación" de nucleótidos seleccionados en ciertas posiciones se conoce bien en la técnica. Dichos conjuntos de nucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponibles, por ejemplo, de Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen un conjunto de codones particulares incluirá normalmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, estableciéndose las diferencias por el conjunto de codones dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos,

como se usa en el presente documento, tienen secuencias que permiten la hibridación de un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios de enzimas de restricción para fines de clonación.

En un aspecto, el repertorio seleccionado de aminoácidos que se pretende que ocupe una o más de las posiciones accesibles al disolvente y altamente diversas en HVR de un anticuerpo fuente humanizado se determina (basándose en el deseo del practicante, que puede basarse en cualquiera de varios criterios, incluyendo aminoácidos específicos deseados para posiciones particulares, aminoácido o aminoácidos específicos que se desea que estén ausentes de una posición particular, el tamaño de biblioteca deseado, características de agentes de unión a antígeno buscados, etc.).

Las HVR-3 de cadena pesada en anticuerpos conocidos, tienen diversas secuencias, conformaciones estructurales y longitudes. Las HVR-H3 se encuentran con frecuencia en el medio del bolsillo de unión a antígeno y participan con frecuencia en el contacto con antígeno. El diseño de HVR-H3 se desarrolla por tanto preferentemente por separado del de las otras HVR porque puede ser difícil predecir la conformación estructural de HVR-H3 y la diversidad de ácidos nucleicos en esta región es especialmente diversa en anticuerpos conocidos. De acuerdo con la presente invención, HVR-H3 se diseña para generar diversidad en posiciones específicas dentro de HVR-H3 como se reivindica. En algunas realizaciones, también se genera diversidad variando la longitud de HVR-H3 usando conjuntos de codones preferentes. La diversidad de longitud puede ser de cualquier intervalo que se ha determinado empíricamente que sea adecuado para generar una población de polipéptidos que contengan proporciones sustanciales de proteínas de unión a antígeno.

Se contempla que la diversidad de secuencia de bibliotecas creadas por introducción de aminoácidos variantes en una HVR particular, por ejemplo, HVR-H3, puede aumentar combinando la HVR variante con otras HVR que comprenden variaciones en otras regiones del anticuerpo, específicamente en otras HVR de las secuencias variables de cadena ligera o pesada. Se contempla que las secuencias de ácido nucleico que codifican miembros de este conjunto pueden diversificarse adicionalmente por introducción de otros aminoácidos variantes en las HVR de las secuencias de cadena ligera o pesada, mediante conjuntos de codones preferentes. Por lo tanto, por ejemplo, las secuencias de HVR-H3 de polipéptidos de fusión que se unen con un antígeno diana pueden combinarse con secuencias de HVR-L3, HVR-H1 o HVR-H2 diversificadas, o cualquier combinación de HVR diversificadas.

Debería observarse que en algunos casos los restos de marco conservado pueden variarse con respecto a la secuencia de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno fuente, por ejemplo, para reflejar una secuencia consenso o para mejorar la estabilidad o presentación. Por ejemplo, los restos de marco conservado 49, 93, 94 o 71 en la cadena pesada pueden ser variados. El resto de marco conservado de cadena pesada 93 puede ser serina o alanina (que es el aminoácido de secuencia consenso humana en esta posición). El resto de marco conservado de cadena pesada 94 puede cambiarse para reflejar la secuencia consenso de marco conservado de treonina a arginina o lisina. Otro ejemplo de un resto de marco conservado que puede alterarse es el resto de marco conservado de cadena pesada 71, que es R en aproximadamente 1970 polipéptidos, V en aproximadamente 627 polipéptidos y A en aproximadamente 527 polipéptidos, como se encuentra en la base de datos de Kabat. El resto de marco conservado de cadena pesada 49 puede ser alanina o glicina. Además, opcionalmente, los 3 aminoácidos N terminales del dominio variable de cadena pesada pueden retirarse. En la cadena ligera, opcionalmente, la arginina en la posición de aminoácido 66 puede cambiarse a glicina.

Se describen en el presente documento construcciones de vectores para generar polipéptidos de fusión que se unen con afinidad significativa con ligandos potenciales. Estas construcciones comprenden un dominio dimerizable que cuando está presente en un polipéptido de fusión proporciona una tendencia aumentada a que las cadenas pesadas dimericen para formar dímeros de fragmentos/partes de anticuerpos Fab o Fab'. Estos dominios de dimerización pueden incluir, por ejemplo una secuencia bisagra de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia que comprende TCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 58) que puede estar presente en el polipéptido de fusión. Los dominios de dimerización en polipéptidos de fagos de fusión juntan dos conjuntos de polipéptidos de fusión (proteína/fragmento de fago-LC/HC (tal como pIII)), permitiendo de este modo la formación de enlaces adecuados (tales como enlaces disulfuro entre cadenas pesadas) entre los dos conjuntos de polipéptidos de fusión. Las construcciones de vector que contienen dichos dominios de dimerización pueden usarse para conseguir presentación divalente de dominios variables de anticuerpo, por ejemplo las proteínas de fusión diversificadas descritas en el presente documento, en fagos. Preferentemente, la afinidad intrínseca de cada fragmento de anticuerpo monomérico (polipéptido de fusión) no se altera significativamente por fusión con el dominio de dimerización. Preferentemente, la dimerización da como resultado presentación en fagos divalente que proporciona mayor avidez de unión a fago, con reducción significativa en velocidad de disociación, que puede determinarse por métodos conocidos en la técnica y como se describe en el presente documento. Los vectores que contienen dominios de dimerización pueden incluir o no también un codón de terminación ámbar después del dominio de dimerización.

La dimerización puede variarse para conseguir diferentes características de presentación. Los dominios de dimerización pueden comprender una secuencia que comprende un resto de cisteína, una región bisagra de un anticuerpo de longitud completa, una secuencia de dimerización tal como secuencia de cremallera de leucina o secuencia de cremallera GCN4 o mezclas de las mismas. Se conocen en la técnica secuencias de dimerización, e incluyen, por ejemplo, la secuencia de cremallera GCN4 (GRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEV ARLKKL VGERG)

(SEQ ID NO: 3). El dominio de dimerización se localiza preferentemente en el extremo C terminal de la secuencia de dominio variable o constante de cadena pesada y/o entre la secuencia de dominio variable o constante de cadena pesada y cualquier secuencia de componente de proteína de cubierta viral. También puede estar presente un codón de terminación ámbar en el extremo C terminal o después del extremo C terminal del dominio de dimerización.

5 Opcionalmente, cuando está presente un codón de terminación ámbar, el dominio de dimerización codifica al menos una cisteína y una secuencia de dimerización tal como cremallera de leucina. En otra realización, cuando no está presente ningún codón de terminación ámbar, el dominio de dimerización puede comprender un único resto de cisteína.

10 Los polipéptidos descritos en el presente documento también pueden fusionarse con otros tipos de polipéptidos para proporcionar presentación de los polipéptidos variantes o para proporcionar purificación, exploración o clasificación, y detección del polipéptido. Para presentación en fagos, los polipéptidos descritos en el presente documento se fusionan con toda o una parte de una proteína de cubierta viral. Los ejemplos de proteína de cubierta viral incluyen proteína PIII, proteína de cubierta mayor, pVIII, Soc, Hoc, gpD, pVI y variantes de las mismas. Además, los
15 polipéptidos variantes generados pueden fusionarse opcionalmente con un marcador o etiqueta polipeptídicos tales como FLAG, polihistidina, gD, c-myc, B-galactosidasa y similares.

Métodos de generación de bibliotecas de dominios variables aleatorios

20 Se conocen en la técnica diversos métodos para generar bibliotecas de presentación en fagos de las que puede obtenerse un anticuerpo de interés. Un método para generar anticuerpos de interés es mediante el uso de una biblioteca de anticuerpos en fagos como se describe en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073-93.

25 Están bien establecidos en la técnica métodos para sustituir un aminoácido elegido en un ácido nucleico molde, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Por ejemplo, pueden crearse bibliotecas dirigiendo a posiciones accesibles al disolvente y/o altamente diversas en al menos una región CDR para sustitución de aminoácidos con aminoácidos variantes usando el método de Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel *et al.*, Methods Enzymol. (1987), 154: 367-382. También se describe posteriormente en los Ejemplos generación de secuencias aleatorias.

30 La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones preferentes diseñados para diferentes longitudes de CDRH3 o para las posiciones accesibles del disolvente y altamente diversas en una CDR. Un conjunto de codones es un conjunto de secuencias de tripletes de nucleótidos diferentes usadas para codificar aminoácidos variantes deseados. Los conjuntos de codones pueden representarse usando símbolos para designar
35 nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra posteriormente de acuerdo con el código de IUB. Normalmente, un conjunto de codones está representado por tres letras mayúsculas, por ejemplo *KMT*, *TMT* y similares.

Códigos de IUB

40 G Guanina

A Adenina

45 T Timina

C Citosina

50 R (A o G)

Y (C o T)

M (A o C)

55 K (G o T)

S (C o G)

W (A o T)

60 H (A o C o T)

B (C o G o T)

65 V (A o C o G)

D (A o G o T)

N (A o C o G o T)

5 Por ejemplo, en el conjunto de codones *TMT*, T es el nucleótido timina; y M puede ser A o C. este conjunto de codones puede presentar múltiples codones y puede codificar solamente un número limitado de aminoácidos, concretamente tirosina y serina.

10 Pueden sintetizarse conjuntos de oligonucleótidos o cebadores usando métodos convencionales. Puede sintetizarse un conjunto de oligonucleótidos, por ejemplo, por síntesis de fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones preferentes y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos con la prevalencia deseada para aminoácidos seleccionados. Se conoce bien en la técnica la síntesis de oligonucleótidos con "degradación" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones. Dichos conjuntos de oligonucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen un conjunto de codones particular normalmente incluirá una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, estableciéndose las diferencias por el conjunto de codones dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se usan en el presente documento, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de CDR (por ejemplo, como el contenido dentro de un dominio variable) y también pueden incluir sitios de enzimas de restricción para fines de clonación.

25 En un método, pueden crearse secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes por mutagénesis mediada por oligonucleótidos de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido fuente o molde tal como el dominio variable de anticuerpo de 4D5. Esta técnica se conoce bien en este campo como se describe en Zoller *et al.* Nucleic Acids Res. 10: 6487-6504 (1987). Brevemente, se crean secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos variantes hibridando un conjunto de oligonucleótidos que codifica los conjuntos de codones preferentes deseados con un molde de ADN, en el que el molde es la forma monocatenaria del plásmido que contiene una secuencia de molde de ácido nucleico de región variable. Después de hibridación, se usa ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria completa del molde que incorporará por lo tanto el cebador oligonucleotídico, y contendrá los conjuntos de codones preferentes como se proporciona por el conjunto de oligonucleótidos. Se conocen o pueden determinarse fácilmente ácidos nucleicos que codifican otras moléculas fuente o molde.

35 En general, se usan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá al menos 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios con el molde en uno de los lados del nucleótido o los nucleótidos codificantes de la mutación o mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido hibride apropiadamente con la molécula molde de ADN monocatenaria. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en este campo tales como las descritas en Crea *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 5765 (1978).

40 El molde de ADN se genera por los vectores que derivan de vectores de bacteriófago M13 (los vectores disponibles en el mercado M13mp18 y M13mp19 son adecuados), o los vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe en Viera *et al.*, Meth. Enzymol., 153: 3 (1987). Por lo tanto, el ADN que va a mutarse puede insertarse en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

50 Para alterar la secuencia ADN nativa, el oligonucleótido se hibrida con el molde monocatenario en condiciones de hibridación adecuadas. Después se añade una enzima de polimerización de ADN, habitualmente ADN polimerasa T7 o el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, para sintetizar la cadena complementaria del molde usando el oligonucleótido como un cebador para síntesis. Se forma de este modo una molécula heterobycatenaria de modo que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1, y la otra cadena (el molde original) codifica la secuencia nativa, inalterada del gen 1. Esta molécula heterobycatenaria se transforma después en una célula hospedadora adecuada, habitualmente en una procarionta tal como *E. coli* JM101. Después de cultivar las células, se siembran en placas de agarosa y se exploran usando el cebador oligonucleotídico radiomarcado con un 32-fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

60 El método descrito inmediatamente antes puede modificarse de modo que se cree una molécula homobycatenaria en la que ambas cadenas del plásmido contienen la mutación o las mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: el oligonucleótido monocatenario se hibrida con el molde monocatenario como se ha descrito anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTTP), con una tiodesoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que puede obtenerse de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo de molde-oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica al molde excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerlo de la digestión con endonucleasa de restricción. Después de cortarse la cadena molde del heterodúplex bicatenario con una enzima de restricción apropiada, la cadena molde puede digerirse con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada más allá de la región que

contiene el sitio o los sitios para mutar. La reacción se detiene después para dejar una molécula que es solamente parcialmente monocatenaria. Se forma después un nuevo dúplex de ADN bicatenario completo usando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleótido trifosfatos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula homobicatenaria puede después transformarse en una célula hospedadora adecuada.

5 Como se ha indicado previamente la secuencia del conjunto de oligonucleótidos es de suficiente longitud para hibridar con el ácido nucleico molde y también puede contener, pero no contiene necesariamente, sitios de restricción. El molde de ADN puede generarse por los vectores que derivan de vectores de bacteriófago M13 o vectores que contienen un origen de replicación de fago monocatenario como se describe en Viera *et al.* ((1987) Meth. Enzymol., 153: 3). Por lo tanto, el ADN que se va a mutar debe insertarse en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

15 De acuerdo con otro método, puede generarse una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos corriente arriba y corriente abajo, teniendo cada conjunto una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, estableciéndose las diferentes secuencias por los conjuntos de codones proporcionados dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo, junto con una secuencia de ácido nucleico molde de dominio variable, pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos de PCR. Los productos de PCR pueden denominarse "casetes de ácido nucleico", ya que pueden fusionarse con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, componentes de proteína de cubierta viral y dominios de dimerización, usando técnicas de biología molecular establecidas.

25 La secuencia de los cebadores de PCR incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para las posiciones accesibles a disolvente y altamente diversas en una región CDR. Como se ha descrito anteriormente, un conjunto de codones es un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usadas para codificar aminoácidos variantes deseados.

30 Los conjuntos de oligonucleótidos pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa usando una secuencia molde de ácido nucleico de región variable como el molde para crear casetes de ácido nucleico. La secuencia de molde de ácido nucleico de región variable puede ser cualquier parte de las cadenas de inmunoglobulina ligeras o pesadas que contienen las secuencias de ácido nucleico diana (es decir, secuencias de ácido nucleico que codifican aminoácidos dirigidos para sustitución). La secuencia de molde de ácido nucleico de región variable es una parte de una molécula de ADN bicatenario que tiene una primera cadena de ácido nucleico y una segunda cadena de ácido nucleico complementaria. La secuencia molde de ácido nucleico de región variable contiene al menos una parte de un dominio variable y tiene al menos una CDR. En algunos casos, la secuencia molde de ácido nucleico de región variable contiene más de una CDR. Una parte cadena arriba y una parte cadena abajo de la secuencia molde de ácido nucleico de región variable puede ser diana de hibridación con miembros de un conjunto de oligonucleótidos cadena arriba y un conjunto de oligonucleótidos cadena abajo.

40 Un primer oligonucleótido del conjunto de cebadores cadena arriba puede hibridar con la primera cadena de ácido nucleico y un segundo oligonucleótido del conjunto de cebadores cadena abajo puede hibridar con la segunda cadena de ácido nucleico. Los cebadores oligonucleotídicos pueden incluir uno o más conjuntos de codones y diseñarse para hibridar con una parte de la secuencia molde de ácido nucleico de región variable. El uso de estos oligonucleótidos puede introducir dos o más conjuntos de codones en el producto de PCR (es decir, el casete de ácido nucleico) después de PCR. El cebador oligonucleotídico que hibrida con regiones de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de anticuerpo incluye partes que codifican restos de CDR que son diana de sustitución de aminoácidos.

50 Los conjuntos de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo pueden sintetizarse también para incluir sitios de restricción dentro de la secuencia oligonucleotídica. Estos sitios de restricción pueden facilitar la inserción de los casetes de ácido nucleico [es decir, productos de reacción de PCR] en un vector de expresión que tiene secuencias de anticuerpos adicionales. Preferentemente, los sitios de restricción se diseñan para facilitar la clonación de los casetes de ácido nucleico sin introducir secuencias de ácido nucleico ajenas o retirar secuencias de ácido nucleico de CDR o marco conservado originales.

