

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 439**

51 Int. Cl.:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>C12N 15/09</b> | (2006.01) |
| <b>C12N 15/10</b> | (2006.01) |
| <b>C12N 15/63</b> | (2006.01) |
| <b>C12P 21/08</b> | (2006.01) |
| <b>C12N 15/12</b> | (2006.01) |
| <b>C07K 16/18</b> | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2011 PCT/US2011/067589**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12092374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2011 E 11852441 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2658970**

54 Título: **Humanización rápida de anticuerpos**

30 Prioridad:

**31.12.2010 US 201061428917 P**

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

**20.04.2017**

73 Titular/es:

**BIOATLA LLC (100.0%)  
11011 Torreyana Road  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SHORT, JAY, M.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 609 439 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

Humanización rápida de anticuerpos

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La divulgación proporciona un método para la generación de anticuerpos humanizados en células de mamífero. Se proporciona una biblioteca de variantes humanizadas con alta diversidad de marco validada sin necesidad de retromutaciones para retener afinidad original. Las bibliotecas de fragmentos de codificación de CDR sintéticos derivadas de un anticuerpo molde se ligan a fragmentos de codificación de región de armazón humana de un conjunto de marco humano limitado solamente a secuencias de líneas germinales a partir de anticuerpos expresados funcionalmente. El vector comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región 4 de armazón de HC. No se requiere injerto de CDR o presentación de fagos.

Descripción de la técnica relacionada

- 15 Los anticuerpos monoclonales (MAb) son monoespecíficos para un antígeno particular y se fabrican mediante células inmunitarias idénticas que son clones de una célula madre única. Los anticuerpos monoclonales se fabrican tradicionalmente mediante la fusión de células de mieloma con células de bazo de un ratón que ha sido inmunizado con el antígeno deseado. Las células híbridas fusionadas, o hibridomas, pueden crecer indefinidamente en medio de cultivo celular, o pueden inyectarse en ratones donde producen tumores que contienen un fluido rico en anticuerpos llamado líquido ascítico. Los anticuerpos pueden entonces purificarse a partir del medio de cultivo celular o ascitis.

- 20 La terapia con anticuerpos monoclonales es el uso de MAbs para unirse específicamente a un antígeno, por ejemplo, un antígeno de superficie celular en una célula diana. Esto puede estimular el sistema inmunológico del paciente para atacar esas células. MAbs han sido desarrollados para tratar varias enfermedades como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple y diferentes tipos de cánceres. Inicialmente, se obtuvieron anticuerpos murinos con tecnología de hibridoma; sin embargo, la disimilitud entre los sistemas inmunes murinos y humanos dio lugar a varios fracasos clínicos de estos anticuerpos. Sin embargo, un pequeño número de MAbs murinos están aprobados por la FDA para tratar diversas condiciones. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3) es un MAb murino que se dirige al receptor CD3 de células T y fue aprobado en 1986 para el rechazo de trasplante. Tositumoman (Bexxar) es un MAb murino que se dirige al CD20 y fue aprobado en 2003 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin.

- 30 Las deficiencias terapéuticas de anticuerpos monoclonales de ratón como agentes terapéuticos humanos son bien conocidas e incluyen una vida media corta in vivo, funciones efectoras débiles mediadas por la región constante de cadena pesada de ratón; sensibilización del paciente al anticuerpo y generación de una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA); y la neutralización del anticuerpo de ratón por HAMA conduce a una pérdida de eficacia terapéutica. Véase, por ejemplo, Williams et al. 2010, Humanising anti-bodies by CDR graft. Antibody Engineering, Edit de R. Kontermann y S. Dubel, Springer Lab Manual, 319-339. Un obstáculo importante en el desarrollo temprano de anticuerpos terapéuticos fue la respuesta del anticuerpo anti-murino humano (HAMA) que se produjo en hasta aproximadamente el 50% de los pacientes tras la administración de anticuerpos derivados de hibridomas murinos y comprometió la seguridad, la eficacia y la vida media del anticuerpo terapéutico.

- 40 Una forma de aliviar ciertas deficiencias de anticuerpos monoclonales de ratón es la humanización de anticuerpos. Se conocen diversas técnicas de humanización de anticuerpos. Un método de humanización de anticuerpos es la quimerización. En anticuerpos quiméricos de ratón/humano, los dominios inmunogénicos constantes murinos son reemplazados por los homólogos humanos. Los dominios variables murinos intactos se conservan para mantener la afinidad intrínseca de unión al antígeno; es decir, todas las regiones Fv se retenían del anticuerpo murino (aproximadamente 66% de humano). Se encontró que la quimerización del anticuerpo aliviaba la vida media in vivo corta en comparación con el MAb murino, e impartió la función efectora Fc humana en el anticuerpo. Aunque la quimerización de algunos anticuerpos murinos resultó en una respuesta reducida de HAMA, otros permanecieron inmunogénicos. Algunos anticuerpos quiméricos están aprobados por la FDA para tratar varias enfermedades. Abciximab (ReoPro), es un anticuerpo quimérico que tiene como objetivo la inhibición de la glicoproteína IIb/IIIa y fue aprobado por la FDA en 1994 para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Infliximab (Remicade) es un anticuerpo quimérico que resulta en la inhibición de la señalización de TNF-alfa; fue aprobado por primera vez en 1998 y ahora se utiliza para el tratamiento de diversos trastornos autoinmunes.

- 50 Una segunda técnica de humanización de anticuerpos denominada injerto de CDR implica el trasplante de todas las CDR murinas en una región de armazón humana en la que el anticuerpo humanizado remodelado sólo retiene elementos de unión esenciales del anticuerpo murino (5-10% de la secuencia total). Por ejemplo, véase Lo, Antibody humanization by CDR grafting. Antibody Engineering, Methods and protocols. Edit by Benny K. C. Lo, Methods in Molecular Biology, 2004, 248, 135-159. El injerto de CDR se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos.

5,225,539 y US 5,585,089 y EP0239400. Los anticuerpos humanizados procedentes del injerto de CDR dieron como resultado una mayor tolerancia y eficacia in vivo de los anticuerpos terapéuticos. Según Lo 2004, la clave para el injerto exitoso de CDR radica en la preservación de las conformaciones de CDR murina en el anticuerpo reformado para la unión al antígeno. La región Fv del anticuerpo comprende dominios variables de la cadena ligera ( $V_L$ ) y la cadena pesada ( $V_H$ ) y confiere anticuerpos con especificidad y afinidad de unión al antígeno. Los dominios variables adoptan el pliegue de inmunoglobulina en el que dos andamios de estructura beta antiparalela soportan tres CDRs hipervariables. Desafortunadamente, el injerto de CDR conduce a menudo a orientaciones subóptimas de los bucles de CDR murinas responsables de la unión del antígeno. Por lo tanto, los restos críticos del marco murino necesitaban ser reintroducidos como mutaciones secundarias para restaurar las conformaciones CDR óptimas para la unión del antígeno. De acuerdo con Williams et al. 2010, *ibid.*, al menos 118 anticuerpos han sido humanizados. De los 24 anticuerpos aprobados en el mercado, 13 son humanizados, cuatro son murinos, cinco son quiméricos y dos son humanos. Los anticuerpos humanizados comercializados fueron generados por injerto de CDR.

Otra técnica para desarrollar un anticuerpo humanizado mínimamente inmunogénico se conoce como injerto de SDR. Se encontró que algunos anticuerpos humanizados provocaban una respuesta anti-idiotipo (anti-Id) contra las CDR murinas potencialmente inmunogénicas. Además, se encontró que no todas las CDR son igualmente importantes, o incluso esenciales, para la unión al antígeno. También se encontró que sólo alrededor del 20-33% de los residuos de CDR están implicados en el contacto con el antígeno. Los residuos CDR que son más importantes en la interacción antígeno-anticuerpo se llaman residuos determinantes de la especificidad (DEG). Los SDR se encuentran en posiciones de alta variabilidad y pueden determinarse mediante la determinación de la estructura tridimensional del complejo de anticuerpos antígenicos o mediante manipulación genética del sitio de combinación de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2004, Developing a minimally immunogenic humanized antibody by SDR grafting. *Antibody Engineering, Methods and protocols*. Edit by Benny K. C. Lo, *Methods in Molecular Biology*, 248, 361-376. Por lo tanto, hay espacio para la evolución de proteínas dentro de las regiones CDR mientras se mantiene la afinidad para el antígeno diana.

Existen tecnologías competitivas para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos. Los ratones transgénicos (por ejemplo, Xenomouse y UltiMab-Mouse) que contienen grandes partes del locus de la inmunoglobulina humana, pueden ser una fuente de anticuerpos "totalmente humanos". Los anticuerpos humanos derivados de una biblioteca de bacteriófagos de regiones variables humanas tampoco necesitan humanización, pero frecuentemente necesitan mutación adicional para lograr una alta potencia de unión. Se ha obtenido un número relativamente pequeño de anticuerpos comercializados utilizando estas otras tecnologías de plataforma. Véase Williams et al. 2010, *ibid.*

Según Lo 2004, el objetivo de la humanización de anticuerpos es diseñar un anticuerpo monoclonal (MAb) elevado en una especie no humana en uno que es menos inmunogénico cuando se administra a seres humanos. Sin embargo, sería ventajoso desarrollar una técnica de humanización de anticuerpos que esté acompañada por diversas técnicas evolutivas de proteínas para producir un anticuerpo humanizado con otras características optimizadas tales como afinidad mejorada para el antígeno diana comparado con el ratón y/o expresión aumentada.

Sumario de la invención

La divulgación proporciona métodos de humanización rápida de anticuerpos. Se generan una o más bibliotecas de anticuerpos y se examinan simultáneamente con respecto a la optimización de la unión y de la expresión. Las bibliotecas de anticuerpos están específicamente diseñadas para ser pequeñas en número de miembros, pero muy diversas. Sólo se emplean marcos humanos validados en las bibliotecas de anticuerpos, que se han expresado funcionalmente a partir de secuencias de líneas germinales. Un subconjunto de secuencias de líneas germinales se selecciona específicamente para la máxima diversidad en la biblioteca final. En un aspecto, se emplea una única secuencia para el marco 4 de LC y HC para toda la biblioteca, y el ADN que codifica esta secuencia estructural está incorporado en el vector. Se utiliza ligación para recombinar marcos y CDRs, evitando así la PCR de superposición que requiere múltiples conjuntos de cebadores. En un aspecto, la biblioteca se expresa y se selecciona en el huésped de fabricación. En otro aspecto, un anticuerpo igual o superior al anticuerpo donante, por ejemplo un MAb de ratón, en términos de afinidad antigénica se identifica en tres a cuatro meses.

La presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo humanizado, comprendiendo el método: (a) sintetizar bibliotecas de fragmentos de ADN de doble hebra de cadena pesada de inmunoglobulina (HC) que comprenden fragmento de fragmentos de ADN de fragmento de región determinante de complementariedad (CDR) y fragmento de marco (FW) En el que al menos una biblioteca de fragmentos de CDR se deriva de un anticuerpo molde y cada biblioteca de fragmentos FW se deriva de un conjunto de marco humano obtenido a partir de anticuerpos humanos expresados funcionalmente, (b) sintetizando bibliotecas de fragmentos de ADN de doble hebra de inmunoglobulina que comprende bibliotecas de codificación de fragmentos CDR y bibliotecas de codificación de fragmentos FW, en donde al menos una biblioteca de fragmentos CDR se deriva del anticuerpo molde y cada biblioteca de fragmentos FW se deriva de un conjunto de estructuras humanas obtenido a partir de anticuerpos humanos expresados funcionalmente, (c) fragmentación por ligación en fase líquida escalonada de fragmentos de codificación FW de cadena pesada y fragmentos codificantes de CDR en el orden de: FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3 para producir una biblioteca codificante de dominio variable HC humanizado, (d) ensamblaje a partir las de bibliotecas

de fragmentos LC por ligación en fase líquida por etapas de fragmentos de codificación FW de cadenas ligeras y fragmentos codificantes de CDR en el orden de: FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3 para producir una biblioteca que codifica el dominio variable LC humanizado, (e) clonar la biblioteca humanizada ensamblada dominio variable de cadena pesada y la biblioteca ensamblada de dominio variable de cadena ligera en un vector de expresión para crear una biblioteca de humanización, (f) transfectar la biblioteca de humanización en células, (g) expresar anticuerpos humanizados en las células para crear una biblioteca de anticuerpos humanizados, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo de longitud completa, el vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región de armazón de cadena pesada 4 derivada de un dominio variable de cadena pesada humana de un anticuerpo humano expresado funcionalmente y una secuencia de nucleótidos que codifica el marco 4 derivado de un dominio variable de cadena ligera humana de un anticuerpo humano expresado funcionalmente, (h) cribado de la biblioteca de anticuerpos humanizados para determinar el nivel de expresión de los anticuerpos humanizados, e (i) cribado de la biblioteca de anticuerpos humanizados para determinar la afinidad de los anticuerpos humanizados por un antígeno en comparación con la afinidad del anticuerpo molde por el antígeno.

En un aspecto, el anticuerpo humanizado exhibe una afinidad igual o mayor para un antígeno en comparación con un anticuerpo molde.

En diversos aspectos, la descripción proporciona un método para producir una biblioteca de anticuerpos humanizada en la que el número de miembros de la biblioteca de anticuerpos humanizados es de 10.000.000 miembros o menos; 1.000.000 de miembros o menos; o 100.000 miembros o menos.