60 Los casetes de ácido nucleico pueden clonarse en cualquier vector adecuado para expresión de una parte o la secuencia de cadena ligera o pesada completa que contiene las sustituciones de aminoácidos diana generadas. De acuerdo con métodos detallados en el presente documento, el casete de ácido nucleico se clona en un vector que permite la producción de una parte o la secuencia de cadena ligera o pesada completa fusionada con toda o una parte de la proteína de cubierta viral (es decir, creando una proteína de fusión) y se presenta en la superficie de una partícula o célula. Aunque están disponibles varios tipos de vectores y pueden usarse para practicar la presente invención, los vectores fagémidos son los vectores preferidos para su uso en el presente documento, ya que pueden construirse con relativa facilidad, y pueden amplificarse fácilmente. Los vectores fagémidos generalmente contienen diversos componentes incluyendo promotores, secuencias señal, genes de selección fenotípica, sitios de origen de replicación y otros componentes necesarios como se conocen por los expertos habituales en la materia.

Como se describe en el presente documento, cuando se va a expresar una combinación de aminoácidos variante particular, el casete de ácido nucleico contiene una secuencia que es capaz de codificar todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o ligera, y es capaz de codificar las combinaciones de aminoácidos variantes. Para la producción de anticuerpos que contienen estos aminoácidos variantes o combinaciones de aminoácidos variantes, como en una biblioteca, los casetes de ácido nucleico pueden insertarse en un vector de expresión que contiene secuencia de anticuerpo adicional, por ejemplo, todos o partes de los dominios variables o constantes de las regiones variables de cadena ligera y pesada. Estas secuencias de anticuerpos adicionales también pueden fusionarse con otras secuencias de ácido nucleico, tales como secuencias que codifican componentes de la proteína de cubierta viral y por lo tanto permiten la producción de una proteína de fusión.

Vectores

Se describe en el presente documento un vector de expresión replicable que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una fusión génica, en el que la fusión génica codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que contiene CDR (tal como un dominio variable de anticuerpo) o un dominio variable y un dominio constante de anticuerpo, fusionado con toda o parte de una proteína de cubierta viral. También se describe una biblioteca de diversos vectores de expresión replicables que comprenden una pluralidad de fusiones génicas que codifican una pluralidad de proteínas de fusión diferentes incluyendo una pluralidad de los polipéptidos de fusión generados con diversas secuencias como se ha descrito anteriormente. Los vectores pueden incluir diversos componentes y pueden construirse para permitir el movimiento de dominio variable de anticuerpo entre diferentes vectores y/o proporcionar presentación de las proteínas de fusión en diferentes formatos.

Los ejemplos de vectores incluyen vectores de fagos y vectores de fagémidos (que se ilustran exhaustivamente en el presente documento, y se han descrito en más detalle anteriormente). Un vector de fago tiene en general un origen de replicación de fago que permite la replicación en fagos y la formación de partículas de fagos. El fago es generalmente un bacteriófago filamentosos, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado del mismo, o un fago lambdaide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado de los mismos.

Los ejemplos de proteínas de cubierta viral incluyen proteína PIII de infecciosidad (en ocasiones designada también p3), proteína de cubierta mayor PVIII, Soc (T4), Hoc (T4), gpD (o bacteriófago lambda), proteína de cubierta de bacteriófago menor 6 (pVI) (fago filamentosos; J Immunol Methods. 10 Dic 1999; 231 (1-2): 39-51), variantes de la proteína de cubierta mayor de bacteriófago M13 (P8) (Protein Sci Abr 2000; 9 (4): 647-54). La proteína de fusión puede presentarse en la superficie de un fago y los sistemas de fagos adecuados incluyen fago auxiliar M13KO7, M13R408, M13-VCS y Phi X 174, sistema de fago pJuFo (J Virol. Ago 2001; 75 (15): 7107-13.v), hiperfago (Nat Biotechnol. Ene 2001; 19 (1): 75-8). El fago auxiliar preferido es M13KO7, y la proteína de cubierta preferida es la proteína de cubierta del gen III del fago M13. El hospedador preferido es *E. coli*, y las cepas deficientes en proteasa de *E. coli*. Pueden ser útiles para la expresión de la proteína de fusión vectores tales como el vector fth1 (Nucleic Acids Res. 15 May 2001; 29 (10): E50-0).

El vector de expresión también puede tener una secuencia señal secretora fusionada con el ADN que codifica un polipéptido de fusión que contiene CDR (por ejemplo, cada subunidad de un anticuerpo, o fragmento del mismo). Esta secuencia se localiza normalmente inmediatamente 5' del gen que codifica la proteína de fusión, y por lo tanto se transcribirá en el extremo amino terminal de la proteína de fusión. Sin embargo, en ciertos casos, se ha demostrado que la secuencia señal se localiza en posiciones distintas de 5' con respecto al gen que codifica la proteína para secretar. Esta secuencia se dirige a la proteína con la que se une a través de la membrana interna de la célula bacteriana. El ADN que codifica la secuencia señal puede obtenerse como un fragmento de endonucleasa de restricción de cualquier gen que codifica una proteína que tiene una secuencia señal. Pueden obtenerse secuencias señal procariotas adecuadas de genes que codifican, por ejemplo, LamB u OmpF (Wong *et al.*, Gene, 68: 1931 (1983)), MalE, PhoA y otros genes. Un ejemplo de una secuencia señal procariota para practicar la presente invención es la secuencia señal de enterotoxina II termoestable (STII) de *E. coli* como se describe en Chang *et al.*, Gene 55: 189 (1987), y/o malE.

Como se ha indicado anteriormente, un vector también incluye normalmente un promotor para conducir la expresión del polipéptido de fusión. Los promotores más habitualmente usados en vectores procariotas incluyen el sistema de promotor lac Z, el promotor pho A de fosfatasa alcalina (Ap), el promotor de bacteriófago 1_{PL} (un promotor sensible a temperatura), el promotor tac (un promotor trp-lac híbrido que está regulado por el represor lac), el promotor de triptófano y el promotor de bacteriófago T7. Para descripciones generales de promotores, véase sección 17 de Sambrook *et al.* mencionado anteriormente. Aunque estos son los promotores más habitualmente usados, también pueden usarse otros promotores microbianos adecuados.

El vector también puede incluir otras secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, secuencias que codifican marcadores gD, epítomos c-Myc, marcadores de polihistidina, proteínas de fluorescencia (por ejemplo, GFP), o proteína de beta-galactosidasa que pueden ser útiles para la detección o purificación de la proteína de fusión expresada en la superficie del fago o la célula. Las secuencias de ácido nucleico que codifican, por ejemplo, un marcador gD, también proporcionan selección positiva o negativa de células o virus que expresan la proteína de

fusión. Como se describe en el presente documento el marcador gD se fusiona preferentemente con un dominio variable de anticuerpo que no se fusiona con el componente de proteína de cubierta viral. Las secuencias de ácido nucleico que codifican, por ejemplo, un marcador de polihistidina, son útiles para identificar proteínas de fusión incluyendo dominios variables de anticuerpo que se unen con un antígeno específico usando inmunohistoquímica.

5 Los marcadores útiles para detección de unión a antígeno pueden fusionarse con un dominio variable de anticuerpo no fusionado con un componente de proteína de cubierta viral o un dominio variable de anticuerpo fusionado con un componente de proteína de cubierta viral.

10 Otro componente útil de los vectores son genes de selección fenotípicos. Son genes de selección fenotípicos típicos los que codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos a la célula hospedadora. Como ilustración, el gen de resistencia a ampicilina (*amp^r*) y el gen de resistencia a tetraciclina (*tetr*) se emplean fácilmente para este fin.

15 El vector también puede incluir secuencias de ácido nucleico que contienen sitios de restricción únicos y codones de terminación suprimibles. Los sitios de restricción únicos son útiles para mover dominios variables de anticuerpo entre diferentes vectores y sistemas de expresión, especialmente útiles para la producción de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno en cultivos celulares. Los codones de terminación suprimibles son útiles para controlar el nivel de expresión de la proteína de fusión y para facilitar la purificación de fragmentos de anticuerpos solubles. Por ejemplo, un codón de terminación ámbar puede leerse como Gln en un hospedador *supE* para permitir la presentación en fagos, mientras que en un hospedador no *supE* se lee como un codón de terminación para producir fragmentos de anticuerpos solubles sin fusión con proteínas de cubierta del fago. Estas secuencias sintéticas pueden fusionarse con uno o más dominios variables de anticuerpo en el vector.

25 Es beneficioso en ocasiones usar sistemas de vector que permiten que el ácido nucleico que codifica una secuencia de anticuerpo de interés, por ejemplo una CDR que tienen aminoácidos variantes, se retire fácilmente del sistema de vector y se coloque en otro sistema de vector. Por ejemplo, pueden modificarse técnicamente sitios de restricción apropiados en un sistema de vector para facilitar la retirada de la secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o dominio variable de anticuerpo que tiene aminoácidos variantes. Las secuencias de restricción se eligen habitualmente para que sean únicas en los vectores para facilitar la escisión eficaz y el ligamiento en vectores nuevos. Después pueden expresarse anticuerpos o dominios variables de anticuerpo a partir de vectores sin secuencias de fusión ajenas, tales como proteínas de cubierta viral u otros marcadores de secuencia.

35 Entre el ácido nucleico que codifica dominio variable o constante de anticuerpo (gen 1) y el componente de proteína de cubierta viral (gen 2), puede insertarse ADN que codifica un codón de terminación o parada, incluyendo dichos codones de terminación UAG (ámbar), UAA (ocreo) y UGA (ópalo). (Microbiology, Davis *et al.*, Harper y Row, Nueva York, 1980, pp. 237,245-47 y 374). El codón de terminación o parada expresado en una célula hospedadora de tipo silvestre da como resultado la síntesis del producto proteico del gen 1 sin la proteína del gen 2 unida. Sin embargo, el crecimiento en una célula hospedadora supresora da como resultado la síntesis de cantidades detectables de proteína fusionada. Dichas células hospedadoras supresoras se conocen bien y se describen, tales como cepa supresora de *E. coli* (Bullock *et al.*, BioTechniques 5: 76-379 (1987)). Puede utilizar cualquier método aceptable para colocar dicho codón de terminación en el ARNm que codifica el polipéptido de fusión.

45 El codón suprimible puede insertarse entre el primer gen que codifica un dominio variable o constante de anticuerpo y un segundo gen que codifica al menos una parte de una proteína de cubierta de fago. Como alternativa, el codón de terminación suprimible puede insertarse adyacente al sitio de fusión reemplazando el último triplete de aminoácido en el dominio variable de anticuerpo o el primer aminoácido en la proteína de cubierta del fago. El codón de terminación suprimible puede localizarse en o después del extremo C terminal de un dominio de dimerización. Cuando el plásmido que contiene el codón suprimible se cultiva en una célula hospedadora supresora, da como resultado la producción detectable de un polipéptido de fusión que contiene el polipéptido y la proteína de cubierta. Cuando el plásmido se cultiva en una célula hospedadora no supresora, el dominio variable de anticuerpo se sintetiza sustancialmente sin fusión con la proteína de cubierta del fago debido a terminación en el triplete suprimible insertado UAG, UAA o UGA. En la célula no supresora el dominio variable de anticuerpo se sintetiza y se secreta de la célula hospedadora debido a la ausencia de la proteína de cubierta del fago fusionado quede otro modo lo ancló a la membrana del hospedador.

55 La CDR que se diversifica (selecciona aleatoriamente) puede tener un codón de terminación introducido por ingeniería genética en la secuencia molde (denominada en el presente documento "molde de terminación"). Esta característica permite la detección y selección de secuencias diversificadas con éxito basándose en la reparación exitosa del codón o los codones de terminación en la secuencia molde debido a incorporación del oligonucleótido o los oligonucleótidos que comprenden la secuencia o las secuencias para los aminoácidos variantes de interés. Esta característica se ilustra adicionalmente en los Ejemplos posteriores.

65 Los dominios variables o constantes de anticuerpo de cadena ligera y/o pesada también pueden fusionarse con una secuencia peptídica adicional, posibilitando la secuencia peptídica adicional la interacción de uno o más polipéptidos de fusión en la superficie de la partícula viral o célula. Estas secuencias peptídicas se denominan en el presente documento "dominios de dimerización". Los dominios de dimerización pueden comprender al menos uno o más de una secuencia de dimerización, o al menos una secuencia que comprende un resto de cisteína o ambos. Las

secuencias de dimerización adecuadas incluyen las de proteínas que tienen hélices alfa anfipáticas en las que se separan regularmente restos hidrófobos y permiten la formación de un dímero por interacción de los restos hidrófobos de cada proteína; dichas proteínas y partes de proteínas incluyen, por ejemplo, regiones de cremalleras de leucina. Los dominios de dimerización también pueden comprender uno o más restos de cisteína (por ejemplo, se proporciona por inclusión de una secuencia bisagra en anticuerpo dentro del dominio de dimerización). Los restos de cisteína pueden posibilitar la dimerización por formación de uno o más enlaces disulfuro. Opcionalmente, cuando está presente un codón de terminación después del dominio de dimerización, el dominio de dimerización comprende al menos un resto de cisteína. Los dominios de dimerización se localizan preferentemente entre el dominio variable o constante de anticuerpo y el componente de proteína de cubierta viral.

En algunos casos el vector codifica un único polipéptido de fago de anticuerpo en una forma monocatenaria que contiene, por ejemplo, las regiones variables de cadena tanto pesada como ligera fusionadas con una proteína de cubierta. En estos casos el vector se considera "monocistrónico", que expresa un transcrito bajo el control de un cierto promotor. Por ejemplo, un vector puede utilizar un promotor (tal como el promotor de fosfatasa alcalina (AP) o Tac) para conducir la expresión de una secuencia monocistrónica que codifica los dominios VL y VH, con un péptido enlazador entre los dominios VL y VH. La secuencia cistrónica puede conectarse en el extremo 5' con una secuencia señal (tal como una secuencia señal *malE* o enterotoxina termoestable II (STII) de *E. coli*) y en su extremo 3' con toda o una parte de una proteína de cubierta viral (tal como la proteína de bacteriófago pIII). Este polipéptido de fusión codificado por un vector se denomina en el presente documento "ScFv-pIII". Un vector puede comprender además una secuencia que codifica un dominio de dimerización tal como una cremallera de leucina en su extremo 3', entre la segunda secuencia de dominio variable (por ejemplo, VH) y la secuencia de proteína de cubierta viral. Los polipéptidos de fusión que comprenden el dominio de dimerización son capaces de dimerizar para formar un complejo de dos polipéptidos scFv (denominados en el presente documento "(ScFv)₂-p III").

En otros casos, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras pueden expresarse como polipéptidos separados, siendo por tanto el vector "bicistrónico", lo que permite la expresión de transcritos separados. En estos vectores, un promotor adecuado, tal como el promotor Ptac o PhoA, se usa para conducir la expresión de un mensaje bicistrónico. Un primer cistrón que codifica, por ejemplo, un dominio variable y constante de cadena ligera, puede conectarse en el extremo 5' con una secuencia señal, tal como secuencia señal *malE* o enterotoxina termoestable II (STII) de *E. coli*, y en el extremo 3' con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia marcadora, tal como marcador gD. Un segundo cistrón, que codifica, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada y dominio constante CH1, se conecta en su extremo 5' con una secuencia señal, tal como secuencia señal *malE* o enterotoxina termoestable II (STII) de *E. coli*, y en el extremo 3' con toda o una parte de una proteína de cubierta viral.

También se describe en el presente documento un vector que proporciona un mensaje bicistrónico y para presentación de F(ab')₂-pIII, un promotor adecuado, tal como promotor Ptac o PhoA (AP), conduce a la expresión de un primer cistrón que codifica un dominio variable y constante de cadena ligera unido operativamente en el extremo 5' con una secuencia señal tal como la secuencia señal *malE* o enterotoxina termoestable II (STII) de *E. coli*, y en el extremo 3' con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia marcadora tal como marcador gD. El segundo cistrón codifica, por ejemplo, un dominio variable y constante de cadena pesada unido operativamente en el extremo 5' con una secuencia señal tal como secuencia señal *malE* o enterotoxina termoestable II (STII) de *E. coli*, y en el extremo 3' tiene un dominio de dimerización que comprende secuencia bisagra IgG y una secuencia de cremallera de leucina seguida de al menos una parte de proteína de cubierta viral.

Presentación de polipéptidos de fusión

Pueden presentarse polipéptidos de fusión de un polipéptido que contiene CDR (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) en la superficie de una célula, virus o partícula de fagémido en diversos formatos. Estos formatos incluyen fragmento Fv monocatenario (scFv), fragmento F(ab) y formas multivalentes de estos fragmentos. Por ejemplo, las formas multivalentes incluyen un dímero de ScFv, Fab o F(ab'), denominado en el presente documento (ScFv)₂, F(ab)₂ y F(ab')₂, respectivamente. Las formas multivalentes de presentación son ventajosas en algunos contextos en parte porque tienen más de un sitio de unión a antígeno que generalmente da como resultado la identificación de clones de menor afinidad y también permite una clasificación más eficaz de clones poco habituales durante el proceso de selección.

Se conocen bien en la técnica métodos para presentar polipéptidos de fusión que comprenden fragmentos de anticuerpo, en la superficie de bacteriófagos, por ejemplo como se describe en la publicación de patente número WO 92/01047 y en el presente documento. Otras publicaciones de patente WO 92/20791; WO 93/06213; WO 93/11236 y WO 93/19172, describen métodos relacionados. Otras publicaciones han mostrado la identificación de anticuerpos con repertorios de genes V reordenados artificialmente frente a diversos antígenos presentados en la superficie del fago (por ejemplo, H. R. Hoogenboom y G. Winter J. Mol. Biol. 227 381-388 1992; y como se desvela en los documentos WO 93/06213 y WO 93/11236).

5 Cuando se construye un vector para presentación en un formato de scFv, incluye secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio de cadena ligera variable de anticuerpo y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo. Normalmente, la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de cadena pesada variable de anticuerpo se fusiona con un componente de proteína de cubierta viral. Uno o ambos de los dominios variables de anticuerpo
 10 pueden tener aminoácidos variantes en al menos una región CDR. La secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera variable de anticuerpo se conecta con el dominio de cadena pesada variable de anticuerpo por una secuencia de ácido nucleico que codifica un enlazador peptídico. El enlazador peptídico normalmente contiene de aproximadamente 5 a 15 aminoácidos. Opcionalmente, otras secuencias codificantes, por ejemplo, de marcadores útiles para purificación o detección pueden fusionarse en el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera variable de anticuerpo o dominio de cadena pesada variable de anticuerpo o ambos.

15 Cuando se construye un vector para presentación de F(ab), este incluye secuencias de ácido nucleico que codifican dominios variables de anticuerpo y dominios constantes de anticuerpo. Un ácido nucleico que codifica un dominio de cadena ligera variable se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de cadena ligera. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo se fusiona con una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio CH1 constante de cadena pesada. Normalmente, la secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios variables y constantes de cadena pesada se fusionan con una secuencia de ácido nucleico que codifica toda o parte de una proteína de cubierta viral. Uno o ambos de los dominios de cadena ligera o pesada variables de anticuerpo pueden tener aminoácidos variantes en al menos una
 20 CDR. Opcionalmente, los dominios variables y constantes de cadena pesada se expresan como una fusión con al menos una parte de una proteína de cubierta viral, y los dominios variables y constantes de cadena ligera se expresan por separado de la proteína de fusión de cubierta viral de cadena pesada. Las cadenas pesadas y ligeras se asocian entre sí, lo que puede ser por enlaces covalentes o no covalentes. Opcionalmente, otras secuencias que codifican, por ejemplo, marcadores polipeptídicos útiles para purificación o detección, pueden fusionarse en el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio constante de cadena ligera de anticuerpo o dominio constante de cadena pesada de anticuerpo o ambos.

25 Opcionalmente, se usa un resto bivalente, por ejemplo, u dímero F(ab)₂ o dímero F(ab')₂, para presentar fragmentos de anticuerpo con las sustituciones de aminoácidos variantes en la superficie de una partícula. Se ha descubierto que los dímeros de F(ab')₂ generalmente tienen la misma afinidad que los dímeros F(ab) en un ensayo de unión a antígeno en fase de solución pero la velocidad de disociación para F(ab')₂ se reduce debido a una mayor avidez. Por lo tanto, el formato bivalente (por ejemplo, F(ab')₂) es un formato particularmente útil ya que permite la identificación de clones de menor afinidad y también permite una clasificación más eficaz de clones poco habituales durante el proceso de selección.

35 **Introducción de vectores en células hospedadoras**

40 Se introducen vectores construidos como se describe en el presente documento en una célula hospedadora para amplificación y/o expresión. Pueden introducirse vectores en células hospedadoras usando métodos de transformación convencionales incluyendo electroporación, precipitación con fosfato de calcio y similares. Si el vector es una partícula infecciosa tal como un virus, el vector en sí mismo proporciona entrada en la célula hospedadora. La transfección de células hospedadoras que contienen un vector de expresión replicable que codifica la fusión génica y producción de partículas de fagos de acuerdo con procedimientos convencionales proporciona partículas de fagos en las que la proteína de fusión se presenta en la superficie de la partícula de fago.

45 Se introducen vectores de expresión replicables en células hospedadoras usando diversos métodos. Los vectores pueden introducirse en células usando electroporación como se describe en el documento WO/00106717. Las células se cultivan en cultivo en caldo de cultivo convencional, opcionalmente durante aproximadamente 6-48 horas (o hasta DO₆₀₀ = 0,6 - 0,8) a aproximadamente 37 °C, y después el caldo se centrifuga y el sobrenadante se retira (por ejemplo se decanta). La purificación inicial es preferentemente resuspendiendo el sedimento celular en una solución de tampón (por ejemplo HEPES 1,0 mM pH 7,4) seguido de recentrifugación y retirada del sobrenadante. El sedimento celular resultante se resuspende en glicerol diluido (por ejemplo 5-20 % v/v) y se recentrifuga de nuevo para formar un sedimento celular y se retira el sobrenadante. La concentración celular final se obtiene resuspendiendo el sedimento celular en agua o glicerol diluido hasta la concentración deseada.

50 Una célula receptora particularmente preferida es la cepa de *E. coli* competente para electroporación SS320 (Sidhu *et al.*, Methods Enzymol. (2000), 328: 333-363). Se preparó la cepa SS320 emparejando células MC1061 con células XL1-BLUE en condiciones suficientes para transferir el episoma de fertilidad (plásmido F) o XL1-BLUE a las células MC1061. La cepa SS320 se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia Estados Unidos, el 18 de junio de 1998 y se le asignó el n.º de referencia de depósito 98795. Puede usarse cualquier episoma F que permita la replicación de fago en la cepa. Están disponibles episomas adecuados de cepas depositadas en la ATCC o están disponibles en el mercado (CJ236, CSH18, DHF', JM101, JM103, JM105, JM107, JM109, JM110), KS1000, XL1-BLUE, 71-18 y otros).

65 El uso de concentraciones de ADN mayores durante la electroporación (aproximadamente 10X) aumenta la eficacia de transformación y aumenta la cantidad de ADN transformado en las células hospedadoras. El uso de altas

concentraciones celulares también aumenta la eficacia (aproximadamente 10X). La mayor cantidad de ADN transferido produce bibliotecas mayores que tienen mayor diversidad y que representan un mayor número de miembros únicos de una biblioteca combinatoria. Se seleccionan en general células transformadas mediante cultivo en medio que contiene antibióticos.

5

Selección (clasificación) y exploración con respecto a agentes de unión para dianas elegidas

El uso de presentación en fagos para identificar agentes de unión de antígenos diana, con sus diversas permutaciones y variaciones en la metodología, está bien establecido en la técnica. Un enfoque implica construir una familia de vectores replicables variantes que contienen un elemento regulador de la transcripción unido operativamente con una fusión génica que codifica un polipéptido de fusión, transformar células hospedadoras adecuadas, cultivar las células transformadas para formar partículas de fago que presentan el polipéptido de fusión en la superficie de la partícula de fago, seguido de un proceso que implica selección o clasificación poniendo en contacto las partículas de fagos recombinantes con un antígeno diana de modo que al menos una parte de la población de partículas se una con la diana con el objetivo de aumentar y enriquecer los subconjuntos de las partículas que se unen a partir de partículas en relación con partículas que no se unen en el proceso de la selección. El grupo seleccionado puede amplificarse infectando células hospedadoras, tales como células XL1-Blue, para otro ciclo de clasificación en la misma diana con diferente o la misma rigurosidad. El grupo resultante de variantes se explora después frente a los antígenos diana para identificar nuevas proteínas de unión de alta afinidad. Estas nuevas proteínas de unión de alta afinidad pueden ser útiles como agentes terapéuticos como antagonistas o agonistas, y/o como reactivos de diagnóstico e investigación.

Los polipéptidos de fusión tales como dominios variables de anticuerpo que comprenden los aminoácidos variantes pueden expresarse en la superficie de un fago, partícula de fagémido o una célula y después seleccionarse y/o explorarse con respecto a la capacidad de los miembros del grupo de polipéptidos de fusión para unirse con un antígeno diana que es normalmente un antígeno de interés. Los procesos de selección con respecto a agentes de unión para diana también pueden incluir clasificación en una proteína genérica que tiene afinidad por dominios variables de anticuerpos tales como proteína L o anticuerpo específico de marcador que se une con anticuerpo o fragmentos de anticuerpo presentados en el fago, lo que puede usarse para enriquecer con respecto a miembros de biblioteca que presentan fragmentos de anticuerpos correctamente plegados (polipéptidos de fusión).

Las proteínas diana, tales como receptores, pueden aislarse de fuentes naturales o prepararse por métodos recombinantes por procedimientos conocidos en la técnica. Los antígenos diana pueden incluir varias moléculas de interés terapéutico.

Puede usarse diversas estrategias de selección (clasificación) para afinidad. Un ejemplo es un método de soporte sólido o clasificación en placa o clasificación de diana inmovilizada. Otro ejemplo es un método de unión a solución.

Para el método de soporte sólido, la proteína diana puede unirse con una matriz sólida o semisólida adecuada que se conoce en la técnica tal como perlas de agarosa, perlas de acrilamida, perlas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de hidroxialquil metacrilato, copolímeros de poliacrílico y polimetacrílico, nailon, vehículos neutros e iónicos y similares. Puede conseguirse unión de la proteína diana con la matriz por métodos descritos en *Methods in Enzymology*, 44 (1976), o por otros medios conocidos en la técnica.

Después de la unión del antígeno diana con la matriz, la diana se pone en contacto con la biblioteca que expresa los polipéptidos de fusión en condiciones adecuadas para unirse con al menos un subconjunto de la población de partículas de fagos con el antígeno diana inmovilizado. Normalmente, las condiciones, incluyendo pH, fuerza iónica, temperatura y similares imitarán las condiciones fisiológicas. Las partículas unidas ("agentes de unión") a la diana inmovilizada se separan de las partículas que no se unen con la diana por lavado. Las condiciones de lavado pueden ajustarse para dar como resultado retirada de todos excepto los agentes de unión de alta afinidad. Los agentes de unión pueden disociarse de la diana inmovilizada por diversos métodos. Estos métodos incluyen disociación competitiva usando el ligando de tipo silvestre (por ejemplo antígeno diana en exceso), alterando el pH y/o la fuerza iónica, y métodos conocidos en la técnica. La selección de agentes de unión normalmente implica elución desde una matriz de afinidad con un material de elución adecuado tal como ácido como HCl 0,1 M o ligando. La elución con concentraciones crecientes de ligando podría eluir moléculas de unión presentadas de afinidad creciente.

Los agentes de unión pueden aislarse y después reamplificarse en células hospedadoras adecuadas infectando las células con las partículas virales que son agentes de unión (y fago auxiliar si es necesario, por ejemplo cuando la partícula viral es una partícula de fagémido) y las células hospedadoras se cultivan en condiciones adecuadas para amplificación de las partículas que presentan el polipéptido de fusión deseado. Las partículas de fago se recogen después y se repite el proceso de selección una o más veces hasta que los agentes de unión del antígeno diana se enriquecen de cierta manera. Puede utilizarse cualquier número de ciclos de selección o clasificación. Uno de los procedimientos de selección o clasificación puede implicar aislar agentes de unión que se unen con una proteína de afinidad genérica tal como proteína L o un anticuerpo con un marcador polipeptídico presente en un polipéptido presentado tal como anticuerpo para la proteína gD o marcador de polihistidina.

65

Se describe en el presente documento selección frente a bibliotecas de la invención usando un nuevo método de selección que se denomina "método de unión en solución". Esto permite clasificación en fase de solución con eficacia muy mejorada con respecto a métodos de clasificación de solución convencionales. El método de unión en solución puede usarse para encontrar agentes de unión originales de una biblioteca aleatoria o encontrar agentes de unión mejorados de una biblioteca que se designó para mejorar la afinidad de un clon o un grupo de clones de unión particulares. El método comprende poner en contacto una pluralidad de polipéptidos, tales como los desvelados en partículas de fagos o fagémidos (biblioteca), con un antígeno diana marcado o fusionado con una molécula marcadora. El marcador podría ser biotina u otros restos para los que estén disponibles agentes de unión específicos. La rigurosidad de la fase de solución puede variarse usando concentraciones decrecientes de antígeno diana marcado en la primera fase de unión en solución. Para aumentar adicionalmente la rigurosidad, la primera fase de unión en solución puede seguirse de una segunda fase de solución que tiene alta concentración de antígeno diana no marcado después de la unión inicial con la diana marcada en la primera fase de solución. Habitualmente, se usa de 100 a 1000 veces diana no marcada con respecto a diana marcada en la segunda fase (si se incluye). La duración del tiempo de incubación de la primera fase de solución puede variar de algunos minutos hasta una o dos horas o más hasta alcanzar el equilibrio. Usando un tiempo más corto para unión en esta primera fase puede sesgar o seleccionar agentes de unión que tienen velocidad de asociación rápida. La duración del tiempo y la temperatura de incubación en la segunda fase pueden variarse para aumentar la rigurosidad. Esto proporciona un sesgo de selección para agentes de unión que tienen velocidad lenta de desprendimiento de la diana (velocidad de disociación). Después de poner en contacto la pluralidad de polipéptidos (presentados en las partículas de fago/fagémidos) con un antígeno diana, las partículas de fago o fagémido que se unen con dianas marcadas se separan del fago con el que no se unen. La mezcla de partícula-diana de fase de unión en solución se aísla poniéndola en contacto con el resto diana marcado y permitiendo su unión con una molécula que se una con el resto diana marcado durante un periodo de tiempo corto (por ejemplo 2-5 minutos). La concentración inicial del antígeno diana marcado puede variar de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 1000 nM. Las partículas unidas se eluyen y pueden propagarse para el siguiente ciclo de clasificación. Se prefieren múltiples ciclos de clasificación usando una concentración menor de antígeno diana marcado con cada ciclo de clasificación.

Por ejemplo, una clasificación o selección inicial usando antígeno diana marcado aproximadamente 100 a 250 nM debería ser suficiente para capturar una amplia serie de afinidades, aunque este factor puede determinarse de forma empírica y/o para adaptarse al deseo del practicante. En el segundo ciclo de selección, pueden usarse de aproximadamente 25 a 100 nM de antígeno diana marcado. En el tercer ciclo de selección, puede usarse de aproximadamente 0,1 a 25 nM de antígeno diana marcado. Por ejemplo, para mejorar la afinidad de un agente de unión 100 nM, puede ser deseable comenzar con 20 nM y después progresar a diana marcada 5 y 1 nM, después, seguido de concentraciones aún menores tales como aproximadamente 0,1 nM de antígeno diana marcado.

La clasificación en solución convencional implica el uso de perlas como perlas recubiertas con estreptavidina, lo que es muy incómodo de usar y con frecuencia da como resultado eficacia muy baja de recuperación de agentes de unión de fagos. La clasificación en solución convencional con perlas tarda mucho más de 2-5 minutos y es menos factible adaptarla a automatización de alto rendimiento que la anteriormente descrita.

Como se ha descrito en el presente documento, las combinaciones de métodos de clasificación en soporte sólido y solución pueden usarse ventajosamente para aislar agentes de unión que tengan características deseadas. Después de selección/clasificación en antígeno diana durante varios ciclos, se realiza exploración de clones individuales a partir del grupo seleccionado en general para identificar agentes de unión específicos con las propiedades/características deseadas. Preferentemente, el proceso de exploración se llevó a cabo por sistemas automáticos para permitir exploración de alto rendimiento de candidatos de bibliotecas.

Los dos métodos de exploración principales se describen posteriormente. Sin embargo, también pueden usarse en los métodos de la invención otros métodos conocidos en la técnica. El primer método de exploración comprende un ensayo de ELISA de fagos con antígeno diana inmovilizado, que posibilita la identificación de un clon de unión específico a partir de un clon no de unión. La especificidad puede determinarse por ensayo simultáneo del clon en pocillo recubierto de diana y BSA u otros pocillos recubiertos con proteína no diana. Este ensayo es automatizable para exploración de alto rendimiento.

Una realización proporciona un método para seleccionar un dominio variable de anticuerpo que se une con un antígeno diana específico de una biblioteca de dominio variable de anticuerpo generando una biblioteca de vectores de expresión replicables que comprenden una pluralidad de polipéptidos; poniendo en contacto la biblioteca con un antígeno diana y al menos un antígeno no diana en condiciones adecuadas para unión; separando los agentes de unión polipeptídicos en la biblioteca de los que no se unen; identificando los agentes de unión que se unen con el antígeno diana y no se unen con el antígeno no diana; eluyendo los agentes de unión del antígeno diana; y amplificando los vectores de expresión replicables que comprenden el agente de unión polipeptídico que se une con un antígeno específico.