En un aspecto, la descripción proporciona un método para producir un anticuerpo humanizado que comprende la etapa de clonar la biblioteca de dominio variable de HC humanizada ensamblada en un vector de expresión para crear una biblioteca de ADN de dominio variable de HC vector y ligar la cadena ligera ensamblada variable en la biblioteca vector-HC para crear la biblioteca de humanización. En otro aspecto, la etapa de expresión comprende expresar tanto el dominio variable de la cadena pesada humanizada como el dominio variable de la cadena ligera humanizada a partir de un único promotor.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para producir un anticuerpo humanizado que comprende una etapa de cribado de la biblioteca de anticuerpos humanizada para un anticuerpo humanizado que tiene una o más características mejoradas adicionales cuando se compara con el anticuerpo molde; consistiendo la una o más características seleccionadas del grupo en: constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ); estabilidad; temperatura de fusión ( $T_m$ ); pI; solubilidad; nivel de expresión; inmunogenicidad reducida y función efectora mejorada. En ciertos aspectos, la mejora está entre aproximadamente 1% y 500%, con respecto al anticuerpo molde o está entre aproximadamente 2 veces y 1000 veces con respecto al anticuerpo molde.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para producir un anticuerpo humanizado que comprende además la etapa de clonar la biblioteca de dominio variable de cadena pesada humanizada ensamblada y la biblioteca de dominio variable de cadena ligera ensamblada en un vector de expresión para crear una biblioteca de humanización; y transfectar la biblioteca de humanización en células; en el que las células se seleccionan de una línea de células huésped de producción de células eucarióticas seleccionada de un miembro del grupo que consiste en células de fibroblastos de ratón 3T3; BHK21 células de fibroblastos de hámster sirio; células epiteliales de perro MDCK; Hela células epiteliales humanas; células epiteliales de rata canguro PtK1; células plasmáticas de ratón SP2/0; y células de plasma de ratón NS0; HEK 293 células de riñón embrionario humano; células de riñón de mono COS; células de ovario de hámster chino CHO, CHO-S; células R1 embrionarias de ratón; células embrionarias de ratón E14.1; células embrionarias humanas H1; células embrionarias humanas H9; células embrionarias humanas PER C.6; células de levadura de *S. cerevisiae*; y células de levadura *picchia*. En aspectos específicos, la línea celular huésped de producción de células eucarióticas se selecciona entre CHO-S; HEK293; CHOK1SV o NS0. En otro aspecto, la célula es un huésped de producción de células eucariotas con visualización de la superficie de las células del anticuerpo y, opcionalmente, se realizan una o más de las etapas de selección en el huésped de producción de células eucariotas.

En una realización, la descripción proporciona un método para producir un anticuerpo humanizado que comprende el cribado de una biblioteca humanizada que utiliza un ensayo seleccionado de ELISA cuantitativo; ELISA de afinidad; ELISPOT; citometría de flujo, inmunocitología, análisis de resonancia de plasmón de superficie Biacore®, ensayo de exclusión cinética Sapidyne KinExA™; SDS-PAGE; Transferencia Western o HPLC.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un esquema del método de humanización rápida de anticuerpos de un anticuerpo molde.

La Figura 2 muestra datos de la criba primaria de variantes humanizadas del anticuerpo molde BA001. La criba primaria comprendía ELISA de alto rendimiento de variantes en comparación con el anticuerpo donante, mostrado con un asterisco. Los ELISA se usaron para determinar la unión y cuantificación del antígeno.

La Figura 3 muestra los 8 aciertos de variantes de anticuerpos humanizados confirmados en términos de expresión y función en comparación con el anticuerpo molde BA001. Las secuencias de ADN y proteína para BA001 y las variantes humanizadas mostradas se describen en la Publicación de Estados Unidos No. US 2010/0138945, que se incorpora aquí como referencia.

5 La Figura 4 muestra datos de resonancia de plasmón de superficie BiaCore de afinidad de unión para anticuerpos anti-IL6 humanizados en comparación con un anticuerpo molde. Los datos para el molde, CNTO328, un anticuerpo quimérico, murino-humano, es del documento US 2006/0257407, que se incorpora aquí como referencia. BA001 es también un anticuerpo molde que tiene la misma secuencia que el molde CNTO328, pero que se fabricó en un sistema de expresión diferente. Se obtuvieron los anticuerpos variantes humanizados h1-h8 sin maduración de afinidad adicional.

La Figura 5 muestra los resultados de un ELISA en el que las variantes de anticuerpo humanizadas bloquean la unión al antígeno del anticuerpo molde BA001.

#### Definición de términos

15 Con el fin de facilitar la comprensión de los ejemplos proporcionados aquí, se describirán algunos métodos y/o términos que se presentan frecuentemente.

El término "maduración por afinidad" se refiere al aumento en la afinidad media de una respuesta inmune para un antígeno. En la naturaleza, puede ocurrir después de exposición repetida a un antígeno. Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (por ejemplo, anticuerpo humano). Generalmente, la variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo posterior tendrá propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente para generar tales variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando técnicas descritas en el presente documento o por otras técnicas conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, presentación de fagos (Schier R., J. Mol. Biol., 263: 551-67, 1996). Las variantes se examinan a continuación para determinar su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, análisis Biacore. Con el fin de identificar los residuos de la región hipervariable que serían buenos candidatos para la modificación, la mutagénesis de exploración con alanina puede realizarse para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden experimentar un desarrollo adicional.

30 El término "agente" se utiliza aquí para designar un anticuerpo o una biblioteca de anticuerpos. Los agentes se evalúan en cuanto a actividad potencial como, por ejemplo, antineoplásicos, antiinflamatorios o moduladores de apoptosis mediante inclusión en ensayos de selección descritos a continuación. Los agentes se evalúan en cuanto a la actividad potencial como inhibidores específicos de la interacción proteica (es decir, un agente que inhibe selectivamente una interacción de unión entre dos polipéptidos predeterminados pero que no interfiera sustancialmente con la viabilidad celular) por inclusión en ensayos de cribado descritos a continuación.

35 El término "aminoácido" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier compuesto orgánico que contiene un grupo amino ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-COOH$ ); preferiblemente como grupos libres o, alternativamente, después de la condensación como parte de los enlaces peptídicos. Los "veinte aminoácidos que forman polipéptidos naturalmente codificados" se entienden en la técnica como y se refieren a: alanina (ala o A), arginina (arg o R), asparagina (asn o N), ácido aspártico (asp o D), cisteína (cys o C), ácido glutámico (glu o E), glutamina (gln o Q), glicina (gly o G), histidina (his o H), isoleucina (ile o I), leucina (leu o L), lisina (lys o K), metionina (met o M), fenilalanina (phe o F), prolina (pro o P), serina (ser o S), treonina (thr o T), triptófano (trp o W) tirosina (tyr o Y) y valina (val o V).

El término "amplificación" significa que se aumenta el número de copias de un polinucleótido.

45 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de moléculas de inmunoglobulina, tales como fragmentos Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv y SCA, que son capaces de unirse a un epítipo de un antígeno.

Un fragmento Fab consiste en un fragmento monovalente de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, y puede producirse por digestión de una molécula completa de anticuerpo con la enzima papaína, para producir un fragmento que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de un fragmento cadena pesada.

50 Se puede obtener un fragmento Fab' de una molécula de anticuerpo tratando una molécula de anticuerpo entera con pepsina, seguido de reducción, para producir una molécula que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo tratada de esta manera.

Se puede obtener un fragmento (Fab')<sub>2</sub> de un anticuerpo tratando una molécula de anticuerpo entera con la enzima pepsina, sin reducción subsiguiente. Un fragmento A (Fab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab', mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro.

5 Un fragmento Fv se define como un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada expresada como dos cadenas.

Un anticuerpo de cadena única ("SCA") es una molécula de cadena sencilla modificada genéticamente que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada, unida por un revestimiento polipeptídico flexible y adecuado.

10 El término "biosimilar", también denominado "biológico de seguimiento", se refiere a las nuevas versiones oficialmente aprobadas de productos biofarmacéuticos innovadores, después de la expiración de la patente o de la exclusividad.

15 El término "huésped de producción celular", u "hospedador de fabricación", se refiere a una línea celular usada para la producción o fabricación de proteínas. Células eucariotas tales como células de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, líneas celulares humanas, de ratón, hámster, rata, mono, así como líneas celulares de levaduras, insectos y plantas. Alternativamente se pueden utilizar células procariotas. En un aspecto, un huésped de producción de células de mamífero se selecciona de un miembro del grupo que consiste en células de fibroblastos de ratón 3T3; BHK21 células de fibroblastos de hámster sirio; MDCK, células epiteliales de perro; Hela células epiteliales humanas; células epiteliales de rata canguro PtK1; células plasmáticas de ratón SP2/0; y células de plasma de ratón NS0; HEK 293 células de riñón embrionario humano; células de riñón de mono COS; CHO, CHO-S células de ovario de hámster chino; R1 células embrionarias de ratón; E14.1 células embrionarias de ratón; células embrionarias humanas H1; H9 células embrionarias humanas; PER C.6, células embrionarias humanas. En otro aspecto, el huésped de producción celular es una línea celular GS-NSO o GS-CHOK1. En otro aspecto, el huésped de producción celular se selecciona de células de levadura de *S. cerevisiae*; y células de levadura *picchia*. En otro aspecto, el huésped de producción celular es una línea celular bacteriana.

25 Una molécula que tiene una "propiedad quimérica" es una molécula que es: 1) en parte homóloga y en parte heteróloga a una primera molécula de referencia; mientras que 2) al mismo tiempo es en parte homóloga y en parte heteróloga a una segunda molécula de referencia; sin 3) excluir la posibilidad de ser al mismo tiempo en parte homóloga y en parte heteróloga a todavía una o más moléculas de referencia adicionales. En una realización no limitante, una molécula quimérica puede prepararse ensamblando un reordenamiento de secuencias moleculares parciales. En un aspecto no limitativo, se puede preparar una molécula polinucleotídica quimérica sintetizando el polinucleótido quimérico usando una pluralidad de moldes moleculares, de manera que el polinucleótido quimérico resultante tenga propiedades de una pluralidad de moldes.

35 El término "cognado" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia génica que está evolutiva y funcionalmente relacionada entre especies. Por ejemplo, pero sin limitación, en el genoma humano, el gen CD4 humano es el gen cognado para el gen 3d4 de ratón, ya que las secuencias y estructuras de estos dos genes indican que son altamente homólogas y ambos genes codifican una proteína que funciona en señalización Activación de linfocitos T a través del reconocimiento del antígeno restringido del MHC de clase II.

El término "escala comercial" significa la producción de una proteína o anticuerpo a una escala apropiada para la venta.

40 Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en las que una secuencia polinucleotídica puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos y en la que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Mates. 2: 482 por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wuncsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis), o por inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

55 Como se usa en el presente documento, el término "región determinante de complementariedad" y "CDR" se refiere al término reconocido en la técnica como se ejemplifica por Kabat y Chothia. Las definiciones de CDR también se conocen generalmente como regiones supervariables o bucles hipervariables (Chothia y Leks, 1987, Chothia et al., 1989, Kabat et al., 1987, y Tramontano et al., 1990). Los dominios de región variable comprenden típicamente los

amino-terminales aproximadamente 105-115 aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina natural (por ejemplo, aminoácidos 1-110), aunque dominios variables algo más cortos o más largos son también adecuados para formar anticuerpos de cadena única. Las CDR son partes de inmunoglobulinas que determinan la especificidad de dichas moléculas y hacen contacto con un ligando específico. Las CDR son la parte más variable de la molécula y contribuyen a la diversidad de estas moléculas. Existen tres regiones CDR CDR1, CDR2 y CDR3 en cada dominio V. CDR-H representa una región CDR de una cadena pesada variable y CDR-L se refiere a una región CDR de una cadena ligera variable. H significa la cadena pesada variable y L significa la cadena ligera variable. Las regiones CDR de una región derivada de Ig pueden determinarse como se describe en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services, Chothia (1987) J. Mol. Biol. 196, 901-917 y Chothia (1989) Nature, 342, 877-883.

El término "completo" se utiliza en el presente documento para referirse a una técnica de evolución en la que se realiza cada cambio posible en cada posición de un polinucleótido molde o polipéptido molde y el polinucleótido o polipéptido se prueba para confirmar que el cambio deseado se ha hecho secuenciando o con otra técnica. La mutagénesis comprensiva se refiere a la mutación del ADN de una región de un gen que codifica una proteína que cambia la secuencia de aminoácidos del codón de la proteína y luego determina a través de la secuenciación u otras tecnologías que se han hecho todas las mutaciones y en el caso óptimo donde cada clon está en una posición identificable y/o únicamente etiquetado. A continuación, se realiza el cribado de todos los mutantes expresados para asegurar que todos se expresan de forma comprensiva para un fenotipo mejorado con el fin de proporcionar una cobertura completa garantizada, es decir, una biblioteca CPE con un cribado comprensivo que comprende el proceso BioAtla CPE. Los clones que no expresan en el sistema de cribado también se medirán simultáneamente para la expresión para asegurar que no se marquen incorrectamente como mutaciones negativas o neutrales una vez habilitadas para la expresión de un sistema alternativo tal como transcripción y traducción in vitro. Alternativamente, la secuenciación podría realizarse en todos los clones después del cribado, pero debe incluir todos los clones negativos, neutros y mutantes ascendentes. Cualquier mutante no identificado se añade a continuación en una segunda ronda de cribado para producir un sistema de expresión/actividad de mutagénesis completo y de cribado completo tal como CPE. Esto es posible en parte por los éxitos recientes en la secuenciación de alto rendimiento que no existía anteriormente.

El término "Evolución Posicional Completa" (CPE™) se utiliza para describir una plataforma de tecnología de evolución de anticuerpos que puede usarse para combinar tecnologías completas de mutagénesis, barajadura y síntesis para mejorar propiedades de anticuerpo únicas o múltiples y características de unión. La plataforma CPE permite el mapeo integral de los efectos in vivo de cada cambio de codón individual dentro de la proteína para los 63 cambios de codón potencial en cada posición dentro de la proteína. Esta amplia tecnología de mutagénesis genera rápidamente variantes de anticuerpos mediante la prueba de los cambios de aminoácidos en cada posición a lo largo de la secuencia de un dominio variable de anticuerpo.

El término "Síntesis Combinatoria de Proteínas" (CPS™) se usa para describir tecnologías combinatorias de síntesis de proteínas que pueden usarse para optimizar las características deseadas de anticuerpos combinando sus mejores propiedades en un nuevo anticuerpo de alto rendimiento. LA CPS™ puede usarse después de CPE™ y puede permitir la generación subsiguiente y selección in vivo de todas las permutaciones de codones individuales mejorados para la identificación de la combinación óptima o conjunto de cambios de codones dentro de una proteína o anticuerpo. La combinación de estas tecnologías puede ampliar significativamente el grupo de variantes de anticuerpos disponibles para ser escrutadas y aumenta significativamente la probabilidad de encontrar anticuerpos con características únicas o múltiples mejoradas tales como afinidad de unión, especificidad, termoestabilidad, nivel de expresión, función efectora, glicosilación y solubilidad.