El segundo ensayo de exploración es un ensayo de exploración de afinidad que posibilita la exploración con respecto a clones que tengan alta afinidad de clones que tengan baja afinidad de una manera de alto rendimiento. En el ensayo, cada clon se ensaya con y sin incubación en primer lugar con antígeno diana de cierta concentración durante un período de tiempo (durante por ejemplo 30-60 minutos) antes de la aplicación a pocillos recubiertos con diana brevemente (por ejemplo 5-15 minutos). Después el fago unido se mide por método de ELISA de fagos, por ejemplo, usando conjugados de HRP anti M13. La relación de señal de unión de los dos pocillos, habiéndose preincubado un pocillo con diana y el otro pocillo no preincubado con antígeno diana es una indicación de la afinidad. La selección de la concentración de diana para primera incubación depende del intervalo de afinidad de interés. Por ejemplo, si se desean agentes de unión con afinidad mayor de 10 nM, se usa con frecuencia 100 nM de diana en la primera incubación. Una vez que se encuentran agentes de unión de un ciclo de clasificación (selección) particular, estos clones pueden explorarse con ensayo de exploración de afinidad para identificar agentes de unión con mayor afinidad.

Las combinaciones de cualquiera de los métodos de clasificación/selección descritos anteriormente pueden combinarse con los métodos de exploración. Por ejemplo, en una realización, los agentes de unión polipeptídicos se seleccionan en primer lugar por unión con antígeno diana inmovilizado. Los agentes de unión polipeptídicos que se unen con el antígeno diana inmovilizado pueden amplificarse después y explorarse con respecto a unión con el antígeno diana y con respecto a falta de unión con antígenos no diana. Los agentes de unión polipeptídicos que se unen específicamente con el antígeno diana se amplifican. Estos agentes de unión polipeptídicos pueden después seleccionarse con respecto a mayor afinidad por contacto con una concentración de un antígeno diana marcado para formar un complejo, en el que los intervalos de concentración de antígeno diana marcado de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 1000 nM, los complejos se aíslan por contacto con un agente que se une con el marcador en el antígeno diana. Los agentes de unión polipeptídicos se eluyen después del antígeno diana marcado y opcionalmente se repiten los ciclos de selección, cada vez se usa una menor concentración de antígeno diana marcado. Los agentes de unión polipeptídicos de alta afinidad aislados usando este método de selección pueden después explorarse con respecto a alta afinidad usando diversos métodos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en el presente documento.

Estos métodos pueden posibilitar hallar clones con alta afinidad sin tener que realizar ensayos de afinidad de competición largos y complejos en un gran número de clones. El aspecto intensivo de realizar ensayos complejos de muchos clones con frecuencia es un obstáculo significativo para encontrar los mejores clones de una selección. Este método es especialmente útil en intentos de mejora de afinidad en los que pueden recuperarse múltiples agentes de unión con afinidad similar del proceso de selección. Diferentes clones pueden tener eficacia muy diferente de expresión/presentación en partículas de fagos o fagémidos. Los clones más altamente expresados tienen mejores posibilidades de recuperarse. Es decir, la selección puede sesgarse por la presentación o el nivel de expresión de las variantes. El método de clasificación de unión en solución puede mejorar el proceso de selección para encontrar agentes de unión con alta afinidad. Este método es un ensayo de exploración de afinidad que proporciona una ventaja significativa en exploración con respecto a los mejores agentes de unión rápida y fácilmente.

Después de identificarse los agentes de unión uniéndose con el antígeno diana, el ácido nucleico puede extraerse. El ADN extraído puede usarse después directamente para transformar células hospedadoras *E. coli* o, como alternativa, las secuencias codificantes pueden amplificarse, por ejemplo usando PCR con cebadores adecuados, y secuenciarse por método de secuenciación típico. El ADN de dominio variable de los agentes de unión puede digerirse con enzimas de restricción y después insertarse en un vector para expresión de proteínas.

Pueden usarse poblaciones que comprenden polipéptidos que tienen HVR con diversidad de secuencias seleccionada descrita en el presente documento generada de acuerdo con métodos descritos en el presente documento para aislar agentes de unión frente a diversas dianas. Estos agentes de unión pueden comprender una o más HVR variantes que comprenden diversas secuencias generadas usando codones preferentes.

En algunos casos, puede ser beneficioso combinar una o más HVR de cadena ligera diversificadas con nuevos agentes de unión aislados de una población de polipéptidos que comprenden una o más CDR de cadena pesada diversificadas. Este proceso puede denominarse proceso de 2 etapas. Un ejemplo de un proceso de 2 etapas comprende determinar en primer lugar agentes de unión (agentes de unión de afinidad generalmente menor) dentro de una o más bibliotecas generadas seleccionando aleatoriamente una o más CDR, en el que las CDR aleatorias en cada biblioteca son diferentes o, cuando se selecciona aleatoriamente la misma CDR, se seleccionan aleatoriamente para generar diferentes secuencias. Los agentes de unión de una biblioteca de cadena pesada pueden seleccionarse aleatoriamente con diversidad de CDR en una CDR de cadena ligera mediante, por ejemplo, una técnica de mutagénesis tal como la de Kunkel, o mediante clonación (corta y pega (por ejemplo ligando diferentes secuencias de CDR entre sí)) la nueva biblioteca de cadena ligera en los agentes de unión de cadena pesada existentes que tienen solamente una cadena ligera fija. El grupo puede después clasificarse adicionalmente frente a diana para identificar agentes de unión que poseen afinidad aumentada. Por ejemplo, los agentes de unión (por ejemplo, agentes de unión de baja afinidad) obtenidos de clasificación de un H1/H2/H3 pueden fusionarse con biblioteca de diversas L1/L2/L3 para reemplazar su L1/L2/L3 fijo original, en el que las nuevas bibliotecas se clasifican además frente a una diana de interés para obtener otro conjunto de agentes de unión (por ejemplo, agentes de unión de alta afinidad). Pueden identificarse nuevas secuencias de anticuerpo que presentan afinidad de

unión mayor con cualquiera de diversos antígenos diana.

En algunas realizaciones, las bibliotecas de la invención se someten a una pluralidad de ciclos de clasificación, en los que cada ciclo de clasificación comprende poner en contacto los agentes de unión obtenidos en el ciclo previo con un antígeno diana distinto del antígeno o los antígenos diana del ciclo o los ciclos previos. Preferentemente, pero no necesariamente, los antígenos diana son homólogos de secuencia, por ejemplo miembros de una familia de polipéptidos relacionados pero distintos, tales como, pero sin limitación, citocinas (por ejemplo, subtipos de interferón alfa).

Generación de bibliotecas que comprenden polipéptidos que contienen CDR variantes

Pueden generarse bibliotecas de polipéptidos de CDR variantes mutando las posiciones accesibles al disolvente y/o altamente diversas en al menos una CDR de un dominio variable de anticuerpo. Algunas o todas de las CDR pueden mutarse usando los métodos descritos en el presente documento.

Puede generarse una biblioteca de dominios variables de anticuerpo, por ejemplo, que tiene mutaciones en las posiciones accesibles al disolvente y/o altamente diversas de CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Puede generarse otra biblioteca que tenga mutaciones en CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Estas bibliotecas también pueden usarse en conjunto entre sí para generar agentes de unión de afinidades deseadas. Por ejemplo, después de uno o más ciclos de selección de bibliotecas de cadena pesada para unión con un antígeno diana, puede reemplazarse una biblioteca de cadena ligera en la población de agentes de unión de cadena pesada para ciclos adicionales de selección para aumentar la afinidad de los agentes de unión.

Opcionalmente, se crea una biblioteca por sustitución de aminoácidos originales con un conjunto limitado de aminoácidos variantes en la región CDRH3 de la región variable de la secuencia de cadena pesada. De acuerdo con la invención, esta biblioteca puede contener una pluralidad de secuencias de anticuerpos, en la que la diversidad de secuencia es principalmente en la región CDRH3 de la secuencia de cadena pesada.

Opcionalmente, la biblioteca se crea en el contexto de la secuencia de anticuerpo humanizado 4D5, o la secuencia de los aminoácidos de marco conservado de la secuencia de anticuerpo humanizado 4D5. Preferentemente, la biblioteca se crea por sustitución de al menos los restos 95-100a de la cadena pesada con aminoácidos codificados por el conjunto de codones *TMT*, *KMT* o *WMT*, en el que el conjunto de codones *TMT*, *KMT* o *WMT* se usa para codificar un conjunto limitado de aminoácidos variantes para cada una de estas posiciones. Los ejemplos de secuencias de oligonucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, las enumeradas en la Figura 2 y pueden determinarse por un experto en la materia de acuerdo con los criterios descritos en el presente documento.

Como alternativa, se utilizan diferentes diseños de CDRH3 para aislar agentes de unión de alta afinidad y para aislar agente de unión para diversos epítopos. Para diversidad de CDRH3, pueden construirse múltiples bibliotecas por separado con diferentes longitudes de H3 y después combinarse para seleccionar con respecto a agentes de unión para antígenos diana. El intervalo de longitudes de CDRH3 generado en esta biblioteca puede ser de 3-20, 5-20, 7-20, 5-18 o 7-18 aminoácidos, aunque también pueden generarse longitudes diferentes de esta. También puede generarse diversidad en CDRH1 y CDRH2, como se ha indicado anteriormente. En una realización de una biblioteca, se genera diversidad en H1 y H2 utilizando los oligonucleótidos ilustrados en la Figura 2. También pueden usarse otros oligonucleótidos con diversas secuencias. Pueden usarse oligonucleótidos individualmente o agrupados en cualquiera de diversas combinaciones dependiendo de las necesidades prácticas y los deseos del practicante. En algunas realizaciones, las posiciones aleatorias en CDR de cadena pesada incluyen las enumeradas en la Figura 1.

Pueden agruparse y clasificarse múltiples bibliotecas usando métodos de selección de soporte sólido y clasificación en solución como se describe en el presente documento. Pueden emplearse múltiples estrategias de clasificación. Por ejemplo, una variación implica clasificación en diana unida a un sólido, seguido de clasificación con respecto a un marcador que puede estar presente en el polipéptido de fusión (por ejemplo marcador anti gD) y seguido de otra clasificación en diana unida a un sólido. Como alternativa, las bibliotecas pueden clasificarse en primer lugar en diana unida a una superficie sólida, después se clasifican los agentes de unión eluidos usando unión en fase de solución con concentraciones decrecientes de antígeno diana. Utilizando combinaciones de diferentes métodos de clasificación se posibilita la minimización de selección de solamente secuencias altamente expresadas y posibilita la selección de varios clones de alta afinidad diferentes.

De los agentes de unión aislados de las bibliotecas agrupadas como se ha descrito anteriormente, se ha descubierto que en algunos casos la afinidad puede mejorarse adicionalmente proporcionando diversidad limitada en la cadena ligera. La diversidad de cadena ligera puede generarse, pero no se genera necesariamente, de la siguiente manera: en CDRL1, las posiciones para diversificar incluyen las posiciones de aminoácidos 28, 29, 30, 31, 32; en CDRL2, las posiciones para diversificar incluyen las posiciones de aminoácidos 50, 51, 53, 54, 55; en CDRL3, las posiciones para diversificar incluyen las posiciones de aminoácidos 91, 92, 93, 94, 95, 97.

Se producen fácilmente agentes de unión de alta afinidad aislados de las bibliotecas en cultivo celular bacteriano y eucariota en alto rendimiento. Los vectores pueden diseñarse para retirar fácilmente secuencias tales como

marcadores gD, secuencia de componente de proteína de cubierta viral y/o para añadir en la región constante secuencias para posibilitar la producción de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno en alto rendimiento.

5 Puede diversificarse cualquier combinación de conjuntos de codones y CDR de acuerdo con métodos descritos en el presente documento. Se ilustran ejemplos de codones adecuados en diversas combinaciones de CDR en la Figura 2.

10 Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un polipéptido de anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. Se aísla y secuencía fácilmente ADN que codifica el anticuerpo usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora que se use. En general, son células hospedadoras preferidas las de origen procariota o eucariota (en general de mamífero).

20 Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariotas:

20 Construcción de vector

Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo descrito en el presente documento usando técnicas recombinantes convencionales. Pueden aislarse y secuenciarse secuencias polinucleotídicas deseadas de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Pueden usarse muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, los vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicación y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora se usan en relación con estos hospedadores. El vector porta habitualmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, se transforma normalmente *E. coli* usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por lo tanto proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas. Se describen ejemplos de derivados de pBR322 usados para expresión de anticuerpos particulares en detalle en Carter *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.648.237.

Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen secuencias de replicación y de control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, pueden utilizarse bacteriófagos tales como λGEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente quedan en dos clases, inducible y constitutivo. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo la presencia o ausencia del nutriente o un cambio de la temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. Opcionalmente, se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos de gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo que un experto en la materia los ligue operativamente con cistrones que codifican las cadenas ligeras y pesadas diana (Siebenlist *et al* (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción requerido.

Opcionalmente, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada debería ser una que se reconozca y procese (es decir se escinda por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal nativa de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinas, *Ipp*, o líderes de enterotoxina termoestable II (STII), PhoE, PelB, OmpA y MBP. Opcionalmente, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas puede suceder en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, se expresan cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina. Se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas de *E. coli* *trxB*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

Se describe en el presente documento un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar la producción de anticuerpos secretados y ensamblados de forma apropiada. Dicha modulación se consigue al menos en parte por modulación simultánea de las potencias traduccionales para los componentes polipeptídicos.

Una técnica para modular la potencia traduccional se desvela en Simmons *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.840.523. Utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, puede crearse una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o ácido nucleico con una serie de potencias traduccionales, proporcionando de este modo un medio conveniente por el que ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Pueden generarse variantes de TIR por técnicas de mutagénesis convencional que dan como resultado cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o separación de secuencias Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto puede conseguirse cambiando la tercera posición de nucleótido de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la preparación del banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura *et al.* (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158.

Preferentemente, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de potencias de TTR para cada cistrón en el mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de niveles de expresión de cada cadena así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados con diversas combinaciones de potencia de TIR. Las potencias de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons *et al.* Patente de Estados Unidos n.º 5.840.523. Basándose en la comparación de potencia traduccional, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinar en las construcciones de vector de expresión.

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos incluyen *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especie de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. Opcionalmente, se usan células Gram negativas. Opcionalmente, se usan como hospedadores células *E. coli*. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; n.º de Depósito de ATCC 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ *fhuA* (*Delta**tonA*) *ptr3 lac Iq lacL8* Δ *ompT* Δ (*nmpc-fepE*) *degP41 kan^R* (Patente de Estados Unidos n.º 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* _{λ} 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli*

RV308 (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Se conocen en la técnica métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, Proteínas. 8: 309-314 (1990). Es necesario en general seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, *E. coli*, *Serratia* o especies de *Salmonella* pueden usarse convenientemente como el hospedador cuando se usan plásmidos conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para proporcionar el replicón. Normalmente la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse convenientemente inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

10 *Producción de anticuerpos*

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

15 Transformación significa introducir ADN en el hospedador procarionta de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, se realiza transformación usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio se usa en general para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método para transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es la electroporación.

20 Se cultivan células procariontas usadas para producir los polipéptidos descritos en el presente documento en medios conocidos de la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de cultivo Luria (LB) más complementos nutrientes necesarios. Opcionalmente, el medio también contiene un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariontas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para crecimiento de células que expresan gen de resistencia a ampicilina.

25 Cualquier complemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico también puede incluirse a concentraciones apropiadas introducidos solos o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditiotritol y ditiotreitól.

30 Las células hospedadoras procariontas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, aún más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferentemente aproximadamente 7,0.

35 Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión descrito en el presente documento, se induce la expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio de limitación de fosfato para inducción. Preferentemente, el medio de limitación de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263: 133-147). Puede usarse diversos inductores adicionales, de acuerdo con la construcción del vector empleada, como se conoce en la técnica.

40 Opcionalmente, los polipéptidos expresados descritos en el presente documento se secretan a y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas implica normalmente romper el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se rompen, el residuo celular o células completas pueden retirarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, pueden transportarse proteínas al medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células pueden retirarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo filtrarse y concentrarse para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse adicionalmente e identificarse usando métodos habitualmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

45 Opcionalmente, como se describe en el presente documento, se realiza producción de anticuerpos en gran cantidad por un proceso de fermentación. Están disponibles procedimientos de fermentación semicontinua a gran escala para producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan turbinas agitadoras para distribuir el oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de energía/carbono preferida). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a fermentación en un fermentador que no

tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de expresión de proteína se inicia normalmente después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO_{550} de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en fase estacionaria temprana. Puede usarse diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos descritos en el presente documento, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y el plegamiento apropiados de los polipéptidos de anticuerpos secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para cotransformar las células procariotas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad apropiados de proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17106-17113; Arie *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 39: 199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse ciertas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes en proteasa de *E. coli* están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.* (1998), mencionado anteriormente; Georgiou *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996).