Para moléculas de anticuerpo de longitud completa, los genes de inmunoglobulina pueden obtenerse a partir de ADN genómico o ARNm de líneas celulares de hibridoma. Las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo se clonan en un sistema vectorial de mamífero. El montaje se documenta con análisis de secuencia de doble hebra. La construcción del anticuerpo puede expresarse en otras líneas de células huésped humanas o de mamífero. El constructo puede entonces validarse mediante ensayos de transfección transitoria y análisis de transferencia Western del anticuerpo expresado de interés. Las líneas celulares estables con la mayor productividad pueden aislarse y examinarse usando métodos de ensayo rápidos.

"Sustituciones conservadoras de aminoácidos" se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifático-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

El término "corresponde a" se usa aquí para indicar que una secuencia polinucleotídica es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) a toda o una porción de una secuencia polinucleotídica de

referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia. En contraposición, el término "complementario a" se utiliza aquí para indicar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una porción de una secuencia polinucleotídica de referencia. A título ilustrativo, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

El término cantidad "efectiva de degradación" se refiere a la cantidad de la cual se requiere para procesar al menos el 50% del sustrato, en comparación con el sustrato no puesto en contacto con la enzima. Preferiblemente, al menos el 80% del sustrato se degrada.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "estructura de secuencia definida" se refiere a un conjunto de secuencias definidas que se seleccionan sobre una base no aleatoria, generalmente sobre la base de datos experimentales o datos estructurales; por ejemplo, una estructura de secuencia definida puede comprender un conjunto de secuencias de aminoácidos que se predice que forman una estructura de hoja  $\beta$  o puede comprender un motivo de repetición heptad de cremallera de leucina, un dominio de dedo de zinc, entre otras variaciones. Un "kernal de secuencia definido" es un conjunto de secuencias que abarcan un alcance limitado de variabilidad. Considerando que (1) una secuencia 10-mérica completamente aleatoria de los 20 aminoácidos convencionales puede ser cualquiera de (20) 10 secuencias, y (2) una secuencia 10-mérica pseudoaleatoria de los 20 aminoácidos convencionales puede ser cualquiera de (20) 10 secuencias pero mostrará un sesgo para ciertos residuos en ciertas posiciones y/o en general, (3) un kernal de secuencia definido es un subconjunto de secuencias si se permitiera que cada posición de residuo fuera cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales admisibles (y/o amino/imino ácidos no convencionales permisibles). Un kernal de secuencia definido comprende generalmente posiciones de residuo variante e invariable y/o comprende posiciones de residuo variante que pueden comprender un residuo seleccionado de un subconjunto definido de residuos de aminoácidos, y similares, ya sea segmentadamente o sobre toda la longitud de la secuencia miembro individual seleccionada de la biblioteca. Los núcleos de secuencia definidos pueden referirse a secuencias de aminoácidos o secuencias de polinucleótidos. De ilustración y no limitación, las secuencias (NNK) 10 y (NNM) 10, en las que N representa A, T, G o C; K representa G o T; Y M representa A o C, son núcleos de secuencia definidos.

El término "desinmunización" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la producción de una variante de la molécula de unión a molde, que se modifica en comparación con una molécula de tipo salvaje original haciendo que dicha variante no sea inmunogénica o menos inmunogénica en seres humanos. Las moléculas desinmunizadas de acuerdo con la invención se refieren a anticuerpos o partes de los mismos (como armazones y/o CDR) de origen no humano. Los ejemplos correspondientes son anticuerpos o fragmentos de los mismos como se describe en el documento US 4,361,549. El término "desinmunizado" también se refiere a moléculas, que muestran propensión reducida a generar epítomos de células T. De acuerdo con esta invención, el término "propensión reducida para generar epítomos de células T" se refiere a la eliminación de epítomos de células T que conducen a la activación de células T específicas.

Además, la propensión reducida a generar epítomos de células T significa la sustitución de aminoácidos que contribuyen a la formación de epítomos de células T, es decir, la sustitución de aminoácidos, que son esenciales para la formación de un epítomo de células T. En otras palabras, la propensión reducida a generar epítomos de células T se refiere a una inmunogenicidad reducida o a una capacidad reducida para inducir la proliferación de células T independientes de antígenos. Además, la propensión reducida a generar epítomos de células T se refiere a la desinmunización, lo que significa pérdida o reducción de epítomos potenciales de células T de secuencias de aminoácidos que inducen la proliferación de células T independientes de antígenos.

El término "epítomo de células T" tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias peptídicas cortas que pueden ser liberadas durante la degradación de péptidos, polipéptidos o proteínas dentro de las células y posteriormente presentadas por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con el fin de activar la activación de las células T; véase, entre otros, WO 02/066514. Para los péptidos presentados por MHC de clase II, tal activación de células T puede inducir una respuesta de anticuerpo por estimulación directa de células B para producir dichos anticuerpos.

La "digestión" de ADN se refiere a la escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa sólo en ciertas secuencias en el ADN. Las diversas enzimas de restricción utilizadas en la presente invención están comercialmente disponibles y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requisitos se usaron como sería conocido por el experto en la técnica. Para propósitos analíticos, típicamente se usan 1  $\mu$ g de plásmido o fragmento de ADN con aproximadamente 2 unidades de enzima en aproximadamente 20  $\mu$ l de solución regulador. Con el fin de aislar fragmentos de ADN para la construcción de plásmidos, típicamente se digieren de 5 a 50  $\mu$ g de ADN con 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor. Los reguladores apropiados y las cantidades de sustrato para enzimas de restricción particulares se especifican por el fabricante. Los tiempos de incubación de aproximadamente 1 hora a 37°C se usan habitualmente, pero pueden variar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de la digestión, la reacción se somete a electroforesis directamente sobre un gel para aislar el fragmento deseado.

El término "mezclado de ADN" se usa en el presente documento para indicar recombinación entre secuencias



sustancialmente homólogas pero no idénticas, en algunas realizaciones el mezclado de ADN puede implicar cruce a través de recombinación no homóloga, tal como mediante sistemas cer/lox y / flp/frt y similares. La mezcla aleatoria puede ser aleatoria o no aleatoria.

5 Tal como se utiliza en esta invención, el término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico sobre un antígeno, tal como un polipéptido de fitasa, al que se une el parátipo de un anticuerpo, tal como un anticuerpo específico de fitasa. Los determinantes antigénicos generalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Como se usa en el presente documento, "epítipo" se refiere a la porción de un antígeno u otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión que interactúa con el cuerpo de unión de región variable de un anticuerpo. Típicamente, tal interacción de unión se manifiesta como un contacto intermolecular con uno o más residuos de aminoácidos de un CDR.

El término "evolución" se refiere a un cambio en al menos una propiedad, característica o actividad de un anticuerpo modificado genéticamente o sintéticamente cuando se compara con un anticuerpo molde.

15 Los términos "fragmento", "derivado" y "análogo" al referirse a un polipéptido de referencia comprenden un polipéptido que retiene al menos una función o actividad biológica que es al menos esencialmente la misma que la del polipéptido de referencia. Además, los términos "fragmento", "derivado" o "análogo" están ejemplificados por una molécula "proforma", tal como una proproteína de baja actividad que puede ser modificada por escisión para producir una enzima madura con actividad significativamente más alta.

20 El término "fragmento" cuando se aplica a una secuencia de ácidos nucleicos se refiere a una molécula que codifica para una porción, o una subporción, de una molécula de anticuerpo. Por ejemplo, un fragmento de ADN de CDR1 de HC, puede codificar toda la cadena pesada CDR1, o una parte truncada de la misma.

25 En un aspecto, ciertos métodos proporcionados aquí proporcionan la producción, a partir de un polipéptido molde, de un conjunto de polipéptidos de progenie en el que se representa un "intervalo completo de sustituciones de aminoácidos individuales" en cada posición de aminoácido. Como se usa en el presente documento, "gama completa de sustituciones de aminoácidos individuales" está en referencia a los 20 alfa-aminoácidos formadores de polipéptidos naturalmente codificados con codificación natural, como se describe en el presente documento.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región de codificación (líder y remolque), así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones).

30 La "inestabilidad genética", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la tendencia natural de que las secuencias altamente repetitivas se pierdan a través de un proceso de eventos reductivos que implican generalmente la simplificación de la secuencia a través de la pérdida de secuencias repetidas. Las supresiones tienden a implicar la pérdida de una copia de una repetición y todo entre las repeticiones.

35 El término "heterólogo" significa que una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla es incapaz de hibridarse con otra secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla o su complemento. Por lo tanto, las áreas de heterología significan que áreas de polinucleótidos o polinucleótidos tienen áreas o regiones dentro de su secuencia que son incapaces de hibridarse con otro ácido nucleico o polinucleótido. Tales regiones o áreas son, por ejemplo, áreas de mutaciones.

40 El término "homólogo" u "homeólogo" significa que una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla puede hibridar con una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla complementaria. El grado de hibridación puede depender de una serie de factores que incluyen la cantidad de identidad entre las secuencias y las condiciones de hibridación tales como la temperatura y las concentraciones de sal como se discute más adelante. Preferiblemente, la región de identidad es mayor que aproximadamente 5 bp, más preferiblemente la región de identidad es mayor que 10 bp.

45 El término "humanizado" se usa para describir anticuerpos en los que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un animal mamífero, por ejemplo, un ratón, se combinan con una región de armazón humana. A menudo, los polinucleótidos que codifican las CDR aisladas se injertarán en polinucleótidos que codifican una estructura de región variable adecuada (y opcionalmente regiones constantes) para formar polinucleótidos que codifican anticuerpos completos (por ejemplo, humanizados o completamente humanos), fragmentos de anticuerpos y similares. En otro aspecto, además de anticuerpos de ratón, se pueden humanizar otras especies, tales como, por ejemplo, otros roedores, camellos, conejos, gatos, perros, cerdos, caballos, vacas, peces, llamas y tiburones. En un aspecto amplio, cualquier especie que produce anticuerpos se puede utilizar en la producción de anticuerpos humanizados. Además, los anticuerpos de la invención pueden ser quiméricos, humanos, humanizados o totalmente humanos, con el fin de reducir su potencial antigenicidad, sin reducir su afinidad por su objetivo. Generalmente se han

descrito anticuerpos quiméricos, similares a humanos y humanizados en la técnica. Mediante la incorporación de la menor secuencia extranjera posible en el anticuerpo híbrido, se reduce la antigenicidad. La preparación de estos anticuerpos híbridos puede llevarse a cabo por métodos bien conocidos en la técnica.

5 Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en una región "de armazón" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas CDR. La extensión de la región del marco y las CDR se han definido con precisión (véase "Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico", Kabat et al., 1987). Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. Como se usa en el presente documento, una "región de armazón humana" es una región de armazón que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85 o más, usualmente 90-95 o más) a la región de armazón de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región de armazón de un anticuerpo, es decir, las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constitutivas, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. De acuerdo con esta invención, una región de armazón se refiere a una región en el dominio V (dominio VH o VL) de inmunoglobulinas que proporciona un armazón de proteínas para las regiones que determinan la complementariedad hipervariable (CDR) que hacen contacto con el antígeno. En cada dominio V, hay cuatro regiones estructurales designadas FR1, FR2, FR3 y FR4. El marco 1 abarca la región desde el extremo N del dominio V hasta el comienzo de CDR1, el marco 2 se refiere a la región entre CDR1 y CDR2, el marco 3 abarca la región entre CDR2 y CDR3 y el marco 4 significa la región desde el final de CDR3 hasta el extremo C del dominio V; véase, entre otras, Janeway, Immunobiology, Garland Publishing, 2001, 5ª ed. Por lo tanto, las regiones estructurales abarcan todas las regiones fuera de las regiones CDR en dominios VH o VL. En un aspecto de la descripción, se emplea una única secuencia para la estructura 4 que se mantiene constante a través de cada miembro de la biblioteca de anticuerpos. En un aspecto, la secuencia única que codifica la región de armazón 4 es la secuencia más común encontrada en un conjunto de marco humano limitado solamente a secuencias de líneas germinales a partir de anticuerpos expresados funcionalmente.

25 El experto en la técnica está fácilmente en una posición para deducir de una secuencia dada las regiones de armazón y las CDR; Véase Kabat (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services, Chothia (1987) J. Mol. Biol. 196, 901-917 y Chothia (1989) Nature, 342, 877 - 883.

30 Las ventajas de esta invención se extienden a "aplicaciones industriales" (o procesos industriales), término que se utiliza para incluir aplicaciones en la industria comercial apropiada (o simplemente industria) así como aplicaciones industriales no comerciales (por ejemplo, investigación biomédica en una Institución sin ánimo de lucro). Las aplicaciones relevantes incluyen las áreas de diagnóstico, medicina, agricultura, manufactura y academia.

El término "idéntico" o "identidad" significa que dos secuencias de ácido nucleico tienen la misma secuencia o una secuencia complementaria. Por lo tanto, "áreas de identidad" significa que regiones o áreas de un polinucleótido o el polinucleótido global son idénticas o complementarias a áreas de otro polinucleótido o polinucleótido.

35 El término "aislado" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es natural). Por ejemplo, no se aísla un polinucleótido o proteína natural presente en un animal vivo, pero se aísla el mismo polinucleótido o proteína, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o proteínas podrían formar parte de una composición, y todavía estar aislados porque dicho vector o composición no forma parte de su entorno natural.

40 Por "ácido nucleico aislado" se entiende un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN, que no es inmediatamente contiguo con las secuencias flanqueantes 5' y 3' con las que normalmente es contiguo inmediatamente cuando está presente en la secuencia natural genoma del organismo del que se deriva. El término describe así, por ejemplo, un ácido nucleico que se incorpora en un vector, tal como un vector plasmídico o viral; un ácido nucleico que se incorpora en el genoma de una célula heteróloga (o el genoma de una célula homóloga, pero en un sitio diferente de aquel en el que ocurre naturalmente); y un ácido nucleico que existe como una molécula separada, por ejemplo, un fragmento de ADN producido por amplificación por PCR o digestión con enzimas de restricción, o una molécula de ARN producida por transcripción in vitro. El término describe también un ácido nucleico recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales que pueden usarse, por ejemplo, en la producción de una proteína de fusión.

50 Tal como se usa en el presente documento, "ligando" se refiere a una molécula, tal como un péptido aleatorio o una secuencia de segmento variable, que es reconocida por un receptor particular. Como reconocerá un experto en la técnica, una molécula (o complejo macromolecular) puede ser tanto un receptor como un ligando. En general, la pareja de unión que tiene un peso molecular más pequeño se conoce como el ligando y la pareja de unión que tiene un mayor peso molecular se denomina un receptor.

55 "Ligación" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble hebras (Maniatis et al., 1982, página 146). A menos que se disponga lo contrario, la ligación puede llevarse a cabo usando reguladores y condiciones conocidos con 10 unidades de T4 ADN ligasa ("ligasa") por 0,5 µg de cantidades

aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a ligarse.

Como se usa en el presente documento, "enlazador" o "espaciador" se refiere a una molécula o grupo de moléculas que conecta dos moléculas, tal como una proteína de unión al ADN y un péptido aleatorio, y sirve para colocar las dos moléculas en una configuración preferida, Por ejemplo, de manera que el péptido aleatorio pueda unirse a un receptor con un impedimento estérico mínimo de la proteína de unión al ADN.

El término "visualización de la superficie celular de mamífero" se refiere a una técnica mediante la cual una proteína o anticuerpo, o una parte de un anticuerpo, se expresa y se muestra en una superficie de células huésped de mamífero con fines de cribado; por ejemplo, seleccionando la unión específica de antígeno mediante una combinación de perlas magnéticas y clasificación celular activada por fluorescencia. En un aspecto, los vectores de expresión de mamíferos se usan para la expresión simultánea de inmunoglobulinas como una forma unida tanto a la secreción como a la superficie celular como en DuBridg et al., US 2009/0136950, que se incorpora aquí como referencia. En otro aspecto, las técnicas de Gao et al. se emplean para un vector viral que codifica para una biblioteca de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se muestran en las membranas celulares cuando se expresan en una célula como en Gao et al., Documento US 2007/0111260, incorporado aquí como referencia. Se conoce la visualización de la superficie de IgG entera en células de mamífero. Por ejemplo, un Akamatsuu et al., desarrolló un vector de presentación de superficie celular de mamífero, adecuado para aislar directamente moléculas de IgG basándose en su afinidad de unión a antígeno y actividad biológica. Utilizando un vector episomal derivado del virus de Epstein-Barr, las bibliotecas de anticuerpos se mostraron como moléculas de IgG enteras en la superficie de la célula y se seleccionaron para la unión específica de antígeno mediante una combinación de perlas magnéticas y clasificación celular activada por fluorescencia. Los plásmidos que codifican anticuerpos con las características de unión deseadas se recuperaron de células clasificadas y se convirtieron a la forma para la producción de IgG soluble. Akamatsuu et al. J. Immunol. Métodos 2007 327 (1-2): 40-52; incorporado aquí como referencia. Ho et al., utilizó células 293T de riñón embrionario humano que se usan ampliamente para la expresión transitoria de proteínas para la visualización de la superficie celular de anticuerpos Fv de cadena única para maduración por afinidad. Las células que expresaban un anticuerpo mutante raro con mayor afinidad se enriquecieron 240 veces mediante una clasificación de células de paso único a partir de un gran exceso de células que expresaban el anticuerpo WT con una afinidad ligeramente inferior. Además, se obtuvo un mutante altamente enriquecido con una mayor afinidad de unión para CD22 después de una única selección de una biblioteca combinatoria que aleatorizó un punto vulnerable de anticuerpo intrínseco. Ho et al. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells, Proc Natl Acad Sci U S A 2006 June 20; 103(25): 9637-9642 incorporado aquí como referencia.

Beerli et al., utilizó células B específicas para un antígeno de interés que se aislaron directamente a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes humanos. Se generan librerías recombinantes Fv (scFv) de cadena única específicas de antígeno a partir de este grupo de células B y se seleccionan mediante visualización de la superficie de células de mamífero utilizando un sistema de expresión de virus Sindbis. Este método permite aislar anticuerpos específicos de antígeno mediante una sola ronda de FACS. Se aislaron las regiones variables (VR) de las cadenas pesadas (HC) y cadenas ligeras (CL) de los clones positivos y de los anticuerpos recombinantes totalmente humanos producidos como fragmentos IgG o Fab completos. De esta manera, se aislaron varios anticuerpos de alta afinidad hipermutados que se unen a la partícula similar al virus Q $\beta$  (VLP), un antígeno viral modelo, así como anticuerpos específicos para la nicotina. Todos los anticuerpos mostraron altos niveles de expresión en cultivo celular. Los mAbs específicos de nicotina humana se validaron preclínicamente en un modelo de ratón. Beerli et al., aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos por visualización de células de mamífero, Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Septiembre 23; 105 (38): 14336-14341; incorporado aquí como referencia.

La visualización de superficie de células de levadura es también conocida, por ejemplo, véase Kondo and Ueda 2004, Yeast cell-surface display applications of molecular display, Appl. Microbiol. Biotechnol., 64(1): 28-40, que describe, por ejemplo, un sistema de ingeniería de la superficie celular usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Varios sistemas de presentación representativos para la expresión en *S. cerevisiae* de levadura se describen en Lee et al, 2003, Microbial cell-surface display, TRENDS in Biotechnol. 21(1): 45-52. También Boder and Wittrup 1997, Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nature Biotechnol., 15(6): 553.

El término "fabricación" se refiere a la producción de una proteína en una cantidad suficiente para permitir al menos ensayos clínicos de fase I de una proteína terapéutica, o cantidad suficiente para la aprobación reguladora de una proteína de diagnóstico.

El término "mutación errónea" se refiere a una mutación puntual en la que se cambia un único nucleótido, dando como resultado un codón que codifica un aminoácido diferente. Mutaciones que cambian un aminoácido a un codón de parada se llaman mutaciones sin sentido.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "propiedad molecular por desarrollar" incluye referencia a moléculas comprendidas de una secuencia polinucleotídica, moléculas comprendidas de una secuencia polipeptídica, y moléculas comprendidas en parte de una secuencia polinucleotídica y en parte de una secuencia polipeptídica. Los ejemplos de propiedades moleculares que se han de desarrollar son particularmente importantes, pero no limitativos,

- 5 incluyen las actividades enzimáticas en condiciones especificadas, tales como las relacionadas con la temperatura; salinidad; presión; pH; y concentración de glicerol, DMSO, detergente, y/o cualquier otra especie molecular con la que se hace contacto en un ambiente de reacción. Otros ejemplos particularmente relevantes pero no limitativos de las propiedades moleculares a desarrollar incluyen estabilidades, por ejemplo, la cantidad de una propiedad molecular residual que está presente después de un tiempo de exposición especificado a un entorno especificado, tal como puede encontrarse durante el almacenamiento.
- 10 El término "Mapeo de Epítomos Multidimensionales" (MEM) se refiere a la identificación del epítopo y la resolución de los aminoácidos que son importantes para la unión del anticuerpo. La información sobre los sitios de unión (epítomos) de las proteínas reconocidas por los anticuerpos es importante para su uso como herramientas biológicas o diagnósticas, así como para la comprensión de sus mecanismos de acción. Sin embargo, los antígenos son muy diversos, tanto en su secuencia primaria como en estructuras tridimensionales. Los epítomos generalmente se dividen en 3 categorías: 1) epítomos lineales, es decir, el anticuerpo se une a los residuos en una parte lineal de la cadena polipeptídica, 2) epítomos conformacionales, donde el sitio de unión está formado por un elemento estructural (por ejemplo, hélice  $\alpha$ , bucle, 3) epítomos discontinuos en los que dos o más tramos separados de la cadena polipeptídica que se reúnen en la estructura tridimensional del antígeno forman la superficie de unión.
- 15 El término "mutación" se refiere a la creación de una mutación en una secuencia de ácidos nucleicos; en el caso de que la mutación se produzca dentro de la región codificadora de una proteína, dará lugar a un cambio de codón que puede o no conducir a un cambio de aminoácido.
- 20 El término "mutaciones" significa cambios en la secuencia de una secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje o cambios en la secuencia de un péptido o polipéptidos. Dichas mutaciones pueden ser mutaciones puntuales tales como transiciones o transversiones. Las mutaciones pueden ser eliminaciones, inserciones o duplicaciones.
- Tal como se usa en el presente documento, la secuencia de nucleótidos degenerada "N,N,G/T" representa 32 posibles tripletes, donde "N" puede ser A, C, G o T.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, la secuencia de nucleótidos degenerada "N,N,N" representa 64 posibles tripletes, donde "N" puede ser A, C, G o T.
- 30 El término "que ocurre naturalmente" tal como se utiliza en el presente documento descriptiva cuando se aplica al objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, se produce naturalmente un polipéptido o secuencia polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificado por el hombre en el laboratorio. Generalmente, el término que ocurre naturalmente se refiere a un objeto como presente en un individuo no patológico (no inducido), tal como sería típico para la especie.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, una "molécula de ácido nucleico" está compuesta de al menos una base o un par de bases, dependiendo de si es de cadena sencilla o de cadena doble, respectivamente. Además, una molécula de ácido nucleico puede pertenecer exclusiva o químicamente a cualquier grupo de moléculas que contienen nucleótidos, como se ejemplifica por, pero sin limitarse a, los siguientes grupos de moléculas de ácido nucleico: ARN, ADN, ácidos nucleicos genómicos, ácidos nucleicos no genómicos, ácidos nucleicos naturales y no naturales y ácidos nucleicos sintéticos. Esto incluye, a modo de ejemplo no limitativo, los ácidos nucleicos asociados con cualquier organelo, tales como las mitocondrias, el ARN ribosómico y las moléculas de ácido nucleico comprendidas químicamente de uno o más componentes que no ocurren naturalmente junto con componentes naturales.
- 40 Adicionalmente, una "molécula de ácido nucleico" puede contener en parte uno o más componentes no basados en nucleótidos como se ejemplifica por, pero sin limitarse a, aminoácidos y azúcares. Así, a modo de ejemplo, pero sin limitación, una ribozima que está en parte basada en nucleótidos y en parte basada en proteínas se considera una "molécula de ácido nucleico".
- 45 Además, a modo de ejemplo, pero sin limitación, una molécula de ácido nucleico que está marcada con una unidad estructural detectable, tal como un marcador radiactivo o alternativamente no radioactivo, se considera asimismo como una "molécula de ácido nucleico".
- 50 Los términos "secuencia de ácidos nucleicos que codifica para" o una "secuencia de ADN codificante de" o una "secuencia de nucleótidos que codifica" una proteína particular -así como otros términos sinónimos- se refieren a una secuencia de ADN que se transcribe y se traduce en una proteína cuando se colocan bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante corriente abajo (dirección 3'). El promotor es parte de la secuencia de ADN. Esta región de secuencia tiene un codón de inicio en su extremo 3'. La secuencia promotora incluye el número mínimo de bases en las que los elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Sin embargo, después de que la ARN polimerasa se une a

la secuencia y la transcripción se inicia en el codón de inicio (extremo 3' con un promotor), la transcripción continúa hacia abajo en la dirección 3'. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de transcripción (convenientemente definido por mapeo con nucleasa S1) así como dominios de unión a proteínas (secuencias de consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa.

- 5 Los términos "ácido nucleico que codifica una proteína" o "ADN que codifica una proteína" o "polinucleótido que codifica una proteína" y otros términos sinónimos abarcan un polinucleótido que incluye sólo una secuencia codificante para la proteína así como un polinucleótido que incluye codificación adicional y/o no codificante de Cq3.

10 En una realización preferida, una "especie de molécula de ácido nucleico específica" está definida por su estructura química, como se ejemplifica por, pero no se limita a, su secuencia primaria. En otra realización preferida, una especie específica de molécula de ácido nucleico se define por una función de la especie de ácido nucleico o por una función de un producto derivado de la especie de ácido nucleico. Por lo tanto, a modo de ejemplo no limitativo, una "especie de molécula de ácido nucleico específica" puede definirse por una o más actividades o propiedades atribuibles a ella, incluyendo actividades o propiedades atribuibles a su producto expresado.

15 La presente definición de "ensamblaje de una muestra de ácido nucleico de trabajo en una biblioteca de ácido nucleico" incluye el proceso de incorporación de una muestra de ácido nucleico en una colección basada en vectores, tal como mediante ligación en un vector y transformación de un huésped. A continuación se proporciona una descripción de los vectores, huéspedes y otros reactivos pertinentes, así como ejemplos específicos no limitativos de los mismos. La presente definición de "ensamblaje de una muestra de ácido nucleico que funciona en una biblioteca de ácido nucleico" incluye también el proceso de incorporar una muestra de ácido nucleico en una colección no basada en vectores, tal como por ligación a adaptadores. Preferiblemente, los adaptadores pueden hibridar a los cebadores de PCR para facilitar la amplificación por PCR.

25 Por consiguiente, en una realización no limitativa, una "biblioteca de ácido nucleico" está compuesta por una colección basada en vectores de una o más moléculas de ácido nucleico. En otra realización preferida, una "biblioteca de ácido nucleico" está compuesta por una colección no basada en un vector de moléculas de ácido nucleico. En aún otra realización preferida, una "biblioteca de ácido nucleico" está compuesta por una colección combinada de moléculas de ácido nucleico que está en parte basada en vectores y en parte no está basada en vectores. Preferiblemente, la recolección de moléculas que comprenden una biblioteca se puede buscar y separar de acuerdo con la molécula de ácido nucleico individual.

30 La presente invención proporciona un "constructo de ácido nucleico" o, alternativamente, un "constructo de nucleótidos" o, alternativamente, un "constructo de ADN". El término "constructo" se utiliza aquí para describir una molécula, tal como un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido de fitasa) opcionalmente puede unirse químicamente a una o más fracciones moleculares adicionales, tales como un vector o partes de un vector. En un aspecto específico, aunque no limitativo, un constructo de nucleótidos se ejemplifica mediante construcciones de expresión de ADN de expresión de ADN adecuadas para la transformación de una célula huésped.

35 Un "oligonucleótido" (o sinónimamente un "oligo") se refiere tanto a un polidesoxinucleótido de cadena sencilla como a dos hebras complementarias de polidesoxinucleótido que pueden sintetizarse químicamente. Tales oligonucleótidos sintéticos pueden tener o no un fosfato 5'. Los que no lo hacen no se ligarán a otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético se ligará a un fragmento que no ha sido desfosforilado. Para conseguir una amplificación basada en polimerasa (tal como con PCR), se menciona un  
40 "oligonucleótido degenerado de 32 veces que comprende, en serie, al menos una primera secuencia homóloga, una secuencia N,N,G/T degenerada y una segunda secuencia homóloga". Tal como se utiliza en este contexto, "homólogo" está en referencia a la homología entre el oligo y el polinucleótido parental que se somete a la amplificación basada en polimerasa.