Opcionalmente, se usan cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células hospedadoras en el sistema de expresión descrito en el presente documento.

Purificación de anticuerpos

Opcionalmente, la proteína de anticuerpos producida en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en inmunoafinidad o columnas de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

Opcionalmente, se usa proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación de inmunoafinidad de los productos de anticuerpo. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad con la región Fc de anticuerpos. Lindmark *et al* (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

Como la primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente se aplica a la base sólida inmovilizada de proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés con proteína A. La fase sólida se lava después para retirar contaminantes unidos de forma no específica con la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

Generación de anticuerpos usando células hospedadoras eucariotas

Los componentes de vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

Un vector para uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o el polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que contiene el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

En general, no es necesario un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente solamente porque contiene el promotor temprano.

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sean relevantes, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles en medio complejo.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de anticuerpo, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, pueden seleccionarse células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de Estados Unidos n.º 4.965.199.

(iv) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconocen por el organismo hospedador y está unido operativamente con el ácido nucleico polipeptídico de anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Los genes prácticamente aleucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de polipéptido de anticuerpo de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la patente de Estados Unidos n.º 4.419.446. En la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978, se describe una

modificación de este sistema. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa de virus del herpes simple. Como alternativa, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous puede usarse como el promotor.

5 (v) *Componente de elemento potenciador*

La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo como se describe en el presente documento por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de polipéptidos de anticuerpo, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

(vi) *Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas también contendrán normalmente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3' de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina. Véase documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

(vii) *Selección y transformación de células hospedadoras*

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras mamíferas útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepapoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) *Cultivar las células hospedadoras*

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo como se describe en el presente documento pueden cultivarse en diversos medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), patente de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o patente de Estados Unidos Re. 30.985 como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que se conocen bien por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH o similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultarán evidentes para los expertos habituales en la materia.

65 (ix) *Purificación de anticuerpo*

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos de partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La conveniencia de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz con la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. También están disponibles otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo para recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizada a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

Ensayos de actividad

Los anticuerpos pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Las inmunoglobulinas purificadas pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos incluyendo, pero sin limitación, secuenciación N terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

Opcionalmente, las inmunoglobulinas producidas en el presente documento se analizan con respecto a su actividad biológica. Opcionalmente, las inmunoglobulinas se ensayan con respecto a su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y pueden usarse en el presente documento incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directa o competitiva usando técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "de tipo sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

La presente divulgación permite que un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que lo hacen un candidato deseado para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. Opcionalmente, las actividades de Fc de la inmunoglobulina producida se miden para asegurar que solamente se mantengan las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a Fc γ R (que por lo tanto carece probablemente de actividad ADCC), pero conserva capacidad de unión a Fc γ Rn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citotóxicos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* PNAS (Estados Unidos) 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse con C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y eliminación/semivida *in vivo* usando

métodos conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en la sección de Ejemplos.

Anticuerpos humanizados

5 La presente divulgación puede usarse en relación con anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) Science 239: 1534-1536), sustituyendo con secuencias de región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método "del mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como el marco conservado humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901). Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR de las secuencias receptoras e importadas de modo que se consiga la característica anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia en unión a antígeno.

Variantes de anticuerpo

La invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende modificaciones en la interfaz de polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en el que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en el que la protuberancia puede situarse en la cavidad para promover la formación de complejo de los primer y segundo polipéptidos de Fc. Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.731.168.

Se contemplan una modificación o modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se realice esa secuencia.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. Aquí se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las

5 localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variantes adicionales u otras en, o por, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar la realización de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o la región diana y las inmunoglobulinas expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

10 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

15 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 2 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio de la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla posterior, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y explorarse los productos.

Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

25 Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)).

30

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

5 Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en propiedades de cadenas laterales comunes:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

15 Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los sitios restantes (no conservados).

20 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Un modo conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica maduración de afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) para
25 generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración de alanina para
30 identificar restos de región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente
35 documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

40 Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete de una versión variante o una no variante preparada anteriormente del anticuerpo.

45 Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo la de una cisteína bisagra.

50 De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que un anticuerpo usado en métodos del presente documento puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo en la región Fc. Estos anticuerpos conservarían no obstante sustancialmente las mismas características requeridas para utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que ciertas alteraciones pueden realizarse en la región Fc que daría como resultado unión de C1q alterada
55 (es decir, mejorada o reducida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter Nature 322: 738-40 (1988); patente de Estados Unidos n.º 5.648.260; patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; y documento WO94/29351 que se refiere a otros ejemplos de variantes de región Fc.

60 Inmunocnjugados

La invención también se refiere a inmunocnjugados, o conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; Patente de Estados Unidos 4.975.278) permite teóricamente suministro dirigido del resto farmacológico a tumores, y acumulación intracelular en los mismos, cuando la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para células normales así como las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (15 Mar. 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (ed.s), pp. 475-506). Se busca por lo tanto la eficacia máxima con toxicidad mínima. Tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales se han presentado como útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) mencionado anteriormente). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler *et al* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92 (19): 1573-1581; Mandler *et al* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler *et al* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al* (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman *et al* (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos incluyendo unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptor de proteína.

ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido con un quelante de enlazador de tiourea (Wiseman *et al* (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27 (7): 766-77; Wiseman *et al* (2002) *Blood* 99 (12): 4336-42; Witzig *et al* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (10): 2453-63; Witzig *et al* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (15): 3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (NHL), la administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (ozogamicina de gemtuzumab, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto de un anticuerpo hu CD33 unido a caliqueamicina, se aprobó en el 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25 (7): 686; patentes de Estados Unidos n.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). La mertansina de cantuzumab (Immunogen, Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto del anticuerpo huC242 unido mediante el enlazador de disulfuro SPP con el resto farmacológico maitansinoide, DM1, está avanzando a ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto del anticuerpo monoclonal anti antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido al resto farmacológico maitansinoide, DM1, se está desarrollando para el tratamiento potencial de tumores prostáticos. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos de CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina *et al* (2003) *Nature Biotechnology* 21 (7): 778-784) y están en desarrollo terapéutico.

Se han descrito anteriormente agentes terapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Está disponible diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}I y ^{186}Re . Se preparan conjugados de anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metilidietilien triaminopentaacético marcado en el carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026.

También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Maitansina y manitansinoides

Opcionalmente, un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) se conjuga con una o más moléculas maitansinoideas.

Los maitansinoideos son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto africano *Maytenus serrata* (patente de Estados Unidos n.º 3.896.111). Posteriormente, se ha descubierto que ciertos microbios también producen maitansinoideos, tales como maitansinol y manitansinol ésteres C-3 (patente de Estados Unidos n.º 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

En un intento de mejorar su índice terapéutico, se han conjugado maitansina y maitansinoideos con anticuerpos que se unen específicamente con antígenos de células tumorales. Se desvelan inmunconjugados que contienen maitansinoideos y su uso terapéutico, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.208.020, 5.416.064 y patente europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describió inmunconjugados que comprendían un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunconjugados en los que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une con un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une con el oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie de HER-2 por célula. El conjugado farmacológico consiguió un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró menor citotoxicidad sistémica en ratones.

Conjugados de anticuerpo-maitansinoide (inmunconjugados)

Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide enlazando químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en la potenciación de citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o la solubilidad del anticuerpo, incluso aunque se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Se conocen bien en la técnica maitansinoideos y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoideos adecuados, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente indicadas anteriormente en el presente documento. Son maitansinoideos preferidos maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo los desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 o patente EP 0 425 235 B1, y Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos de tioéter, grupos lábiles por ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa o grupos lábiles por esterasa, como se ha desvelado en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y maitansinoide usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Bio-chem. J. 173: 723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse con la molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En un ejemplo preferido, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase patentes de Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1 , α_2' , α_3' , N-acetil- γ_1 , PSAG y θ_1 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse en anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen BCNU, estreptomicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente complejo LL-E33288 descrita en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos sin unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

También se describe en el presente documento un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

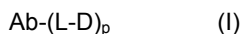
Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de diversas maneras. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos químicos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor 19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio 90 mediante un resto de lisina. El método de IODOGEN (Fraker *et al* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietil triaminopentaacético marcado en el carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5.208.020).

Los compuestos pueden prepararse por ADC con reactivos de entrecruzamiento: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona) benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos). Véase páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de fármaco y anticuerpo

En los conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC), un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos farmacológicos (D), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos farmacológicos por anticuerpo, mediante un enlazador (L). El ADC de Formula I puede prepararse por varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo.



Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N-terminales, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos de tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, acetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir enlaces de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada enlace de cisteína formará por lo tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) lo que da como resultado la conversión de una amina en un tiol.

También pueden producirse conjugados de fármacos y anticuerpos por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos farmacológicos. Los grupos de base de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable o pueden reducirse, por ejemplo por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. Opcionalmente, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). Opcionalmente, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N terminales pueden reaccionar con metaperoyodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con un resto farmacológico o nucleófilo enlazador.

De forma similar, los grupos nucleófilos en un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación; grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

Como alternativa, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

Opcionalmente, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en pre dirección tumoral en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada de conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y administración después de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están disponibles fácilmente. Preferentemente, los restos adecuados para derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o bien copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unido al anticuerpo puede

variar, y si están unidos más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para derivatización puede determinarse basándose en consideraciones incluyendo, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo para mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

5

Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; o conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menores de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina en suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para que se trate la indicación particular, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos también pueden atraparse en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración usando membranas de filtración estéril.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinil alcohol)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de L ácido glutámico y y etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etilen-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermolecular mediante intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

55

Usos

Puede usarse un anticuerpo, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Los anticuerpos pueden usarse como un antagonista para bloquear parcial o completamente la actividad antigénica específica *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*. Además, al menos algunos de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden neutralizar la actividad de antígeno de otras especies. En consecuencia, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para inhibir una actividad de antígeno específica, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos de mamífero que tienen el antígeno con el que un anticuerpo de la invención reacciona de forma de forma cruzada (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). Opcionalmente, el anticuerpo puede usarse para inhibir actividades de antígeno poniendo en contacto el anticuerpo con el antígeno de modo que se inhiba la actividad del antígeno. Preferentemente, el

65

antígeno es una molécula proteica humana.

Opcionalmente, un anticuerpo puede usarse en un método para inhibir un antígeno en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de antígeno es perjudicial, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de modo que la actividad del antígeno en el sujeto se inhiba. Preferentemente, el antígeno es una molécula proteica humana y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno con el que se une un anticuerpo. Además, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido el antígeno (por ejemplo, mediante administración del antígeno o por expresión de un transgén de antígeno). Un anticuerpo puede administrarse a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, un anticuerpo puede administrarse a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que la inmunoglobulina reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y ciclos temporales de administración). Los anticuerpos de bloqueo que son terapéuticamente útiles incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, anticuerpos anti-HER2, anti-VEGF, anti-IgE, anti-CD11, anti interferón, anti receptor de interferón, anti factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), anti c-met, y anti factor tisular. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar, inhibir, retardar la progresión de, evitar/retardar la reaparición de, aliviar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados con expresión y/o actividad anómala de una o más moléculas antigénicas, incluyendo pero sin limitación tumores malignos y benignos; tumores malignos linfoides y distintos de leucemia; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, del estroma y del blastocelo; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

Opcionalmente, un anticuerpo de bloqueo es específico para un antígeno ligando, e inhibe la actividad del antígeno bloqueando o interfiriendo con la interacción del ligando-receptor que implica el antígeno ligando, inhibiendo de este modo la ruta de señal correspondiente y otros acontecimientos moleculares o celulares. También se presentan anticuerpos específicos de receptor que no evitan necesariamente la unión a ligando pero interfieren con la activación del receptor, inhibiendo de este modo cualquier respuesta que se iniciaría normalmente por la unión a ligando. También están abarcados anticuerpos que se unen preferente o exclusivamente con complejos de ligando-receptor. Un anticuerpo también puede actuar como un agonista de un receptor de antígeno particular, potenciando, mejorando o activando de este modo todas las actividades o actividades parciales de la activación de receptor mediada por ligando.

Opcionalmente, un inmunocombinado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico se administra al paciente. Opcionalmente, el inmunocombinado y/o antígeno con el que se une se internaliza por la célula, dando como resultado eficacia terapéutica aumentada del inmunocombinado en la destrucción de la célula diana con la que se une. Opcionalmente, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula diana. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos observados en el presente documento (tales como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radiactivo, o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo puede coadministrarse con otro anticuerpo, agente o agentes quimioterapéuticos (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), otro agente u otros agentes citotóxicos, agente o agentes antiangiogénicos, citocinas y/o agente o agentes inhibidores del crecimiento. Cuando un anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o más agentes terapéuticos adicionales que también inhiben el crecimiento tumoral. Por ejemplo, un anticuerpo puede combinarse con un anticuerpo anti VEGF (por ejemplo, AVASITN) y/o anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo anticuerpo anti HER2 HERCEPTIN®) en un esquema de tratamiento, por ejemplo en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de mama metastásico y cáncer de riñón. Como alternativa, o adicionalmente, el paciente puede recibir radioterapia combinada (por ejemplo irradiación de haz externo o terapia con un agente marcado radiactivo, tal como un anticuerpo), dichas terapias combinadas observadas anteriormente incluyen administración combinada (cuando los dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo puede realizarse antes y/o después de la administración de la terapia o las terapias adjuntas.

El anticuerpo (y agente terapéutico adjunto) se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra convenientemente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante inyecciones, tal como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La composición de anticuerpo se formulará, se dosificará y se administrará de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el ser mamífero particular que se trate, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. El anticuerpo se formula oficialmente, aunque no es necesario, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se han usado anteriormente en el presente documento o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones empleadas hasta el momento.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo (cuando se usa solo o en combinación con otros agentes tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad para tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10 mg/kg) del anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, como mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 µg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Pueden administrarse una dosis de carga inicial mayor, seguido de una o más dosis menores. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En progreso de esta terapia se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Artículos de fabricación

También se describe en el presente documento que se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que está por sí sola o cuando se combina con otra composición eficaz para tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la afección, y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo descrito en el presente documento. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección elegida, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo descrito en el presente documento; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico adicional. El artículo de fabricación puede comprender además un prospecto que indica que las primera y segunda composiciones de anticuerpo pueden usarse para tratar una afección particular, por ejemplo cáncer. Como alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Ejemplos

El rendimiento y calidad de cualquier biblioteca (por ejemplo, biblioteca presentada en fagos), medida por las afinidades y función diseñada de miembros de unión derivados (por ejemplo, anticuerpos) de la biblioteca, se determina en gran parte por los tamaños de biblioteca, lo que a su vez está limitado por las eficacias de la transformación del ADN de biblioteca en *Escherichia coli*. Como resultado, se ha observado que las bibliotecas de la técnica que tienen fuentes exitosas de polipéptidos de unión con respecto a muchos antígenos diana, no han sido no obstante exitosas para todos los antígenos diana a pesar de esfuerzos de exploración extensivos. Para abordar esta falta de éxito, y basándose en parte en nueva información acerca de la diversidad de anticuerpos humanos, y éxito en la reducción de la redundancia de codones y aumento de la eficacia de mutagénesis, los inventores han diseñado y realizado técnicamente un nuevo conjunto de bibliotecas de anticuerpos en fagos sintéticas de alta calidad. Estas

bibliotecas, también denominadas bibliotecas VH/VL, pueden basarse en una única secuencia molde, por ejemplo la de anticuerpo humanizado 4D5-8, que se sabe que se presenta bien en superficie de fagos, así como que es capaz de expresarse como Fab (u otro fragmento de anticuerpo) o anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, IgG). En una realización, las HVR molde se sustituyeron con secuencias consenso para evitar sesgar las características de unión de polipéptidos hacia antígenos particulares (por ejemplo, antígenos que comparten similitud con el antígeno diana de 4D5-8). Sin quedar ligado a la teoría, se cree que los bucles de HVR-H1, -H2, -H3 y -L3 están en proximidad estrecha, y son críticos para la unión a antígeno. En consecuencia, en las bibliotecas descritas en el presente documento, se eligió un subconjunto de posiciones en HVR-H1, -H2, -H3 y -L3 (también denominadas CDR-H1, -H2, -H3 y -L3, respectivamente, posteriormente en el presente documento) para diversificación usando criterios de alta exposición al disolvente y/o variabilidad especialmente alta entre secuencias de anticuerpos naturales. El diseño de la diversidad fue para imitar en la medida de lo posible la diversidad natural de la inmunoglobulina humana. Para mejorar la eficacia de mutagénesis (por ejemplo mutagénesis de Kunkel) minimizando al mismo tiempo el ruido de fondo debido a recuperación de secuencias molde no mutadas, se introdujeron codones de terminación en un número limitado de HVR, por ejemplo solamente en HVR-H3.