45 Tal como se utiliza aquí, el término "unido operativamente" se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Unida operativamente significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son típicamente contiguas y, cuando es necesario unirse a dos regiones codificadoras de proteínas, contiguas y en el marco de lectura.

50 Una secuencia codificante está "unida operativamente a" otra secuencia codificante cuando la ARN polimerasa transcribirá las dos secuencias codificantes en un solo ARNm, que luego se traduce en un solo polipéptido que tiene aminoácidos derivados de ambas secuencias codificantes. Las secuencias de codificación no necesitan ser contiguas entre sí siempre que las secuencias expresadas se procesen en última instancia para producir la proteína deseada.

55 Como se usa aquí, el término "condiciones fisiológicas" se refiere a temperatura, pH, fuerza iónica, viscosidad y parámetros bioquímicos similares que son compatibles con un organismo viable y/o que típicamente existen

intracelularmente en una célula de levadura cultivada viable o célula de mamífero. Por ejemplo, las condiciones intracelulares en una célula de levadura cultivada bajo condiciones de cultivo de laboratorio típicas son condiciones fisiológicas. Condiciones de reacción in vitro adecuadas para cócteles de transcripción in vitro son generalmente condiciones fisiológicas. En general, las condiciones fisiológicas in vitro comprenden NaCl o KCl 50-200 mM, pH 6,5-8,5, 20-45°C y cationes divalentes 0,001-10 mM (por ejemplo, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>); preferiblemente aproximadamente NaCl o KCl 150 mM, pH 7,2-7,6, catión divalente 5 mM, e incluyen frecuentemente 0,01-1,0 por ciento de proteína inespecífica (por ejemplo, BSA). A menudo puede estar presente un detergente no iónico (Tween, NP-40, Triton X-100), normalmente de 0,001 a 2%, típicamente de 0,05 a 0,2% (v/v). Las condiciones acuosas particulares pueden ser seleccionadas por el médico de acuerdo con métodos convencionales. Para la orientación general, pueden aplicarse las siguientes condiciones acuosas reguladas: NaCl 10-250 mM, Tris HCl 5-50 mM, pH 5-8, con adición opcional de cationes y/o quelantes divalentes y/o quelantes metálicos y/o detergentes no iónicos y/o fracciones de membrana y/o agentes antiespumantes y/o de centelleo.

El término "población" tal como se usa en el presente documento significa una colección de componentes tales como polinucleótidos, porciones o polinucleótidos o proteínas. Una "población mixta" significa una colección de componentes que pertenecen a la misma familia de ácidos nucleicos o proteínas (es decir, están relacionados) pero que difieren en su secuencia (es decir, no son idénticos) y por lo tanto en su actividad biológica.

Una molécula que tiene una "proforma" se refiere a una molécula que sufre cualquier combinación de una o más modificaciones químicas covalentes y no covalentes (por ejemplo, glicosilación, escisión proteolítica, dimerización u oligomerización, cambios conformacionales inducidos por la temperatura o inducidos por el pH, asociación con un cofactor, etc.) en el camino para alcanzar una forma molecular más madura que tiene una diferencia de propiedades (por ejemplo, un aumento de actividad) en comparación con la molécula de proforma de referencia. Cuando se pueden distinguir dos o más modificaciones químicas (por ejemplo, dos escisiones proteolíticas, o una escisión proteolítica y una desglicosilación) en el camino hacia la producción de una molécula madura, la molécula precursora de referencia puede denominarse molécula "preproforma".

Una "propiedad" puede describir cualquier característica, incluyendo una propiedad física, química o característica de actividad de una proteína o anticuerpo a optimizar. Por ejemplo, en ciertos aspectos, la propiedad, característica o actividad predeterminada a optimizar se puede seleccionar de entre la reducción de la agregación proteína-proteína, el aumento de la estabilidad proteínica, el aumento de la solubilidad proteínica, el aumento de la estabilidad del pH de la proteína, aumento de la selectividad, disminución de la selectividad, introducción de sitios de glicosilación, introducción de sitios de conjugación, reducción de la inmunogenicidad, aumento de la expresión de la proteína, aumento de la afinidad del antígeno, disminución de la afinidad del antígeno, cambio en la afinidad de unión, cambio en la inmunogenicidad, cambio en la actividad catalítica, en la optimización del pH o en el aumento de la especificidad. Otras propiedades o características a optimizar incluyen la estabilidad del anticuerpo in vivo (por ejemplo, vida media del suero) y/o in vitro (por ejemplo, vida útil); la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del anticuerpo (por ejemplo, determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) u otro método conocido en la técnica), el pI del anticuerpo (por ejemplo, según se determina el enfoque isoeléctrico (IEF) u otros métodos conocidos en la técnica); solubilidad; (por ejemplo, constantes de unión anticuerpo-antígeno tales como, K<sub>a</sub>, K<sub>d</sub>, K<sub>on</sub>, K<sub>off</sub>), constante de disociación de equilibrio (K<sub>D</sub>); solubilidad de anticuerpos (por ejemplo, solubilidad en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable), función efectora (por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)); el nivel de expresión y los niveles de producción (por ejemplo, el rendimiento de un anticuerpo de una célula).

Una propiedad "optimizada" se refiere a un cambio deseable en una propiedad particular en una proteína mutante o anticuerpo en comparación con un anticuerpo molde. En un aspecto, una propiedad optimizada se refiere a que la mejora está entre aproximadamente 1% y 500%, con relación al anticuerpo molde o está entre aproximadamente 2 veces y 1000 veces, en relación con el anticuerpo molde.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pseudoaleatorio" se refiere a un conjunto de secuencias que tienen una variabilidad limitada, de manera que, por ejemplo, se permite cierto grado de variación de residuo, por ejemplo, el grado de variabilidad de residuo en otra posición, excepto cualquier posición pseudoaleatoria, aunque circunscrito.

Las "unidades cuasirrepetidas", tal como se usan en el presente documento, se refieren a las repeticiones redistribuidas y, por definición, no son idénticas. De hecho, el método se propone no sólo para unidades de codificación prácticamente idénticas producidas por mutagénesis de la secuencia inicial idéntica, sino también por el reordenamiento de secuencias similares o relacionadas que pueden divergir significativamente en algunas regiones. Sin embargo, si las secuencias contienen suficientes homologías para ser reafirmadas por este enfoque, pueden denominarse unidades "cuasirrepetidas".

Tal como se usa en el presente documento "biblioteca aleatoria de péptidos, se refiere a un conjunto de secuencias de polinucleótidos que codifican un conjunto de péptidos aleatorios y al conjunto de péptidos aleatorios codificados por dichas secuencias polinucleotídicas, así como las proteínas de fusión contienen esos péptidos aleatorios.

Tal como se usa en el presente documento, "secuencia peptídica aleatoria" se refiere a una secuencia de aminoácidos compuesta por dos o más monómeros de aminoácidos y construida mediante un proceso estocástico o aleatorio. Un péptido aleatorio puede incluir motivos de armazón o andamio, que pueden comprender secuencias invariantes.

5 Como se usa en el presente documento, "receptor" se refiere a una molécula que tiene afinidad por un ligando dado. Los receptores pueden ser moléculas naturales o sintéticas. Los receptores pueden emplearse en estado inalterado o como agregados con otras especies. Los receptores pueden unirse, covalentemente o no covalentemente, a un miembro de unión, ya sea directamente o a través de una sustancia de unión específica. Ejemplos de receptores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y antisueros reactivos con determinantes antigénicos específicos (tales como virus, células u otros materiales), receptores de membrana celular, 10 carbohidratos complejos y glicoproteínas, enzimas y receptores hormonales.

Las proteínas "recombinantes" se refieren a enzimas producidas por técnicas de ADN recombinante, es decir, producidas a partir de células transformadas por un constructo de ADN exógeno que codifica la proteína deseada. Las proteínas "sintéticas" son aquellas preparadas por síntesis química.

15 El término "polinucleótidos relacionados" significa que regiones o áreas de los polinucleótidos son idénticas y regiones o áreas de los polinucleótidos son heterólogas.

"Reordenamiento reductor", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al aumento en la diversidad molecular que se acumula a través de eventos de eliminación (y/o inserción) que están mediados por secuencias repetidas.

20 Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial".

25 Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o una secuencia génica dada en una lista de secuencias, o puede comprender una secuencia de ADNc o gen completa. Generalmente, una secuencia de referencia es de al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente de al menos 25 nucleótidos de longitud, y a menudo de al menos 50 nucleótidos de longitud. Puesto que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos y (2) puede comprender además una secuencia 30 que es divergente entre los dos polinucleótidos, comparaciones de secuencias entre dos polinucleótidos (o más) polinucleótidos típicamente se realizan comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

"Índice repetitivo (RI)", tal como se utiliza en el presente documento, es el número medio de copias de las unidades cuasirrepetidas contenidas en el vector de clonación.

35 El término "saturación" se refiere a una técnica de evolución en la que cada cambio posible se realiza en cada posición de un polinucleótido molde o polipéptido molde; sin embargo, el cambio en cada posición no se confirma mediante pruebas, sino es simplemente asumido estadísticamente en el que se estima que la mayoría de los posibles cambios o casi todos los cambios posibles ocurren en cada posición de un molde. La mutagénesis de saturación se refiere a la mutación del ADN de una región de un gen que codifica una proteína que cambia la secuencia de aminoácidos del 40 codón de la proteína y a continuación la selección de los mutantes expresados de esencialmente todos los mutantes para un fenotipo mejorado basado en el sobremuestreo estadístico, pero no garantiza cobertura completa.

45 El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, sobre una base de nucleótido por nucleótido) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo A, T, C, G, U o I) ocurre en ambas 50 secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Esta "identidad sustancial", como se usa en el presente documento, denota una característica de una secuencia polinucleotídica, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 85 por ciento de identidad, a menudo 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia y más comúnmente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia de una ventana de comparación de al menos 25-50 nucleótidos, en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia polinucleotídica que puede incluir supresiones o adiciones que suman 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación.

El término "mutación silenciosa" se refiere a un cambio de codón que no da lugar a un cambio de aminoácido en un polipéptido expresado y se basa en la redundancia del uso de codones para la inserción de aminoácidos.

5 Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos proteínas se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de una proteína con la secuencia de una segunda proteína. La semejanza puede determinarse mediante procedimientos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, un programa BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica en el Centro Nacional de Información Biológica).

10 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo de cadena sencilla" se refiere a un polipéptido que comprende un dominio VH y un dominio VL en el enlace polipeptídico, generalmente enlazado mediante un péptido espaciador (por ejemplo, [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]<sub>x</sub>), y que puede comprender secuencias de aminoácidos adicionales en los terminales amino y/o carboxi. Por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla puede comprender un segmento de cadena para enlazar con el polinucleótido que codifica. Como ejemplo, un scFv es un anticuerpo de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla son generalmente proteínas que consisten en uno o más segmentos polipeptídicos de al menos 10 amino contiguos sustancialmente codificados por genes de la superfamilia de inmunoglobulinas (por ejemplo, véase Williams y Barclay, 1989, pp. 361-368, que se incorpora aquí como referencia), más frecuentemente codificados por una secuencia de un gen de cadena pesada o cadena ligera de roedor, primate no humano, aviar, porcino, bovino, ovino, caprino o humano. Un anticuerpo de cadena sencilla funcional contiene generalmente una porción suficiente de un producto del gen de la superfamilia de inmunoglobulina para retener la propiedad de unirse a una molécula diana específica, típicamente un receptor o antígeno (epítipo).

20 Se dice que los miembros de un par de moléculas (por ejemplo, un par anticuerpo-antígeno o un par de ácido nucleico) se "unen específicamente" entre sí si se unen entre sí con mayor afinidad que con otras moléculas no específicas. Por ejemplo, se puede describir que un anticuerpo contra un antígeno al que se une más eficazmente que a una proteína no específica se une específicamente al antígeno. (De manera similar, se puede describir una sonda de ácido nucleico como una unión específica a un objetivo de ácido nucleico si forma un dúplex específico con las interacciones diana de apareamiento de diana (véase más arriba).

25 "Hibridación específica" se define aquí como la formación de híbridos entre un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido que tiene una secuencia distinta pero sustancialmente idéntica al primer polinucleótido), en el que secuencias polinucleotídicas sustancialmente no relacionadas no forman híbridos en la mezcla.

30 El término "polinucleótido específico" significa un polinucleótido que tiene ciertos puntos extremos y que tiene una cierta secuencia de ácidos nucleicos. Dos polinucleótidos en los que un polinucleótido tiene la secuencia idéntica como una porción del segundo polinucleótido, pero diferentes extremos comprenden dos polinucleótidos específicos diferentes.

35 "Condiciones de hibridación rigurosas" significa que la hibridación ocurrirá solamente si hay al menos 90% de identidad, preferiblemente al menos 95% de identidad y más preferiblemente al menos 97% de identidad entre las secuencias. Véase Sambrook et al., 1989, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

40 También se incluyen en la invención polipéptidos que tienen secuencias que son "sustancialmente idénticas" a la secuencia de un polipéptido, tal como una cualquiera de las SEQ ID NO descritas aquí. Una secuencia de aminoácidos "sustancialmente idéntica" es una secuencia que difiere de una secuencia de referencia sólo por sustituciones conservativas de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de un aminoácido por otro de la misma clase (por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, para otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina).

45 Adicionalmente, una secuencia de aminoácidos "sustancialmente idéntica" es una secuencia que difiere de una secuencia de referencia o por una o más sustituciones, supresiones o inserciones no conservadoras, particularmente cuando dicha sustitución tiene lugar en un sitio que no es el sitio activo de la molécula, y siempre que el polipéptido esencialmente conserve sus propiedades de comportamiento. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser eliminados de un polipéptido de fitasa, resultando en la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar significativamente su actividad biológica. Por ejemplo, se pueden eliminar aminoácidos amino o carboxilterminales que no son necesarios para la actividad biológica de la fitasa. Tales modificaciones pueden resultar en el desarrollo de polipéptidos de fitasa activos más pequeños.

55 La presente invención proporciona una "proteína sustancialmente pura". El término proteína sustancialmente pura se utiliza aquí para describir una molécula, tal como un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de fitasa o un fragmento del mismo) que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y otros materiales biológicos con los que se asocia naturalmente. Por ejemplo, una molécula sustancialmente pura, tal como



un polipéptido, puede ser al menos 60%, en peso seco, de la molécula de interés. La pureza de los polipéptidos se puede determinar usando métodos estándar incluyendo, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE), cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)) y análisis de secuencia de aminoácidos aminoterminal.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en el que la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de  
10 aproximadamente 80 a 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. Las especies de disolventes, las moléculas pequeñas (<500 Daltons) y las especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares.

### 15 Descripción detallada de la invención

La descripción proporciona un método para la generación de anticuerpos mejorados en células de mamífero. Se proporciona una biblioteca de variantes humanizadas con alta diversidad de marco validada sin necesidad de retromutaciones para retener afinidad original. No se requiere injerto de CDR o presentación de fagos. En una  
20 realización, las bibliotecas de anticuerpos humanizados se rastrean para detectar la unión a antígeno en ELISA en comparación con un anticuerpo donante. En otra realización, el cribado basado en células se usa para determinar la actividad biológica. En otra realización, el método comprende la conmutación de isotipos en comparación con el anticuerpo donante.

Los anticuerpos son una clase de proteínas de suero que son inducidas después del contacto con un antígeno. Se unen específicamente al antígeno que induce su formación. Male, Immunology, Gower Medical Publishing, Londres,  
25 1986, pp. 19-34. La inmunoglobulina (Ig) es un sinónimo de anticuerpo. Estructuralmente, las moléculas de anticuerpo tienen una estructura de cadena general de cuatro polipéptidos que consta de dos cadenas pesadas idénticas (HC) y dos cadenas ligeras idénticas (LC), estabilizadas y reticuladas por enlaces disulfuro intracadena e intercadena y enlaces no covalentes. Las cadenas pesadas también tienen porciones covalentes de carbohidratos. Las diferentes clases de anticuerpos consisten en polímeros de la estructura de cuatro cadenas. Las cadenas pesadas son de 5 tipos  
30 principales ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ) y consisten en 440-600 residuos de aminoácidos. Las cadenas ligeras son de dos tipos principales ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ) y tienen aproximadamente 220-230 residuos de aminoácidos. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras se pliegan en dominios. Las enzimas proteolíticas, tales como papaína y pepsina, se pueden usar para dividir una molécula de anticuerpo en diferentes fragmentos característicos. La papaína produce dos fragmentos Fab idénticos e independientes, cada uno con un sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc. La pepsina produce un  
35 fragmento F (ab')<sub>2</sub>. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 2ª ed., 1989, Garland Publishing, Inc.

Tanto las cadenas ligeras (LC) como las cadenas pesadas (HC) tienen una secuencia variable en sus extremos aminoterminal pero una secuencia constante en sus extremos carboxiloterminales. Las cadenas ligeras tienen una región constante de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud y una región variable del mismo tamaño. Las cadenas pesadas también tienen una región variable de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, pero la región constante de las cadenas H tiene aproximadamente 330 o 440 aminoácidos de longitud, dependiendo de la clase de la cadena H. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 2ª ed., 1989, Garland Publishing, Inc. en págs. 1019. Sólo parte de la región variable participa directamente en la unión del antígeno. Los estudios han demostrado que la variabilidad en las regiones variables de las cadenas L y H está en su mayor parte restringida a tres pequeñas regiones hipervariables (también denominadas regiones complementarias o CDR) en cada cadena. Las partes restantes de la  
40 región variable, conocidas como regiones de armazón (FR), son relativamente constantes. Alberts y col., Molecular Biology of the Cell, 2ª ed., 1989, Garland Publishing, Inc., págs. 1019-1020.

En una realización preferida, los métodos de la descripción proporcionan moléculas de anticuerpo humanizadas de longitud completa, no Fabs o fragmentos de longitud parcial. Estos fragmentos de anticuerpo, que conservan cierta capacidad de unirse selectivamente a un antígeno (por ejemplo, un antígeno polipeptídico) del anticuerpo del que se derivan, pueden fabricarse usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, supra), y se describen adicionalmente, como sigue. Los anticuerpos pueden usarse para aislar cantidades preparativas del antígeno por cromatografía de inmunoafinidad. Varios otros usos de tales anticuerpos son para diagnosticar y/o estadificar enfermedad (por ejemplo, neoplasia) y para aplicación terapéutica para tratar una enfermedad, tal como por ejemplo: neoplasia, enfermedad autoinmune, SIDA, enfermedad cardiovascular, infecciones y similares. Los anticuerpos quiméricos, humanizados, humanizados o totalmente humanos son particularmente útiles para la  
55 administración a pacientes humanos.

Humanización por injerto de CDR en comparación con los métodos de humanización de la divulgación

La humanización por injerto de CDR, o remodelación, implica la intercalación de las CDR de ratón de cada cadena de inmunoglobulina dentro de las regiones FW de una región variable humana.

5 Se puede usar un método de injerto de CDR para crear lo que se denomina inmunoglobulinas de marco con parche y se describe en Leung et al., Patente de EE.UU. No. 7,321,026, que se incorpora aquí como referencia. A diferencia de los métodos de humanización descritos anteriormente, que injertaron CDRs de un donante sobre los armazones de una única inmunoglobulina aceptor, los segmentos de armazón (FR1, FR2, FR3 y FR4), o FRs, fueron parcheados para reemplazar los FR correspondientes de la inmunoglobulina madre. El surtido libre de estos FRs de diferentes inmunoglobulinas y de diferentes especies fue mezclado y apareado para formar la cadena final de inmunoglobulina. Las cadenas de inmunoglobulina se prepararon utilizando las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina donadora y porciones de secuencias estructurales de una o más inmunoglobulinas humanas o de primates. Las secuencias FR individuales se seleccionan por la mejor homología entre el anticuerpo no humano y el molde de anticuerpo humano. Este enfoque, sin embargo, es de mano de obra intensiva, y las regiones marco óptimas no se identifican fácilmente.

15 Otro método de injerto de CDR se describe por Williams et al. In *Antibody Engineering*, vol. 1, Chapter 21, Konterman and Dubel, (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, pp. 319. Las secuencias de FR se seleccionan por la mejor homología entre el anticuerpo no humano y el molde de anticuerpo humano. La selección de las regiones variables humanas se considera de importancia crítica. Hay más de 9.000 anticuerpos pesados y más de 2.500 kappa en las bases de datos públicas. Estos incluyen Kabat, GenBank, e IMGT bases de datos. Al alinear estas bases de datos con el sistema de numeración de Kabat e introducir huecos cuando sea necesario, cada región variable humana se califica de identidad con la secuencia de ratón. La identidad de residuo se determina en la región FW, los residuos de la interfaz canónica VH-VK y los residuos se identifican a partir de los modelos de homología de importancia potencial. Además, se identifican patrones de N-glicosilación en la región FW, lo que puede conducir a efectos dependientes de la glicosilación sobre la unión del anticuerpo. Las secuencias de región variable humana resultantes se refinan maximizando la identidad de secuencia y la homología con el anticuerpo de ratón.

25 La estrategia típica de injerto de CDR descrita por Williams et al. 2010 comienza con clonación y secuenciación de ADNcs de región variable de un hidridoma de células B de ratón. Las construcciones quiméricas de cadena pesada y ligera se preparan utilizando las secuencias de ADNc. Las regiones variables humanas injertadas con CDR se diseñan en paralelo y se preparan construcciones de cadenas pesadas y ligeras humanizadas injertadas con CDR. Los anticuerpos recombinantes se expresan en transfección transitoria usando constructos de expresión quiméricos y/o humanizados. Se analiza la potencia de unión a antígenos de anticuerpos humanizados recombinantes. Si la potencia es baja, se preparan otras versiones de anticuerpos humanizados sustituyendo con residuos de ratón de estructura seleccionados. El objetivo es obtener un anticuerpo humanizado con una potencia óptima de unión al antígeno, pero con un mínimo de anticuerpos de la región de estructura del ratón. Este proceso de humanización por injerto de CDR es también algo intensivo en mano de obra, pudiendo necesitar múltiples iteraciones para preparar un anticuerpo humanizado que exhiba las características más deseables.

40 Otro método de humanizar anticuerpos que implica también remodelación para reducir la inmunogenicidad implica la síntesis de una biblioteca combinatoria que comprende CDR de un anticuerpo donante fusionado en marco a regiones de armazón a partir de un subbanco de regiones de armazón. Esta técnica, denominada barrido de armazón de anticuerpos, se describe en Wu et al., US 2010/0216975, que se incorpora aquí como referencia. Por ejemplo, Wu et al., prepararon las sub-bibliotecas combinatorias que se ensamblaron secuencialmente utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por extensión de solapamiento.

45 La divulgación proporciona una técnica de humanización expresa de anticuerpos con inmunogenicidad reducida; mientras se mantiene o aumenta la especificidad y afinidad de unión al antígeno cuando se compara con el anticuerpo donante, y simultáneamente se optimiza la expresión de la proteína. En un aspecto, no se requiere maduración de afinidad adicional.

50 La descripción proporciona un método para producir anticuerpos humanizados a partir de un anticuerpo molde en el que la región variable o las CDR se derivan del anticuerpo molde y las regiones de armazón y constantes del anticuerpo se derivan de uno o más anticuerpos humanos. En un aspecto, los marcos son de un conjunto de marcos humanos de anticuerpos humanos expresados funcionalmente. En otro aspecto, se utiliza una única secuencia para la región de armazón 4 en cualquiera o ambas de la cadena ligera y la cadena pesada. La estructura de codificación de secuencia 4 también está comprendida en el vector de expresión. La región variable o las CDR derivadas del anticuerpo molde tienen preferiblemente de aproximadamente 90% a aproximadamente 100% de identidad con la región variable o CDR del anticuerpo molde, aunque se contemplan todas y cada una de las modificaciones, incluidas sustituciones, inserciones y eliminaciones, siempre y cuando el anticuerpo humanizado mantiene la capacidad de unirse al antígeno diana.

55 Las regiones de los anticuerpos humanizados que se derivan de anticuerpos humanos no necesitan tener una identidad del 100% con los anticuerpos humanos. En una realización preferida, se conservan tantos residuos de aminoácidos humanos como sea posible para que la inmunogenicidad sea despreciable, pero los residuos humanos,

5 en particular los residuos de la región de armazón, se sustituyen según se requiera y se enseñan a continuación de acuerdo con la presente invención. Tales modificaciones como las descritas aquí son necesarias para soportar el sitio de unión al antígeno formado por las CDR mientras simultáneamente maximizan la humanización del anticuerpo. En un aspecto específico, las regiones estructurales de los anticuerpos humanizados que se derivan del conjunto de marco humano tienen una identidad del 100% con los anticuerpos humanos.

10 Cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera contiene tres CDR que se combinan para formar el sitio de unión al antígeno. Las tres CDR están rodeadas por cuatro regiones FR que funcionan principalmente para soportar las CDR. Las secuencias de las CDR dentro de las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera pueden identificarse mediante alineación asistida por ordenador de acuerdo con Kabat et al. (1987) en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., United States Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., o por modelado molecular de las regiones variables, por ejemplo utilizando el programa ENCAD como lo describe Levitt (1983) J. Mol. Biol. 168: 595.

15 En una realización, las CDR se derivan de un anticuerpo molde. La determinación de las CDR de la cadena pesada y de las CDR de la cadena ligera está dentro de la habilidad de un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, <http://www.bioinf.org.uk/abs/>.

Las secuencias de las CDR del anticuerpo humanizado pueden ser modificadas o desarrolladas por cualquier técnica conocida en el arte y pueden incluir inserciones, sustituciones y eliminaciones en la medida en que el anticuerpo humanizado mantiene la capacidad de unirse al antígeno diana. El experto en la técnica puede establecer el mantenimiento de esta actividad realizando los ensayos funcionales descritos más adelante en este documento.

20 La biblioteca de codificación de dominio variable HC humanizada derivada de las CDR del antígeno molde y la biblioteca de codificación de dominio variable LC humanizada derivada de las CDR del antígeno molde se pueden combinar con las regiones constantes y estructurales humanas para formar el anticuerpo humanizado. Los genes humanos que codifican las regiones constantes (C) de los anticuerpos, fragmentos y regiones humanizados de la presente invención pueden derivarse de una biblioteca de hígado fetal humano, por métodos conocidos. Los genes de la región C humana pueden derivarse de cualquier célula humana incluyendo aquellos que expresan y producen inmunoglobulinas humanas. La región C<sub>H</sub> humana puede derivarse de cualquiera de las clases o isotipos de cadenas H humanas conocidos, incluyendo  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y subtipos de los mismos, tales como G1, G2, G3 y G4. Dado que el isotipo de la cadena H es responsable de las diversas funciones efectoras de un anticuerpo, la elección de la región C<sub>H</sub> se guiará por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación del complemento o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Preferiblemente, la región C<sub>H</sub> se deriva del gamma 1 (IgG1).

30 La región C<sub>L</sub> humana puede derivarse de isotipo de cadena L humana, kappa o lambda, preferiblemente kappa.

35 Los genes que codifican regiones de inmunoglobulina C humanas se obtienen a partir de células humanas mediante técnicas de clonación convencionales (Sambrook, et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., Eds Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993)) Los genes de la región C humana están fácilmente disponibles a partir de clones conocidos que contienen genes que representan las dos clases de cadenas L, las cinco clases de cadenas H y subclases de las mismas. Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo quiméricos, como F(ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub> y Fab, diseñando un gen de cadena H quimérico que esté truncado apropiadamente. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de cadena H de un fragmento F(ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub> incluiría secuencias de ADN que codifican el fragmento región CH1 de dominio y bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de traducción para producir la molécula truncada.

40 Generalmente, en un ejemplo, los anticuerpos, fragmentos y regiones humanizados de la presente invención se producen clonando segmentos de ADN que codifican las regiones de unión al antígeno de cadena H y L que comprenden CDR del anticuerpo molde y uniendo estos segmentos de ADN a segmentos de ADN que incluyen C<sub>H</sub> y C<sub>L</sub>, respectivamente, para producir genes codificantes de inmunoglobulina quimérica de longitud completa.