Materiales y métodos

Materiales

Las enzimas y el fago auxiliar M13-KO7 fueron de New England Biolabs. *E. coli* XL-1 Blue fue de Stratagene (La Jolla, CA). Las inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos fueron de NUNC (Roskilde, Dinamarca). Albúmina de suero bovino (BSA), Tween 20 y peroxidasa de rábano rusticano conjugada con IgG antihumano (HRP) fueron de Sigma (St. Louis, MO). HRP conjugada con neutravidina, caseína, estreptavidina y Superblock fueron de Pierce (Rockford, IL). HRP conjugada con anti-M13 fue de Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ). El sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) fue de Kirkegaard and Perry Laboratories (Gaithersburg, MD). Las microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5), clorhidrato de *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS), y etanolamina para análisis de BIAcore fueron de BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). El tampón de disociación celular e IgG de cabra anti humano PE-Fab'₂, anticuerpo específico de Fc para citometría de flujo fueron de Gibco (Gaithersburg, MD) e ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), respectivamente. Las degeneraciones de ADN equimolares se representan en el código IUB (B=C/G/T, D=A/G/T, M=A/C, N=A/C/G/T, R=A/G, S=G/C, W=A/T). Los reactivos de fosforamidas triméricas (codón trinucleotídico) fueron de Glen Research (Sterling, VA). Los antígenos diana (en lo sucesivo en el presente documento "AD") y oligonucleótidos se generaron de acuerdo con técnicas de biología molecular convencionales (Genentech, Inc., South San Francisco, CA).

Construcción de biblioteca no tratada previamente de VH/VL – Se generó un molde de biblioteca no tratada previamente de VH/VL que comprendía CDR-L1, -L2, -L3, -H1 y -H2 consenso usando mutagénesis dirigida a oligonucleótidos en el fagémido pV0350-4 con codones en terminación en CDR-H3 y que se presentaba bivalente en las superficies de partículas de bacteriófago M13 (11). Se construyeron bibliotecas presentadas en fagos usando en método de mutagénesis de Kunkel como se ha descrito (26), con una mezcla de oligonucleótidos mutagénicos diseñados para introducir mutaciones en los sitios diseñados en CDR-L3, H1, H2 y H3 y reparar codones de terminación de CDR-H3. Las reacciones de mutagénesis (~10 mg de ADN) se introdujeron por electroporación en células *E. coli* SS320 (~10¹¹ células), como se ha descrito previamente (10).

Clasificación y exploración de bibliotecas para identificar anticuerpos anti AD – Se clonaron secuencias codificantes de AD humano y murino en vector de expresión de mamífero y se expresaron en células CHO. Se expresaron formas truncadas del AD en baculovirus. Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos NUNC durante una noche a 4 °C con AD (10 ug/ml) y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente (AD) con tampón de bloqueo de fagos PBST (PBS y BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 %). Las bibliotecas de fagos de anticuerpos se añadieron a placas de antígenos y se incubaron durante una noche a TA. Al día siguiente las placas recubiertas con antígeno se lavaron 10 veces con PBT (PBS con T-20 al 0,05 %), y los fagos unidos se eluyeron con HCl 50 mM y NaCl 500 mM durante 30 minutos y se neutralizaron con volumen igual de base Tris 1 M pH 7,5. El fago recuperado se amplificó en células *E. coli* XL-1 Blue. Durante los ciclos de selección posteriores, la incubación de fagos de anticuerpos con las placas cubiertas con antígeno se redujo hasta 2-3 horas, y la rigurosidad del lavado de placas se aumentó gradualmente (hasta 30 x lavados (2º ciclo), 40 x lavados (3º ciclo), y 40 x lavados más 1 h de lavado a TA (4º ciclo). El fago eluido de los tercer y cuarto ciclos se valoró en plagas de agar de 2YT/carbenicilina/tetraciclina para determinar el enriquecimiento específico de antígeno.

Se ensayaron 96 clones elegidos aleatoriamente seleccionados del 4º ciclo usando un ELISA de fagos de alto rendimiento para comprobar la unión con AD, un anticuerpo anti gD y dos proteínas no relevantes (BSA y un anticuerpo anti IgE disponible en el mercado). Solamente los clones con unión específica a AD y anticuerpo anti gD se sometieron a análisis de secuencia de ADN de región V_L y V_H. *Afinidades de unión, especificidad y análisis de citometría de flujo de anticuerpos anti AD* – Se determinaron los valores de CI₅₀ de anticuerpos en fagos usando ELISA de unión a fago competitiva como se ha descrito (11). Las curvas de competición están ajustadas con un programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software) para determinar los valores de CI₅₀ que se calcularon como la concentración de antígeno en estadio de unión en solución que inhibía el 50 % de la unión de anticuerpo presentado en fagos con antígeno inmovilizado.

Los clones de interés se reformatearon después en IgG clonando región V_L y V_H de clones individuales en vector LPG3 y LPG4 respectivamente (12), se expresaron de forma transitoria en células de mamífero y se purificaron con columnas de proteína A. Para determinaciones de afinidad de unión de IgG anti AD, se usó medición por resonancia de plasmón superficial (SPR) con un instrumento BIAcore™- 3000. Se acoplaron IgG anti-AD a microplacas biosensoras CM5 activadas para conseguir aproximadamente 500 unidades de respuesta (UR), seguido de bloqueo de grupos que no habían reaccionado con etanolamina 1 M. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie dobles de AD (0,7 a 500 nM) en tampón PBST a 25 °C con un caudal de 30 μ l/min. Se calcularon las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (BIAcore Evaluation Software versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} .

Para ensayos de especificidad de unión, se incubaron 10 μ g/ml de IgG en tampón PBST con placas Maxisorp de 96 pocillos recubiertas con antígeno 2 μ g/ml durante al menos 1 h y las placas se lavaron con tampón PBT. Se detectaron anticuerpos unidos con conjugados de HRP y anticuerpo anti humano, se desarrollaron con sustrato de TMB durante aproximadamente 5 minutos, se detuvieron con H_3PO_4 1 M, y se leyeron espectrofotométricamente a 450 nM.

Para análisis de citometría de flujo, las células HUVEC se desprendieron de los matraces de cultivo tisular con tampón de disociación celular. Las células disociadas se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS que contenía suero bovino fetal al 2 % (tampón FACS). Las células se incubaron con anticuerpos anti AD 10 μ g/ml o anticuerpo de control (un anticuerpo anti IgE disponible en el mercado) en tampón de FACS en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron después dos veces en PBS, y se tiñeron en tampón de FACS con IgG de cabra antihumano PE-Fab'2, anticuerpo específico de Fc en hielo durante 30 minutos. Después de dos lavados de PBS, las células se resuspendieron en 200 μ l de tampón FACS y se analizaron por citometría de flujo (FACS calíber, Benton Dickenson, Mountain View, CA) usando software Cell-Quest.

Función de bloqueo en ensayo de unión – Para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti AD para bloquear la unión del AD con su ligando, se incubaron en primer lugar diluciones en serie triples de anticuerpos con placa Maxisorp de 96 pocillos recubierta con AD (5 μ g/ml) en tampón de PBST durante 1-2 h, seguido de adición de ligando 1 nM biotinilado durante 15 minutos. La cantidad de ligando biotinilado que se unía con AD se detectó por conjugados de estreptavidina -HRP.

Maduración de afinidad del clon X del anticuerpo anti AD – Para generar el molde de biblioteca para maduración de afinidad del clon X (uno de los clones de anticuerpos anti AD seleccionados), se retiró en primer lugar la cremallera de leucina GCN4 del fagémido parental usando mutagénesis de Kunkel para proporcionar un formato de Fab de presentación monovalente. Se incorporó un codón de terminación en CDR-L3. Se usó una estrategia de selección aleatoria suave para maduración de afinidad, que introdujo la tasa de mutación de aproximadamente el 50 % en las posiciones seleccionadas por el ADN mutagénico sintetizado con mezclas 70-10-10-10 (%) de bases que favorecen los nucleótidos de tipo silvestre (27). Se generaron tres bibliotecas diferentes con combinaciones de bucles de CDR, selección aleatoria de L1/L2/L3, L3/H1/H2 y L3/H3, mediante selección aleatoria suave de restos seleccionados en las posiciones 28-32 de CDR-L1; 50 y 53-55 de CDR-L2; 91,92, 93, 94 y 96 de CDR-L3; 28-35 de CDR-H1; 50-58 de CDR-H2; y 95-100 de CDR-H3.

Para selección de clones con afinidad madurada, las bibliotecas de fagos se sometieron a clasificación en placas para el primer ciclo y seguido de cuatro ciclos de clasificación en fase de solución como se ha descrito previamente (11). En el primer ciclo de clasificación en placas, se añadieron tres bibliotecas a placas recubiertas con AD por separado durante 1 h a 37 °C. Después de eso, se realizaron cuatro ciclos de clasificación en fase de solución para potenciar la eficacia de selección basada en afinidad con rigurosidad creciente de la siguiente manera: ciclo 2 (AD biotinilado 5 nM), ciclo 3 (AD biotinilado 1 nM), ciclo 4 (AD biotinilado 0,5 nM y competidor de AD no biotinilado 250 nM a 37 °C durante 1 h) y ciclo 5 (AD biotinilado 0,5 nM y competidor de AD no biotinilado 500 nM a 37 °C durante 3 h). Durante el proceso de selección, se incluyó la reacción sin AD biotinilado y actuó como la unión a fago de fondo para calcular el enriquecimiento de cada ciclo de selección.

Después de cinco ciclos de selección, se usó un ELISA de fagos competitivo de puntos individuales de alto rendimiento para explorar rápidamente con respecto a clones de alta afinidad como se ha descrito (10). Se eligieron clones con baja relación de la absorbancia 450 nm en presencia de AD 5 nM con respecto a en ausencia de AD para caracterización adicional.

Resultados

Diseño y construcción de bibliotecas de fagos de anticuerpos VH/VL – la biblioteca de VH/VL descrita en el presente documento utilizó el marco conservado $V_{L-kappa I}$ y $V_{H-subgrupo III}$ derivado de rhuMAB4D5-8, que se ha mostrado que se presenta bien en bacteriófagos, se expresa bien en *E. coli*, y que puede convertirse rápidamente en un IgG de longitud completa que se expresa bien en células de mamífero (11,12). Las bibliotecas se presentaron en la superficie de fagos como un Fab bivalente fusionándose con la proteína de recubrimiento de fagos P3. Se pretendió que esta presentación bivalente aumentara las afinidades de unión aparentes para antígenos inmovilizados y ayudara a mejorar la recuperación de clones de anticuerpos de fagos poco habituales y/o de baja afinidad.

Para evitar sesgos potenciales heredados de las secuencias de CDR derivadas de rhuMAB4D5-8 mantenidas en la cadena ligera de la biblioteca de VH, se introdujeron secuencias de CDR kappa I consenso en el molde para la biblioteca de VH/VL. Se determinaron los restos de CDR consenso seleccionando los anticuerpos más prevalentes existentes en anticuerpos humanos naturales. Los codones de terminación, previamente empleados en la cadena pesada de una biblioteca "VH" para asegurar la mutagénesis en las 3 CDR (11), se reemplazaron de forma similar con secuencias del subgrupo III consenso para CDR-H1 y CDR-H2. Las secuencias de CDR consenso representan el aminoácido más prevalente en cada posición (Figura 1B). CDR-H3 desempeña un papel dominante en el reconocimiento de antígenos, por lo tanto se colocaron varios codones de terminación en H3 para asegurar que los clones de anticuerpos funcionales de las bibliotecas eran diferentes entre sí (28). Se esperaba que la presencia de secuencias de CDR consenso humanas permitirán presentar variantes parcialmente mutadas (no todas las CDR diana se cambian) y que permanecieran potencialmente funcionales en la unión. De esta manera el diseño de VH/VL tiene la ventaja de aumentar la relación de clones de anticuerpos de fagos funcionales en la biblioteca. Las secuencias de CDR usadas fueron SISSYL (SEQ ID NO: 75) para CDR-L 1 (posiciones 28-33), GASSRA (SEQ ID NO: 76) para CDR-L2 (posiciones 50-55), YYSSPL (SEQ ID NO: 77) para CDR-L3 (posiciones 91-96), FTFSSYAMS (SEQ ID NO: 78) para CDR-H1 (posiciones 27-35), and RISPSGGSTY (SEQ ID NO: 79) para CDR-H2 (posiciones 50-58) y WXXXRPXXMDY (SEQ ID NO: 80) para CDR-H3 (posiciones 95-102, X es un codón de terminación) como se muestra en la Figura 1B. También se muestra la prevalencia de cada posición en anticuerpos humanos en la Figura 1B.

Se introdujo diversidad en la biblioteca VH/VL en un subconjunto de posiciones de CDR basadas en su alta exposición al disolvente y/o especialmente alta variabilidad entre secuencias de anticuerpos naturales. Las posiciones elegidas para mutagénesis y la diversidad que se introdujo se muestran en la Figura 4C. Por ejemplo, en CDR-H1, se eligieron las posiciones 27, 28, 30, 31, 32, 33 y 34 para diversificación. Para el diseño de biblioteca de VH/VL, se usaron codones o trinucleótidos de oligos degradados para guiar la diversidad en cada posición de modo que estuvieran representados los aminoácidos más prevalentes. En CDR-H1 (posición 30), la serina representa aproximadamente el 50 % de la diversidad natural, de modo que se usara una mezcla de trinucleótidos (X1) que tienen aproximadamente 52 % de serina y 2,5 % de cada uno de los 19 aminoácidos excepto cisteína (Figura 4B).

CDR-H3 y CDR-L3 forman el centro del sitio de unión a antígeno y por lo tanto muestran la mayor frecuencia de contactos con el antígeno en complejos de anticuerpo-antígeno estructuralmente conocidos (29). Se seleccionaron aleatoriamente cinco restos en CDR-L3 (Figura 4C) con la mayor variabilidad. En general CDR-H3 es la más diversa con respecto a longitud, secuencia y estructura y es un componente clave de la diversidad de anticuerpos naturales (28,30). Por lo tanto se construyeron 12 sub bibliotecas con diferentes longitudes de CDR-H3 que variaba de 9 a 20 aminoácidos. Combinadas, estas sub bibliotecas abarcan aproximadamente el 90 % de la variación de longitud de CDR-H3 en anticuerpos naturales. Se sintetizaron oligonucleótidos que codificaban CDR-H3 usando codones trinucleotídicos. Esto permitió a los inventores suprimir fácilmente cisteína (poco habitual en CDR-H3), y reforzar los niveles de glicina, tirosina y serina, los restos más abundantes en CDR-H3 (15). Se usó el codón X7, una mezcla trinucleotídica de aproximadamente 15,6 % de cada serina, tirosina y glicina, con 3,1 % de cada uno de los aminoácidos restantes excepto cisteína, para cada posición en CDR-H3 (cálculos teóricos para la mezcla de todos los trinucleótidos). También se usaron diferentes combinaciones de trinucleótidos en posiciones seleccionadas de CDR-H1, H2, H3 y L3. Como se muestra en la Figura 4C y Figura 4B, los codones X1 a X6 tienen un alto porcentaje de serina, tirosina o glicina. X1 tiene 52,5 % de serina, X2 tiene 52,5 % de tirosina, X3 tiene 10 % de tirosina, glicina o serina, X4 tiene 28,8 % de glicina, X5 tiene 19,2 % de tirosina, glicina o serina, y X6 tiene 20 % de tirosina o serina. Se estimó que la biblioteca de fagos de anticuerpos VH/VL tenía aproximadamente 10^{10} variantes presentadas.

Selección de anticuerpos que se unen con AD tanto humano como murino – Las 12 sub bibliotecas VH/VL se seleccionaron individualmente frente a proteína AD-Fc humana expresada en célula CHO inmovilizada para el primer ciclo de selección. Los fagos eluidos de cada sub biblioteca se amplificaron y después se combinaron para un segundo ciclo de selección. Ya que AD humano (hAD)-Fc se usó como el antígeno. El fago agrupado se preabsorbió con proteína de fusión Fc irrelevante en exceso después del primer ciclo de selección para minimizar la recuperación de anticuerpos de fagos anti Fc. Después del cuarto ciclo de selección, se evaluaron 95 clones de fagos seleccionados aleatoriamente con respecto a la capacidad para unirse específicamente con AD. Noventa por ciento de los clones eran positivos para unión con hDA y 40 % de los clones positivos se unieron con AD tanto humano como murino.