45 Las secuencias de las regiones variables del anticuerpo pueden ser modificadas por inserciones, sustituciones y eliminaciones en la medida en que el anticuerpo quimérico mantiene la capacidad de unirse e inhibir el antígeno diana. El experto en la materia puede averiguar el mantenimiento de esta actividad realizando ensayos funcionales apropiados.

50 Pueden usarse métodos para ingeniería o humanización de anticuerpos no humanos o humanos y son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado o modificado genéticamente tiene uno o más residuos de aminoácidos de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero no limitándose a ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos de aminoácidos humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de una variable "de importación", constante o de otro dominio de una secuencia humana conocida. Se describen secuencias de Ig humanas conocidas, por ejemplo, [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi); [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/); [www.abcam.com/](http://www.abcam.com/); [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html);

55

[www.public.iastate.edu/.about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html); [www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html);  
[www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm); [www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html);  
[www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/); [www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html);  
5 [www.antibodyresource.com](http://www.antibodyresource.com); [mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html); [www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/); [pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html); [www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/](http://www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/); [www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html);  
[www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/); [www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhiro/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhiro/Elisa.html);  
[www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp); [www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html);  
[www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html); [www.isacnet.org/sites\\_geo.html](http://www.isacnet.org/sites_geo.html); [aximt1.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html](http://aximt1.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html);  
10 [baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html](http://baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html); [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/);  
[www.mrcce.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrcce.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html);  
[www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html); [imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/); [www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html);  
[antibody.bath.ac.uk/](http://antibody.bath.ac.uk/); [abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html);  
[www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html](http://www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html); [www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/);  
15 [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm); [www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html);  
[www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html); [www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html);  
[www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html](http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html); [www.jerini.de/fr\\_products.htm](http://www.jerini.de/fr_products.htm);  
[www.patents.ibm.com/ibm.html](http://www.patents.ibm.com/ibm.html). Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), cada una de las cuales se incorpora por completo como referencia.

20 Tales secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, velocidad, avidez, especificidad, vida media, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. Generalmente parte o la totalidad de las secuencias CDR no humanas o humanas se mantienen, mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se reemplazan con humanas u otros aminoácidos. Los anticuerpos también se pueden humanizar opcionalmente con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos humanizados pueden prepararse opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas
25 muestras permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de consenso e importación de manera que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia de la unión al antígeno. La humanización o ingeniería de los anticuerpos de la presente invención se puede realizar usando cualquier método conocido, tal como, pero sin limitarse a los descritos en Winter (Jones et al., Nature 321: 522 (1986), Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988), Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), U.S. Pat. Nos. 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4.816.567, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia, incluidas las referencias citadas en las mismas.

45 La región constante humana del anticuerpo humanizado de la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y puede comprender una cadena ligera kappa o lambda. En una realización, la región constante humana comprende una cadena pesada de IgG o un fragmento definido, por ejemplo, al menos uno de los isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otra realización, el anticuerpo humano humanizado comprende una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1K. Los anticuerpos humanizados aislados de la presente invención comprenden
50 secuencias de aminoácidos de anticuerpos descritas en el presente documento codificada por cualquier polinucleótido adecuado igualmente. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado se une al anticuerpo diana y, por lo tanto, neutraliza parcial o sustancialmente al menos una actividad biológica de la proteína.

55 En un aspecto, el anticuerpo humanizado comprenderá una región de unión al antígeno que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR4, CDR5 y CDR6), derivadas del anticuerpo molde.

60 En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede tener una región de unión al antígeno que comprende CDRs de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tienen la secuencia de aminoácidos de las correspondientes CDR 1, 2 y/o 3. En otra realización particular, el anticuerpo o porción de unión al antígeno puede tener una región de unión a antígenos que comprende CDRs de cadena ligera (es decir, CDR4, CDR5 y/o CDR6) que tienen la secuencia de aminoácidos de las correspondientes CDRs 4, 5 y/o 6. En una realización, las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

5 tienen la secuencia de aminoácidos de la CDR correspondiente del anticuerpo molde. Tales anticuerpos se pueden preparar uniendo químicamente entre sí las diversas porciones (por ejemplo, CDR, armazón) del anticuerpo usando técnicas convencionales, preparando y expresando una (es decir, una o más) moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo usando técnicas convencionales de recombinante ADN o utilizando cualquier otro método adecuado y utilizando cualquiera de los posibles codones redundantes que darán lugar a la expresión de un polipéptido de la invención.

10 En otra realización, la descripción proporciona un método de humanización de anticuerpos que comprende la expresión de un anticuerpo de longitud completa en un huésped de producción de células eucariotas; comprendiendo el método seleccionar un anticuerpo molde; desarrollar las secuencias CDR del anticuerpo molde para producir las bibliotecas de fragmentos CDR; ligar las bibliotecas de fragmentos de CDR con un conjunto de marco humano a partir de anticuerpos expresados funcionalmente, en donde una única secuencia para cada región de armazón 4 se utiliza a partir del conjunto; seleccionar los anticuerpos variantes para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; seleccionar una variante del anticuerpo humanizado del conjunto de anticuerpos mutantes basándose en la reducción de la inmunogenicidad y afinidad por el antígeno, en comparación con el anticuerpo molde. En un aspecto, uno o más de los anticuerpos humanizados variantes están optimizados para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada adicional en comparación con el anticuerpo molde; tales como el nivel de expresión; y los anticuerpos se expresan en el mismo huésped de producción de células eucariotas que en la etapa de evolución para cualquier escala comercial. En un aspecto, el anticuerpo humanizado se selecciona de la biblioteca de anticuerpos humanizados basándose en (1) inmunogenicidad reducida en comparación con el anticuerpo molde; (2) optimización de la al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada de unión al antígeno en comparación con el anticuerpo molde; y (3) un alto nivel de expresión cuando se compara con otros anticuerpos humanizados en la biblioteca.

25 En una realización, el método de la descripción comprende la selección de un anticuerpo molde que se dirige a un antígeno específico de interés. El anticuerpo molde puede ser un anticuerpo monoclonal murino existente, o un anticuerpo quimérico, o incluso un anticuerpo humanizado existente para el cual se desea mejorar o optimizar una o más características.

En un aspecto, el anticuerpo molde se clona y se secuencia para identificar secuencias de FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3 y FW4 de las porciones variables de la inmunoglobulina tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera.

30 Se preparan bibliotecas de fragmentos de ADN ds que codifican CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC obtenidas por cualquier método de evolución a partir del anticuerpo moldeado por cualquier medio conocido en la técnica. Específicamente, las bibliotecas de fragmentos de ADN de doble hebra comprenden fragmentos que codifican bibliotecas de fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR) que incluyen fragmentos que codifican la totalidad o una porción de CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC y CDR3 de LC derivadas del anticuerpo molde. En un aspecto, las bibliotecas de CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC pueden contener un solo miembro que comprende la secuencia de la región correspondiente en el anticuerpo molde.

40 En otro aspecto, la etapa de evolución comprende una técnica de evolución. Cualquier método de evolución se realiza sobre la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo molde, o un fragmento del mismo, tal como un fragmento de CDR, para preparar un anticuerpo o una biblioteca de fragmentos. En un aspecto, la evolución se lleva a cabo mediante un método de ingeniería completa de proteínas para producir finalmente el conjunto de anticuerpos mutantes. El método de ingeniería completa de proteínas puede seleccionarse, por ejemplo, a partir de una o una combinación de Evolución de Posición Integral (CPE™), Síntesis de Proteínas Integral (CPS™), Evolución Flex, Evolución de Sinergia, Evolución de Inserción Posicional Completa (CPI™) o Evolución de Supresión Posicional Integral (CPD™). Estas técnicas se describen en detalle en el documento PCT/US2010/42302, presentado el 16 de julio de 2010, e incorporado aquí como referencia. En otro aspecto, los anticuerpos mutantes se expresan en el mismo sistema de mamífero usado para generar la biblioteca de anticuerpos humanos.

50 En otra realización, un hibridoma molde o anticuerpo recombinante se selecciona para un antígeno diana particular; la evolución de las CDR del anticuerpo molde se lleva a cabo para proporcionar en última instancia un conjunto de anticuerpos mutantes que se seleccionan, por ejemplo, mediante el uso de visualización de la superficie celular del anticuerpo en un sistema de células de mamífero; y la fabricación se realiza en el mismo sistema de células de mamífero usado para el cribado.

55 En otra realización, un hibridoma molde o anticuerpo recombinante se selecciona para un antígeno diana particular; la evolución de las CDR del anticuerpo molde se lleva a cabo para proporcionar en última instancia un conjunto de anticuerpos mutantes que se seleccionan, por ejemplo, mediante el uso de visualización de la superficie celular del anticuerpo en un sistema de células de mamífero; y la fabricación se realiza en el mismo sistema de células de mamífero usado para el cribado.

En otra realización, el anticuerpo hibridoma/recombinante molde seleccionado se humaniza y se criba en el huésped de fabricación, seguido por la producción en el huésped de fabricación, en el que se omite completamente el paso de optimización (evolución).

5 En otros aspectos de la presente invención, la optimización de la expresión descendente en los huéspedes de fabricación se lleva a cabo desarrollando la región Fc del anticuerpo, codones silenciosos en el anticuerpo, y/o los genes del vector y/o del huésped usados en la expresión de la proteína. En un aspecto, una biblioteca Fc se genera por cualquier técnica evolutiva. En un aspecto específico de la optimización de la expresión, se lleva a cabo una evolución completa sobre el dominio Fc de un anticuerpo para crear una biblioteca de mutantes Fc que puede usarse para seleccionar un socio óptimo para cualquier Fv. La optimización se diseña para la conexión rápida de todas las variantes de Fc a cada nueva región de Fv. Alternativamente, un subconjunto de estos Fcs se puede utilizar para atar a Fvs diferentes. Cada una de estas combinaciones Fc variante/Fv se selecciona como un anticuerpo de longitud completa expresado en células de mamífero (por ejemplo, CHO, medios rentables) para una expresión óptima. Además, se puede realizar CPS para examinar todas las permutaciones teóricas de hasta 12 o más de estos golpes CPE en células de mamífero para mejorar la expresión. También pueden seleccionarse cambios de codones deseables específicos para identificar clones con expresión aumentada. Se identifican codones silenciosos y se realiza CPE en estas posiciones. Esta biblioteca CPE se selecciona para identificar los golpes de expresión óptimos. Además, todas las permutaciones teóricas de hasta 12 o más aciertos de CPE se pueden usar en el proceso CPS para generar una nueva biblioteca que se puede cribar en células de mamífero para mejorar la expresión. Los golpes de mutación silenciosa de CPS se utilizan para personalizar la proteína para una expresión óptima en una línea celular y un medio específico. Esto proporciona la oportunidad para el control biosimilar de la estructura fina.

25 Otras áreas para mejorar la expresión incluyen: optimización del vector, incluyendo promotor, sitios de empalme, terminales 5' y 3', secuencias flanqueantes, reducción de eliminación y reordenación de genes, mejora de las actividades de los genes de la célula huésped, optimización de las enzimas de glicosilación del huésped y mutagénesis y selección amplia de cromosomas de células huésped. Se ha demostrado que las secuencias de aminoácidos 5' son importantes para el aumento de la expresión.

#### Evolución de los candidatos líder

30 En otro aspecto, puede emplearse cualquier método de evolución de proteínas para la evolución simultánea del rendimiento del anticuerpo y la optimización de la expresión. La optimización del rendimiento de la proteína puede incluir la mejora de diversas características tales como afinidad, características farmacocinéticas, orientación de tejidos, agregación proteína-proteína, abordando la alta variabilidad del ensayo y modificando otras características in vivo.

35 Los métodos para la evolución de moléculas, incluyendo los anticuerpos molde de la presente invención, incluyen métodos estocásticos y no estocásticos. Los métodos publicados incluyen métodos de mutagénesis aleatorios y no aleatorios. Cualquiera de estos enfoques puede emplearse para desarrollar aún más las propiedades de los anticuerpos humanizados de la descripción hacia una característica deseada, tal como una mejor estabilidad en diferentes entornos de temperatura o pH, o una mejor expresión en una célula huésped. Se pueden seleccionar otras propiedades potencialmente deseables, tales como actividad catalítica mejorada, estabilidad de proteína mejorada en diversas condiciones, selectividad y/o solubilidad mejorada, y resultados de expresión mejorados por mejora de características tales como agregación reducida para experimentos de evolución.

40 La evolución puede llevarse a cabo directamente en un huésped eucariota, tal como un hospedador de células de mamífero o un huésped de células de levadura, que se utilizará para la producción de la proteína terapéutica corriente abajo. Los candidatos pueden evolucionar para una expresión óptima en el mismo hospedante utilizado para cribar y/o evolucionar y para fabricar. La optimización de la expresión puede lograrse mediante la optimización de los vectores utilizados (componentes del vector, tales como promotores, sitios de empalme, terminales 5' y 3' y secuencias flanqueantes), modificación génica de las células huésped para reducir eliminaciones y reordenamientos de genes, evolución de las actividades del gen de la célula huésped mediante métodos in vivo o in vitro de evolución de los genes relevantes, la optimización de las enzimas glicosilantes del huésped mediante la evolución de genes relevantes y/o mediante mutagénesis de células hospedadoras de todo el cromosoma y estrategias de selección para seleccionar células con capacidades de expresión mejoradas. Las células huésped se describen adicionalmente en el presente documento.

Se pueden emplear la expresión en despliegue en superficie celular y la tecnología de criba (por ejemplo, como se definió anteriormente) para cribar bibliotecas de proteínas evolucionadas para candidatos que se van a fabricar.

55 Los métodos actuales en uso generalizado para crear proteínas alternativas a partir de una molécula de partida son tecnologías de mutagénesis dirigidas por oligonucleótidos, reacciones en cadena de la polimerasa propensas a errores y mutagénesis de casete, en las que la región específica a optimizar se reemplaza con un oligonucleótido mutagenizado sintéticamente. En estos casos, una serie de sitios mutantes se generan alrededor de ciertos sitios en la secuencia original.

5 En la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, se sustituye una secuencia corta por un nucleótido sintéticamente mutagenizado. La PCR propensa a errores usa condiciones de polimerización de baja fidelidad para introducir un nivel bajo de mutaciones puntuales aleatoriamente sobre una secuencia larga. En una mezcla de fragmentos de secuencia desconocida, puede usarse una PCR propensa a error para mutagenizar la mezcla. En la mutagénesis de casete, un bloque secuencial de una única molde se reemplaza típicamente por una secuencia (parcialmente) aleatoria.