Estos clones de fagos se secuenciaron, se seleccionaron 10 clones únicos que se unían con AD humano y murino para caracterización adicional. Todos se unían con AD tanto humano como murino con una Cl_{50} por debajo de 70 nM en el ELISA de fagos. El clon Y se unió con AD humano y murino con Cl_{50} de 0,5 y 3,4 nM, respectivamente. Las secuencias de los 10 clones reflejan el diseño de biblioteca de VH/VL, longitudes de CDR-H3 variables, diversidad de secuencia distribuida por las CDR-H1, H2 y L3, y algunas secuencias de CDR consenso del molde de biblioteca. Los clones Y y Z tienen cambios en las 4 CDR y también tienen las mejores afinidades de unión con AD tanto humano como murino (clon Y: Cl_{50} ~3,4 nM y 0,48 nM para AD murino y humano, respectivamente; clon Z: Cl_{50} -9,9 nM y 2,7 nM para AD murino y humano, respectivamente).

Se usaron variantes con dominios truncados de AD humano para identificar y seleccionar con respecto a anticuerpos de fagos que se unían con dominios de interés en el AD (datos no mostrados).

Caracterización de IgG anti AD seleccionado – se reformatearon clones anti AD seleccionados en IgG1 humano de longitud completa, se expresó en células CHO y se purificó para caracterización adicional. Los anticuerpos de fagos anti AD clon Y y X se unieron específicamente con AD humano y murino y no se unieron con la forma humana o murina de otro miembro de la misma familia que el AD, ErbB2-ECD o BSA. Cada uno de los otros ocho anticuerpos de fagos mostró especificidad similar (datos no mostrados). Por resonancia de plasmón superficial, IgG de clon Y y clon X inmovilizado no interaccionó con estos antígenos a concentraciones de hasta 500 nM. Sin embargo, tanto el clon Y como el clon X se unieron con AD humano con una Kd de 0,9 y 5 nM así como AD murino con una Kd de 7,8 y 11 nM, respectivamente. Aunque estos anticuerpos se seleccionaron usando antígeno inmovilizado en placas, el análisis de FACS demostró que todas la IgG purificadas también se unían con células que expresaban AD de forma endógena.

Los anticuerpos seleccionados también se evaluaron con respecto a actividad de bloqueo de función en ensayos biológicos. Los resultados mostraron que estos anticuerpos poseían la capacidad de bloquear las funciones biológicas del AD. *Maduración de afinidad del clon X* – El clon X se unió con AD tanto humano como murino con una Cl_{50} de fago de 5 y 11 nM, respectivamente, y bloqueó completamente la unión de ligando a AD *in vitro*. Para mejorar la potencia *in vivo*, se maduró la afinidad de este clon usando AD humano-His. Se dirigieron tres combinaciones de CDR diferentes, L1/L2/L3, L3/H1/H2 y L3/H3, para selección aleatoria usando una estrategia de “selección aleatoria blanda”, que mantiene un sesgo de secuencia de tipo silvestre de modo que las posiciones seleccionadas se mutan solamente el 50 por ciento de las veces (27). Para maduración de afinidad, el Fab monovalente se presentó en fagos en lugar de Fab bivalente para reducir la avidéz potencial durante la selección. Los codones de terminación se introdujeron en CDR-L3 en cada sub biblioteca. Se emplearon estrategias de selección de velocidad de disociación (véase métodos) para mejorar la afinidad del clon X, ya que ya poseía una constante de velocidad de asociación relativamente alta ($2,2 \times 10^5$), pero la constante de velocidad de disociación ($1,1 \times 10^{-3}$) era relativamente rápida.

En el primer ciclo de selección, las 3 bibliotecas con selección aleatoria blanda de CDR se seleccionaron frente a hAD inmovilizado seguido de ciclos posteriores con una estrategia de clasificación en fase de solución para limitar la concentración diana y potenciar la selección basada en afinidad. La concentración de hAD biotinilado se redujo gradualmente de 5 a 0,5 nM y se añadió un exceso de 500 veces de hAD no biotinilado para competir por los agentes de unión de velocidad de disociación rápida. La mezcla también se incubó a 37 °C durante hasta 2 h.

La biblioteca de L1/L2/L3 mostró enriquecimiento significativo después del ciclo 5. Se seleccionaron aleatoriamente noventa y seis clones, se secuenciaron y después se clasificaron las afinidades. Se seleccionaron veintitrés clones de fagos únicos y se purificaron con respecto a caracterización adicional. La mayoría de los clones tenían afinidad mejorada por hAD como se determinó por ELISA de competición de fagos. Sorprendentemente, la afinidad por mAD también se mejoró a pesar de omitirse del proceso de selección, lo que sugiere que los clones se unieron con un epítipo conservado. Los clones seleccionados tenían de 4 a 7 cambios en las 3 CDR de cadena ligera; las posiciones 28 y 30 en CDR-L1 tendían a sustituirse con tirosina e histidina, respectivamente, mientras que las posiciones 92, 93 y 96 en CDR-L3 eran más diversas.

Los clones con la mayor afinidad por AD tanto humano como murino (clon X-1, -2, -3, -4, -5 y -6) se reformatearon y se expresaron como anticuerpos de longitud completa. Las 6 IgG tenían afinidad mejorada por hAD y mantuvieron bloqueo completo de unión a ligando (datos no mostrados). Las afinidades por AD humano y murino variaron de 0,4 a 1,8 nM. La constante de velocidad de disociación del clon X-6 se mejoró, lo que conducía a una mejora general de la afinidad de aproximadamente 10 veces para AD tanto humano como murino; no se observó unión con la forma humana o murina de un miembro de la misma familia que AD. El clon X-6 también mostró unión mejorada con AD de superficie celular.

Eficacia de los anticuerpos anti AD con afinidad madurada en ensayos de migración y de crecimiento tumoral – Los anticuerpos anti AD con afinidad mejorada fueron drásticamente más eficaces que el clon parental en el antagonismo de migración celular inducida por ligando. El clon de X-6 también se evaluó para y mostró que poseía la capacidad de reducir el crecimiento tumoral (incluyendo el crecimiento tumoral en modelos de carcinoma de pulmón y de colon).

Análisis

Las bibliotecas de diversidad, sintéticas y naturales, son una fuente importante de anticuerpos. La biblioteca de anticuerpos de fagos sintéticos de VH/VL descrita en el presente documento usó un armazón definido e introdujo diversidad de secuencia de una manera específica de sitio usando ADN sintético y mutagénesis dirigida. El rendimiento de cualquier biblioteca de fagos de anticuerpos, medido por las afinidades y la función diseñada de anticuerpos derivados, se determina por el tamaño de la biblioteca, lo que a su vez está limitado por la eficacia de transformación del ADN de la biblioteca en *Escherichia coli*. Para limitar la diversidad del diseño de biblioteca, se usaron secuencias de anticuerpos naturales para guiar dónde y qué tipo de diversidad debería introducirse. La composición de aminoácidos en muchas posiciones de CDR está altamente sesgada en el repertorio natural; por ejemplo, la tirosina es altamente abundante en sitios de unión a antígeno, lo que representa aproximadamente el 10 % de la composición de CDR total y aproximadamente 25 % de contactos de antígenos (33). El diseño del oligonucleótido en la biblioteca de VH/VL (especialmente X1 a X7) fue un intento de reflejar este sesgo, y esta

diversidad química ha permitido a los inventores obtener ciertos anticuerpos funcionales que pueden estar ausentes en la biblioteca de "VH" (11). A diferencia de la biblioteca de "VH" que incorporaba diversidad solamente en posiciones de CDR de cadena pesada, este diseño de biblioteca también incluyó posiciones dentro de CDR-L3 de la cadena ligera y usó trinucleótidos preensamblados durante las síntesis de oligonucleótidos para reducir la redundancia inherente en el código genético. Además, la biblioteca de VH/VL usó secuencias de CDR consenso en todos excepto CDR-H3. Una estructura cristalina de un Fab seleccionado de esta biblioteca mostró la conformación canónica esperada. Esta biblioteca se ha expuesto a varios antígenos proteicos y ha producido con éxito muchos anticuerpos de fagos funcionales con afinidades en el intervalo de 1-100 nM. Aunque las afinidades de anticuerpos funcionales de la biblioteca de "VH" o VH/VL son similares, las diversidades químicas de las dos bibliotecas son diferentes, y por lo tanto pueden funcionar para antígenos diferentes. La biblioteca de VH/VL es una fuente excelente de anticuerpos con buenas afinidades de unión y/o potencia biológica que son por lo tanto potencialmente útiles para diversas aplicaciones terapéuticas.

Lista parcial de referencias

1. Kohler, G. y Milstein, C. (1975) *Nature* 256 (5517), 495-497
2. Smith, G. P. (1985) *Science* 228 (4705), 1315-1317
3. Bradbury, A. R. y Marks, J. D. (2004) *J Immunol Methods* 290 (1-2), 29-49
4. Lipovsek, D. y Pluckthun, A. (2004) *J Immunol Methods* 290 (1-2), 51-67
5. Feldhaus, M. J. y Siegel, R. W. (2004) *J Immunol Methods* 290 (1-2), 69-80
6. Hoogenboom, H. R. (2005) *Nat Biotechnol* 23 (9), 1105-1116
7. Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A. y Virnekas, B. (2000) *J Mol Biol* 296 (1), 57-86
8. Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J. C. y Marks, J. D. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (11), 6157-6162
9. de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W. y Hoogenboom, H. R. (1999) *J Biol Chem* 274 (26), 18218-18230
10. Sidhu, S. S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F. A., Eigenbrot, C. y Fuh, G. (2004) *J Mol Biol* 338 (2), 299-310
11. Lee, C. V., Liang, W. C., Dennis, M. S., Eigenbrot, C., Sidhu, S. S. y Fuh, G. (2004) *J Mol Biol* 340 (5), 1073-1093
12. Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E. y Shepard, H. M. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (10), 4285-4289
13. Lee, C. V., Sidhu, S. S. y Fuh, G. (2004) *J Immunol Methods* 284 (1-2), 119-132
14. Liang, W. C., Wu, X., Peale, F. V., Lee, C. V., Meng, Y. G., Gutierrez, J., Fu, L., Malik, A. K., Gerber, H. P., Ferrara, N. y Fuh, G. (2006) *J Biol Chem* 281 (2), 951-961
15. Mian, I. S., Bradwell, A. R. y Olson, A. J. (1991) *J Mol Biol* 217 (1), 133-151
16. He, Z. y Tessier-Lavigne, M. (1997) *Cell* 90(4), 739-751
17. Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S. y Tessier-Lavigne, M. (1997) *Neuron* 19 (3), 547-559
18. Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J. y Ginty, D. D. (1997) *Cell* 90 (4), 753-762
19. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. y Klagsbrun, M. (1998) *Cell* 92 (6), 735-745
20. Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T. y Fujisawa, H. (1997) *Neuron* 19(5), 995-1005
21. Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T. y Fujisawa, H. (1999) *Development* 126 (21), 4895-4902
22. Ferrara, N. (2005) *Oncology* 69 Supl 3, 11-16
23. Ferrara, N. y Kerbel, R. S. (2005) *Nature* 438 (7070), 967-974
24. Kerbel, R. S., Yu, J., Tran, J., Man, S., Vilorio-Petit, A., Klement, G., Coomber, B. L. y Rak, J. (2001) *Cancer Metastasis Rev* 20 (1-2), 79-86
25. Jain, R. K., Duda, D. G., Clark, J. W. y Loeffler, J. S. (2006) *Nat Clin Pract Oncol* 3 (1), 24-40
26. Kunkel, T. A., Bebenek, K. y McClary, J. (1991) *Methods Enzymol* 204, 125-139
27. Gallop, M. A., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. y Gordon, E. M. (1994) *J Med Chem* 37 (9), 1233-1251
28. Xu, J. L. y Davis, M. M. (2000) *Immunity* 13 (1), 37-45
29. Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R. y *et al.* (1989) *Nature* 342 (6252), 877-883
30. Wu, T. T., Johnson, G. y Kabat, E. A. (1993) *Proteins* 16 (1), 1-7
31. Gu, C., Limberg, B. J., Whitaker, G. B., Perman, B., Leahy, D. J., Rosenbaum, J. S., Ginty, D. D. y Kolodkin, A. L. (2002) *J Biol Chem* 277 (20), 18069-18076
32. Ferrara, N., Hillan, K. J. y Novotny, W. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 333 (2), 328-335
33. Fellouse, F. A., Wiesmann, C. y Sidhu, S. S. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (34), 12467-12472
34. Kabat, E. A., Wu, T. T. y Bilofsky, H. (1977) *J Biol Chem* 252 (19), 6609-6616

REIVINDICACIONES

1. Una biblioteca de fragmentos de anticuerpos de presentación en fagos que comprende una pluralidad de al menos 1×10^4 fragmentos de anticuerpos distintos,
- 5 en la que cada fragmento de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) de un anticuerpo fuente, en donde V_H comprende:
- (i) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos:
 10 X1-X2-(X3)_n-X4-D-X5
 en donde X1-X5 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína y X1 es la posición de aminoácido 95 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, y $n = 4-17$;
- (ii) una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos:
 15 V-S-X1-I-X2-X3-X4-X5-G-X6-T-X7-Y-A-D-S-V-K-G
 en donde X1-X7 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína y X1 es la posición de aminoácido 50 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y
- (iii) una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos:
 20 G-X1-X2-F-X3-X4-X5-X6-X7-S-W-V
 en donde X1-X7 son aminoácidos de origen natural distintos de cisteína, en donde G es la posición de aminoácido 26 y X1 es la posición 27 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
2. La biblioteca de la reivindicación 1, en la que el V_L en cada fragmento de anticuerpo en la pluralidad de fragmentos de anticuerpo comprende:
- (i) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos:
 25 Q-Q-X1-X2-X3-X4-P-X5-T
 en donde X1-X5 son cualquier aminoácido de origen natural distinto de cisteína y X1 es la posición de aminoácido 91 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
- (ii) una HVR-L que comprende una primera secuencia hipervariable consenso o variante de la misma que
 30 comprende sustitución en una o más posiciones en comparación con una secuencia hipervariable consenso correspondiente; y
- (iii) una HVR-L2 que comprende una segunda secuencia hipervariable consenso o variante de la misma que
 35 comprende sustitución en una o más posiciones en comparación con una secuencia hipervariable consenso correspondiente.
3. La biblioteca de la reivindicación 2, en la que la primera secuencia hipervariable consenso comprende una secuencia de CDR-L1 consenso de Kabat y/o en donde la segunda secuencia hipervariable consenso comprende una secuencia de CDR-L2 consenso de Kabat.
- 40 4. Una biblioteca de polinucleótidos que codifica la pluralidad de los al menos 1×10^4 fragmentos de anticuerpos distintos de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. La biblioteca de polinucleótidos de la reivindicación 4, en la que los polinucleótidos comprenden codones no redundantes para cada aminoácido en cada posición X.
- 45 6. La biblioteca de polinucleótidos de la reivindicación 5, en la que los codones no redundantes comprenden codones trinucleotídicos.
7. La biblioteca de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la probabilidad de que X1 y/o X2 de HVR-H3 sean G es mayor que cualquier otro aminoácido individual.
- 50 8. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la pluralidad de polinucleótidos comprende (i) un primer conjunto de polinucleótidos que comprende un codón que codifica G en X1 y/o X2 de HVR-H3, y (ii) un segundo conjunto de polinucleótidos que comprende un codón que codifica un aminoácido distinto de G en X1 y/o X2 de HVR-H3, en donde el primer conjunto de polinucleótidos está presente en una cantidad mayor que la cantidad de cada subconjunto de polinucleótidos que tienen la misma secuencia de HVR-H3 dentro del segundo conjunto de polinucleótidos.
- 55 9. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y 8, en la que (i) al menos el 20 % (hasta el 29 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H3 comprenden un codón que codifica G en X1 y/o X2; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G en X1 y/o X2 de HVR-H3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G en X1 y/o X2 de HVR-H3 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.
- 60 10. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 y 9, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H3 comprenden un codón que codifica cualquier
- 65

aminoácido individual distinto de G en X1 y/o X2.

- 5 11. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 10, en la que (i) al menos el 10 % (hasta el 20 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H3 comprenden un codón que codifica G, S o Y en X3; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G, S o Y en X3 de HVR-H3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G, S y/o Y en X3 de HVR-H3 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.
- 10 12. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 11, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H3 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G, S o Y en X3.
- 15 13. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 12, en la que (i) al menos el 15 % (hasta el 25 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H2 comprende un codón que codifica S o Y en X2; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica S o Y en X2 de HVR-H2 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de S y/o Y en X2 de HVR-H2 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.
- 20 14. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 13, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H2 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de S o Y en X2.
- 25 15. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 14, en la que (i) al menos el 10 % (hasta el 20 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H2 comprende un codón que codifica G, S o Y en X3 y/o X4; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G, S o Y en X3 y/o X4 de HVR-H2 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G, S y/o Y en X3 y/o X4 de HVR-H2 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.
- 30 16. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 15, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H2 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G, S o Y en X3 y/o X4.
- 35 17. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 16, en la que (i) al menos el 50 % (hasta el 60 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprende un codón que codifica S en X4; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica S en X4 de HVR-H1 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de S en X4 de HVR-H1 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.
- 40 18. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 17, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de S en X4.
- 45 19. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 18, en la que (i) al menos el 50 % (hasta el 60 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprende un codón que codifica Y en X5; o la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica Y en X5 de HVR-H1 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de Y en X5 de HVR-H1 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.
- 50 20. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 19, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de Y en X5.
- 55 21. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 20, en la que (i) al menos el 10 % (hasta el 20 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprende un codón que codifica G, S o Y en X6; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G, S o Y en X6 de HVR-H1 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de G, S o Y en X6 de HVR-H1 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.
- 60 22. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 21, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-H1 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G, S o Y en X6.
- 65 23. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 22 dependiente de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en la que (i) al menos el 15 % (hasta el 25 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprenden un codón que codifica G, S o Y en X2; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica G, S o Y en X2 de HVR-L3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para

proporcionar un sesgo en favor de G, S o Y en X2 de HVR-L3 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.

5 24. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 23 dependiente de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de G, S o Y en X2.

10 25. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 24 dependiente de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en la que (i) al menos el 50 % (hasta el 55 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica S en X3; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica S en X3 de HVR-L3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de S en X3 de HVR-L3 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.

15 26. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 25 dependiente de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de S en X3.

20 27. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 26 dependiente de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en la que (i) al menos el 15 % (hasta el 25 %) de los polinucleótidos que codifican HVR-L3 comprende un codón que codifica S o Y en X4; o (ii) la cantidad de polinucleótido que comprende un codón que codifica S o Y en X4 de HVR-L3 en la pluralidad de polinucleótidos está ajustada para proporcionar un sesgo en favor de S o Y en X4 de HVR-L3 de la pluralidad de fragmentos de anticuerpos distintos.

25 28. La biblioteca de polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 27 dependiente de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en la que no más de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos que codifica HVR-L3 comprende un codón que codifica cualquier aminoácido individual distinto de S o Y en X4.

29. Un método para seleccionar un fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno diana que comprende:

30 a) generar una biblioteca de fragmentos de anticuerpos de presentación en fagos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 7 o una biblioteca de fragmentos de anticuerpos de presentación en fagos codificada por una biblioteca de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 8 a 28;

35 b) seleccionar un fragmento de anticuerpo de unión que se une a un antígeno diana de la composición;

c) aislar el fragmento de anticuerpo de unión de los que no se unen; y

d) identificar agentes de unión de la afinidad deseada de los fragmentos de anticuerpo de unión aislados.

30. Un método para producir un fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno diana, comprendiendo el método:

40 a) realizar el método de la reivindicación 29 para seleccionar con respecto a un fragmento de anticuerpo que se une al antígeno diana; y

b) producir el fragmento de anticuerpo o un derivado del mismo que se une al antígeno diana.

FIG. 1A

Basado en anticuerpo humano subgrupo III en base de datos de Kabat

		CDRL1															CDRL2															CDRL3															CDRH1															CDRH2															CDRH3														
Kabat N.º	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65																																													
molde h4D5	ACC	ATC	ACC	TGC	CGT	GCC	AGT	CAG	TCC	S	I	S	S	Y	L	A	W	TAT	CAA	CAG	AAA	CCA	GGT	AAG	GCC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC																																											
consenso (V0350-4)	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A	W	TAT	Q	Q	K	K	P	P	P	C	R	L	L	Y	G	A	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	F	F	D	S	V	K	G																																											
SEQ ID NO:	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130																																									

		CDRL1															CDRL2															CDRL3															CDRH1															CDRH2															CDRH3														
Kabat N.º	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102																															
molde h4D5	GCT	CCG	AAG	CTT	CTG	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC																																						
consenso (V0350-4)	A	P	K	L	L	L	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	F	F	D	S	V	K	G	L	L	Y	G	A	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	F	F	D	S	V	K	G	L	L	Y																																							
SEQ ID NO:	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140																																		

		CDRL1															CDRL2															CDRL3															CDRH1															CDRH2															CDRH3														
Kabat N.º	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140																																		
molde h4D5	GCA	ACT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAA	TAT	CGT	TCC	S	P	P	L	ACG	TTC	GGA	CAG	GGT	ACC	GGC	CGC	CCG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC																																							
consenso (V0350-4)	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	S	S	P	P	L	ACG	TTC	GGA	CAG	GGT	ACC	GGC	CGC	CCG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC																																								
SEQ ID NO:	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140																																					

		CDRL1															CDRL2															CDRL3															CDRH1															CDRH2															CDRH3														
Kabat N.º	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65																																														
molde h4D5	TCC	TGT	GCA	GCT	TCT	GGC	TTC	TTC	GGC	TTC	S	Y	A	M	S	TGG	GTG	CGT	CAG	GCC	CCG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC																																									
consenso (V0350-4)	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	TGG	W	V	R	Q	A	P	P	C	R	L	L	Y	G	A	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC																																								
SEQ ID NO:	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140																																								

		CDRL1															CDRL2															CDRL3															CDRH1															CDRH2															CDRH3														
Kabat N.º	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102																														
molde h4D5	GGT	AAG	GGC	CTG	GAA	TGG	GTT	ATT	S	R	I	S	P	P	X	S	G	R	P	X	T	TAT	GCC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC																																								
consenso (V0350-4)	G	K	G	L	E	W	V	A	R	I	S	P	P	X	S	G	R	P	X	T	TAT	GCC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC																																									
SEQ ID NO:	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140																																											

		CDRL1															CDRL2															CDRL3															CDRH1															CDRH2															CDRH3														
Kabat N.º	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140																																			
molde h4D5	GAG	GAC	ACT	GCC	GTC	TAT	TAT	TGT	AGC	CGC	TGG	TAA	TAA	AGG	CCG	TAA	TAA	ATG	GAC	TAC	TGG	GGT	CAA	GGA	GGC	CTG	GAA	CTT	ATT	TAC	GCA	TCC	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC																																											
consenso (V0350-4)	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	W	X	X	X	R	P	X	X	M	D	Y	W	G	Q	G	L	L	Y	G	A	S	R	A	TCT	GGA	GTC	CCT	TCT	CGC	TTC	GGC	GAT	AGC	GTC	AAG	GGC																																													
SEQ ID NO:	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140																																														

FIG._1B

CDR	Posiciones	Restos	Prevalencia en ser humano natural
CDR-L1 (SEQ ID NO: 75)	28	S	33
	29	I	40
	30	S	55
	31	S	44
	32	Y	67
CDR-L2 (SEQ ID NO: 76)	33	L	94
	50	G	25
	51	A	79
	52	S	95
	53	S	36
	54	R	60
	55	A	45
CDR-L3 (SEQ ID NO: 77)	91	Y	54
	92	Y	23
	93	S	46
	94	S	24
	95	P	80
	96	L	22
CDR-H1 (SEQ ID NO: 78)	27	F	45
	28	T	54
	29	F	73
	30	S	68
	31	S	50
	32	Y	64
	33	A	22
CDR-H2 (SEQ ID NO: 79)	34	M	46
	35	S	34
	50	R	17
	51	I	84
	52	S	26
	52a	P	29
	53	S	24
	54	G	37
	55	G	53
	56	S	28
57	T	56	
	58	Y	32

FIG._2

CDRL1: Consenso

CDRL2: Consenso

CDRL3: Aleatorio intenso 91, 92, 93, 94, 96

		CDRL1														
Kabat N.º		23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
Consenso	TGC CGT	GCC	AGT	CAG	AGC	ATC	TCC	AGC	TAC	TAC	CTG	GCC	TGG		SEQ ID NO: 99	
	C R A	S Q S	I S S	S S S	Y L A									W	SEQ ID NO: 100	

		CDRL2														
Kabat N.º		47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59		
Consenso	CTG ATT	TAC	GGT	GCA	TCC	AGC	CGC	GCA	TCT	GGA	GTC	CCT			SEQ ID NO: 101	
	L I Y	G A S	S R A	S S G	V P										SEQ ID NO: 102	

		CDRL3														
Kabat N.º		87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99		
Consenso	TAC TGT	CAG	CAA	TAC	TAT	AGC	AGC	CCT	CTG	ACG	TTC	GGA			SEQ ID NO: 103	
	Y C Q	Q Y S	S S S	L T F											SEQ ID NO: 104	
Aleatorio	TAC TGT	CAG	CAA	MGC (567)	(6)	(678)	CCG	NTC	ACC	TTC	GGA				SEQ ID NO: 105	
	Y C Q	Q R/S	Y S Y	F I L	P										SEQ ID NO: 106	
				TAT	G S	18	S	17							SEQ ID NO: 107	
				Y	S	16									SEQ ID NO: 108	
															SEQ ID NO: 109	

FIG. 4A

	5	6	7	8	5/6	5/7	5/8	5/6/7	5/6/8	5/7/8	5/6/7/8	6/7	6/8	6/7/8
A	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
D	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
E	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
F	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
G	52,6	2,5	2,5	5,0	27,5	27,5	28,8	19,2	20,0	20,0	15,6	2,5	3,8	3,3
H	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
I	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
K	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
L	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
M	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
N	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
P	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
Q	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
R	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
S	2,5	52,5	2,5	5,0	27,5	2,5	3,8	19,2	20,0	3,3	15,6	27,5	28,8	20,0
T	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
V	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
W	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5	3,8	2,5	3,3	3,3	3,1	2,5	3,8	3,3
Y	2,5	2,5	52,5	5,0	2,5	27,5	3,8	19,2	3,3	20,0	15,6	27,5	3,8	20,0

FIG. 4B

	X0	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
A	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
D	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
E	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
F	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
G	52,5	2,5	2,5	5,0	28,8	19,2	3,3	15,6
H	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
I	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
K	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
L	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
M	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
N	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
P	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
Q	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
R	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
S	2,5	52,5	2,5	5,0	3,8	19,2	20,0	15,6
T	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
V	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
W	2,5	2,5	2,5	5,0	3,8	2,5	3,3	3,1
Y	2,5	2,5	52,5	5,0	3,8	19,2	20,0	15,6

FIG._4C

CDR	Posiciones	Codon	Diversidad diseño					Cobertura de diversidad natural (%)
			Restos codificados (%)					
			Y	G	S	otros (-Cys)		
CDR-I3	Y91	TAC	100	-	-	-	-	77
		MGC	-	-	-	-	R/S(50)	
	Y92	X5	19,2	19,2	19,2	2,5		100
	S93	X1	2,5	2,5	52,5	2,5		100
	S94	X6	20	3,3	20	3,3		100
	L96	NTC	-	-	-	-	F/I/L/V(25)	45
CDR-H1	F27	TWC	50	-	-	-	F(50)	65
	T28	ASC	-	-	50	-	T(50)	90
	S30	ASC	-	-	50	-	T(50)	86
	S31	X1	2,5	2,5	52,5	2,5		100
	Y32	X2	52,5	2,5	2,5	2,5		100
	A33	X7	15,6	15,6	15,6	3,1		100
	M34	ATS	-	-	-	-	M/I(50)	67
	R50	X3	5	5	5	5		100
	S52	X6	20	3,3	20	3,3		100
	P52a	CCT	-	-	-	-	P(100)	100
CDR-H2	S53	X7	15,6	15,6	15,6	3,1		100
	G54	X7	15,6	15,6	15,6	3,1		100
	S56	RRC	-	-	25	-	D/G/N(25)	81
	Y58	DMT	16,6	-	16,6	-	A/D/N/I(16,6)	81
		DAC	33,3	-	-	-	D/N(33,3)	70
	95	X4	3,8	28,8	3,8	3,8		100
96	X4	3,8	28,8	3,8	3,8		100	
97-100k	(X7)4-15	15,6	15,6	15,6	3,1		>98	
100l	X7	15,6	15,6	15,6	3,1		100	
CDR-H3	100m	GBT	-	33,3	-	-	A/V(33,3)	
		TTC	-	-	-	-	F(100)	89
		ATG	-	-	-	-	M(100)	
	101	GAT	-	-	-	-	D(100)	92
	102	TAC	100	-	-	-		67
		GTC	-	-	-	-	V(100)	

FIG. 5A

A	QVQLVQSGAEVKKPKASVKVSKASGYTFT	-HI-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-
B	QVQLVQSGAEVKKPKASVKVSKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
C	QVQLVQSGAEVKKPKASVKVSKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
D	QVQLVQSGAEVKKPKASVKVSKAS	-HI-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-
II				
A	QVQLQESGPGLVKPSTLSLTCTVSGGSVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-
B	QVQLQESGPGLVKPSTLSLTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
C	QVQLQESGPGLVKPSTLSLTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
D	QVQLQESGPGLVKPSTLSLTCTVS	-HI-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-
III				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Acceptor				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
Segundo receptor				
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-HI-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-HI-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-

FIG. 5B

RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 19; 122; 123; 124
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 20; 125; 126; 127
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 21; 128; 129; 130
RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 22; 131; 132; 133
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 23; 134; 135; 136
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 24; 137; 138; 139
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 25; 140; 141; 142
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 26; 143; 144; 145
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 27; 146; 147; 148
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 28; 149; 150; 151
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 29; 152; 153; 154
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 30; 155; 156; 157
RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 31; 158; 159; 160
RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 32; 161; 162; 163
RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 33; 164; 165; 166
RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 34; 167; 168; 169
RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 35; 170; 171; 172
RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 36; 173; 174; 175
RFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT LVT VSS	SEQ ID NOs.: 37; 176; 177; 178

FIG. 6A

W1 DIQMTQSPSSLASVGDRTITC-L1-WYQQKPGKAPKLLIY-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
W2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCL-L1-WYLQKPGQSPQLLIY-L2-GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
W3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC-L1-WYQQKPGQAPRLLIY-L2-GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
W4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC-L1-WYQQKPGQPPLLIY-L2-GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

FIG._6B

EDFA TYYC-**L3**-FGG TKVEIK SEQ ID NOs.: 38; 179; 180; 181
EDVGVYYC-**L3**-FGG TKVEIK SEQ ID NOs.: 39; 182; 183; 184
EDFA VYYC-**L3**-FGG TKVEIK SEQ ID NOs.: 40; 185; 186; 187
EDVA VYYC-**L3**-FGG TKVEIK SEQ ID NOs.: 41; 188; 189; 190

FIG. 7

Secuencias de marco conservado de cadena ligera de huMAb4D5-8

LC-FR1	¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys ²³ (SEQ ID NO: 42)
LC-FR2	³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr ⁴⁹ (SEQ ID NO: 43)
LC-FR3	⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys ⁸⁸ (SEQ ID NO: 44)
LC-FR4	⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr ¹⁰⁹ (SEQ ID NO: 45)

Secuencias de marco conservado de cadena pesada de huMAb4D5-8

HC-FR1	¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser ²⁵ (SEQ ID NO: 46)
HC-FR2	³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val ⁴⁸ (SEQ ID NO: 47)
HC-FR3	⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn ⁸³ Ser ^{83a} Leu ^{83b} Arg ^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys ⁹² (SEQ ID NO: 48)
HC-FR4	¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ¹¹³ (SEQ ID NO: 49)

FIG._8

Secuencias de marco conservado de cadena ligera de huMAb4D5-8 modificada en la posición 66 (subrayado)

LC-FR1	¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys ²³ (SEQ ID NO: 50)
LC-FR2	³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Tyr ⁴⁹ (SEQ ID NO: 51)
LC-FR3	⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys ⁸⁸ (SEQ ID NO: 52)
LC-FR4	⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr ¹⁰⁹ (SEQ ID NO: 53)

Secuencias de marco conservado de cadena pesada de huMAb4D5-8 modificada en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayado)

HC-FR1	¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser ²⁵ (SEQ ID NO: 54)
HC-FR2	³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val ⁴⁸ (SEQ ID NO: 55)
HC-FR3	⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp <u>Asn</u> Ser Lys Asn Thr <u>Leu</u> Tyr Leu Gln Met Asn ⁸³ Ser ^{83a} Leu ^{83b} Arg ^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys ⁹² (SEQ ID NO: 56)
HC-FR4	¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ¹¹³ (SEQ ID NO: 57)