10 Los genes quiméricos se han hecho uniendo 2 fragmentos de polinucleótidos usando extremos pegajosos compatibles generados por enzimas de restricción, donde cada fragmento se deriva de una molécula progenitora separada (o parental). Otro ejemplo es la mutagénesis de una posición de codón único (es decir, para conseguir una sustitución, adición o eliminación de codones) en un polinucleótido parental para generar un único polinucleótido de progeñe que codifica para un polipéptido mutagenizado de sitio único.

Además, se han utilizado sistemas de recombinación específicos de sitio in vivo para generar híbridos de genes, así como métodos aleatorios de recombinación in vivo y recombinación entre genes homólogos pero truncados en un plásmido. También se ha reportado mutagénesis por extensión y PCR.

15 Se han utilizado métodos no aleatorios para conseguir un mayor número de mutaciones puntuales y/o quimerizaciones, por ejemplo se han utilizado enfoques completos o exhaustivos para generar todas las especies moleculares dentro de un agrupamiento particular de mutaciones, para atribuir funcionalidad a grupos estructurales específicos en una molécula molde (por ejemplo, una posición de aminoácido única específica o una secuencia que comprende dos o más posiciones de aminoácidos) y para categorizar y comparar la agrupación específica de mutaciones. La patente de los Estados Unidos número 7033781 titulada "Manipulación de células completas mutagenizando una porción sustancial de un genoma de partida, combinando mutaciones, y repitiendo opcionalmente " describe un método de evolución de un organismo hacia las características deseadas. La Patente de los Estados Unidos Número 6764835 titulada "Mutagénesis de saturación en evolución dirigida" y la Patente de los Estados Unidos Número 6562594 titulada "Reensamblaje de Ligación sintética en evolución dirigida" describen métodos de evolución exhaustiva y selección de las características deseadas de las moléculas. Cualquiera de estos métodos puede utilizarse en el método de la presente invención.

25 Existe una diferencia entre los métodos previamente conocidos de "mutagénesis por saturación" y las técnicas de evolución "total" preferidas en el presente documento. La mutagénesis de saturación se refiere a una técnica de evolución en la que cada cambio posible se realiza en cada posición de un polinucleótido molde o polipéptido molde; Sin embargo, el cambio en cada posición no es confirmado por las pruebas, sino simplemente asumido estadísticamente. La evolución completa se refiere a una técnica de evolución en la que se realiza cada cambio posible en cada posición de un polinucleótido molde o polipéptido molde y se ensaya el polinucleótido o polipéptido para confirmar que se ha hecho el cambio deseado.

35 En otra realización, el CPE/EvoMap puede usarse para identificar y explotar sitios completamente mutables. En un aspecto, la explotación de múltiples sitios completamente mutables se denomina Flex Evolution y se utiliza para realizar cambios dirigidos tales como la introducción de sitios para la glicosilación (por ejemplo, codones para aminoácidos para la glicosilación N- u O-ligada; Asn dentro de la secuencia de consenso Asn-Aa -Ser-Thr o Ser/Thr) y la conjugación química. La evolución de flexión también puede usarse en el diseño de sitios de escisión de proteasa, introducción de marcadores para purificación y/o detección, marcaje específico de sitio y similares. Además, la optimización de codones de mutaciones silenciosas puede utilizarse para mejorar la expresión de proteínas. En esta realización, denominada Flex Evolution, después de la expresión de la proteína, las bibliotecas de polipéptidos mutantes producidas se vuelven a examinar para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada en comparación con el polipéptido molde. En un aspecto, la propiedad predeterminada incluye la reducción de la agregación proteína-proteína, el aumento de la estabilidad de la proteína o el aumento de la solubilidad de la proteína. En un aspecto, las bibliotecas de polipéptidos mutantes se seleccionan simultáneamente para dos o más propiedades.

40 En otro aspecto, puede usarse cualquier sistema de expresión eucariota que glicosila para la introducción de sitios de glicosilación, tales como, por ejemplo, líneas celulares de mamíferos, plantas, levaduras e insectos.

45 En la técnica de Flex Evolution, la evaluación de estructuras bioinformáticas y de cristal de rayos X de proteína de proteínas relacionadas, o la proteína o polipéptido molde, es útil para la optimización de moldes. En un aspecto, los sitios seleccionados no están en los residuos de contacto. En otro aspecto, la selección de mutaciones de proteínas no superficiales permite reducir el riesgo de inmunogenicidad.

50 Las aplicaciones de Flex Evolution incluyen, por ejemplo, la reducción de la agregación proteína-proteína, la mejora de la solubilidad de las proteínas, la optimización de la farmacocinética a través de las bibliotecas de glicosilación, la optimización de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas y la desinmunización de los sitios antigénicos directamente, mediante el enmascaramiento de la glicosilación.

55 En un aspecto de Flex Evolution, se utiliza un EvoMap™ para identificar sitios completamente mutables, la generación de CPS se realiza con la inserción de residuos de glicosilación en sitios completamente mutables (o mutaciones silenciosas para efectos de traducción) y el cribado de una biblioteca glicosilada combinatoria (por ejemplo, análisis

de espectroscopia de masas, dispersión dinámica de la luz), reducción de la inmunogenicidad (por bioinformática o ensayo) y/o análisis farmacocinético (por ejemplo, en ratones Foxn1nu).

- 5 En un aspecto, la evolución Flex puede usarse para la desinmunización para eliminar la inmunogenicidad mientras se mantiene la función. La desinmunización de Flex Evolution puede realizarse enmascarando la inmunogenicidad con glicosilación, identificando las sustituciones de aminoácidos del espectro de mutación hipersomática humana que pueden eliminar la inmunogenicidad mientras se mantiene la función, la reducción de la dosis para eludir el potencial de inmunogenicidad y la minimización de los cambios de residuos de aminoácidos no superficiales. Además, pueden usarse bases de datos y algoritmos de inmunogenicidad para identificar y reemplazar epítopos potenciales de unión a MHC. En un aspecto, la predicción de modificación *in silico* se acopla con datos de CPE/CPS para generar variantes.
- 10 La propensión reducida a generar epítopos de células T y/o desinmunización puede medirse mediante técnicas conocidas en el arte. Preferiblemente, la desinmunización de proteínas puede ensayarse *in vitro* mediante el ensayo de proliferación de células T. En este ensayo se examinan las PBMC de donantes que representan más del 80% de los alelos HLA-DR en el mundo para detectar la proliferación en respuesta a péptidos de tipo salvaje o desinmunizados. Idealmente, la proliferación celular sólo se detecta al cargar las células presentadoras de antígeno con péptidos de tipo salvaje. Los ensayos adicionales para la desinmunización incluyen ensayos de reestimulación de PBMC *in vitro* en humanos (por ejemplo, interferón gamma (TH1) o ELISA de IL4 (TH2)). Alternativamente, se puede probar la desinmunización expresando los tetrámeros HLA-DR que representan todos los haplotipos. Los péptidos inmunizados se presentan en HLA-DR haplotipos, se puede medir la unión de péptidos marcados con fluorescencia en PBMC
- 15 medición de ratones transgénicos HLA Clase I y Clase II para respuestas al antígeno diana (por ejemplo, interferón gamma o IL4) Alternativamente, con células T educadas (MHCI 9mérico, MHCII 20mérico) a partir de ensayos PBMC y/o de ratón transgénico. Además, se puede demostrar la desinmunización determinando si se han generado anticuerpos contra las moléculas desinmunizadas después de la administración en pacientes.

- 25 En un aspecto, la presente invención describe la utilización de métodos de ingeniería de proteínas para desarrollar variantes de Fc optimizadas con codón de mutación silenciosa con una expresión mejorada en células eucariotas. Una mutación silenciosa es aquella en la que la variación de la secuencia de ADN no da lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. En un aspecto, la mutagénesis de codones se realiza en la región constante para la optimización de la expresión de células eucarióticas. Una variante de Fc optimizada con codones con propiedades de expresión mejoradas, pero que conserva la capacidad para mediar las funciones efectoras, mejora la producción de anticuerpos terapéuticos. En este aspecto, por ejemplo, puede desarrollarse una región constante de una molécula de anticuerpo para el cribado en diferentes huéspedes de expresión, por ejemplo, selección de expresión de líneas celulares de mamífero utilizando CHO, HEK293 y COS-7.
- 30

#### Evolución completa de la inserción posicional

- 35 En una realización, la descripción proporciona métodos para identificar y mapear polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un anticuerpo molde. Usando un péptido lineal como un ejemplo simple, en una primera etapa, un conjunto de variantes de aminoácidos naturales (o un subconjunto de las mismas, o derivados de aminoácidos) para cada codón de la posición 2 a n (n correspondiente al número de residuos en la cadena polipeptídica) se genera mediante un proceso al que se hace referencia aquí como evolución de Inserción Posicional Completa (CPI™).

- 40 En CPI™, se inserta un aminoácido después de cada aminoácido a lo largo de un polipéptido molde uno a la vez para generar un conjunto de polipéptidos alargados. La CPI se puede utilizar para insertar 1, 2, 3, 4 o hasta 5 nuevos sitios a la vez. Cada uno de los 20 aminoácidos se añade en cada nueva posición, uno a la vez, creando un conjunto de 20 moléculas diferentes en cada nueva posición añadida en el molde. En este caso, se omite la posición 1, que es metionina e invariante. Este procedimiento se repite para cada cadena polipeptídica de la molécula diana. Un conjunto mínimo de mutaciones de aminoácidos contiene sólo un codón para cada uno de los 20 aminoácidos naturales.

- 45 La presente invención se refiere a métodos para identificar y mapear polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un polipéptido molde. Típicamente, el polipéptido comprenderá n residuos de aminoácidos, en el que el método comprende (a) generar  $n+[20 \times (n-1)]$  polipéptidos separados, en donde cada polipéptido difiere del polipéptido molde en que se ha insertado después de cada posición en el molde de cada uno de los 20 aminoácidos uno a la vez; ensayar cada polipéptido para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; y (b) para cada miembro que identifica cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido molde.

- 50 En una realización, una o más regiones se seleccionan para mutagénesis para añadir una posición a la vez como se ha descrito anteriormente. En tal caso, n representa un subconjunto o región del polipéptido molde. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo, el anticuerpo completo o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo se someten a mutagénesis para añadir una posición a la vez en el polipéptido molde después de cada posición.

- 55 La invención incluye así métodos de mapeo de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo



molde que tiene seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR), comprendiendo las CDR n residuos de aminoácidos, comprendiendo el método (a) generar  $n+20 \times (n-1)$  anticuerpos separados, en los que cada anticuerpo difiere del anticuerpo molde en el que ha insertado una única posición predeterminada, una a la vez, después de cada posición en la secuencia molde; (b) ensayar cada conjunto para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; y (c) para cada miembro que identifica cualquier cambio en una propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido molde. Para anticuerpos, la propiedad, característica o propiedad predeterminada puede ser afinidad de enlace y/o inmunogenicidad, por ejemplo.

Además, se proporcionan procedimientos para producir un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo molde que tiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR), comprendiendo la CDR n residuos de aminoácidos, comprendiendo el método: (a) generar  $n+20 \times (n-1)$  anticuerpos separados, en los que cada anticuerpo difiere del anticuerpo molde en el sentido de que tiene un aminoácido extra añadido en una única posición predeterminada del CDR. En otra realización, el anticuerpo comprende seis CDR, y juntas las CDR comprenden n residuos de aminoácidos.

En otra realización, los nuevos polipéptidos alargados descritos anteriormente se mutan y mapean adicionalmente después de la selección para identificar un cambio en una propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido acortado. Típicamente, el polipéptido alargado comprenderá n residuos de aminoácidos, en el que el método comprende (a) generar n (n-1 en el caso en el que el residuo inicial es metionina) conjuntos separados de polipéptidos, cada conjunto que comprende polipéptidos miembros que tienen X número de residuos de aminoácidos predeterminados en una única posición predeterminada del polipéptido; en el que cada conjunto de polipéptidos difiere en la única posición predeterminada; ensayar cada conjunto para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; (b) para cada miembro que identifica cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido molde; y opcionalmente (c) crear un mapa funcional que refleje dichos cambios. Preferiblemente, el número de polipéptidos miembros diferentes generados es equivalente a  $n \times X$  (o  $[n-1] \times X$ , según sea el caso).

En la alternativa, el método comprende generar una población única que comprende los conjuntos de polipéptidos mutados de los polipéptidos alargados. En esta realización, se criba la población nueva entera, se identifican los miembros individuales y se genera el mapa funcional.

Típicamente, cuando se usa cada aminoácido natural, X será 19 (representando los 20 restos de aminoácidos naturales y excluyendo el residuo particular presente en una posición dada del polipéptido molde). Sin embargo, cualquier subconjunto de aminoácidos puede ser utilizado en todas partes, y cada conjunto de polipéptidos puede estar sustituido con todo o un subconjunto del X total usado para toda la población.

Sin embargo, se reconoce que cada sistema de expresión puede sufrir un sesgo de codones, en el que grupos de ARNt insuficientes pueden conducir a la interrupción de la traducción, terminación prematura de la traducción, desplazamiento de marcos de traducción e incorporación errónea de aminoácidos. Por lo tanto, para la optimización de la expresión cada conjunto contiene hasta 63 codones diferentes.

Cada conjunto de aminoácidos es entonces cribado para al menos una, y preferiblemente dos o más características deseables tales como una función mejorada; mutaciones neutrales, mutaciones inhibitorias y expresión.

En un aspecto, los polipéptidos alargados se pueden correlacionar para identificar un cambio en una propiedad, característica o actividad que da como resultado los polipéptidos acortados en relación con el "tipo salvaje". Los datos para cada conjunto se combinan para todo el polipéptido, o "molécula diana". Los golpes procedentes del cribado de los polipéptidos alargados (moléculas diana) pueden utilizarse entonces para cadenas de mutagénesis completas adicionales y cribado tal como se describe en el presente documento. Los datos de la mutagénesis proporcionan un mapa funcional detallado (denominado en el presente documento como un EvoMap™) de la molécula diana que se genera. Este mapa contiene información detallada de cómo cada mutación afecta el rendimiento/expresión de la molécula diana. Permite la identificación de todos los sitios donde no se pueden realizar cambios sin una pérdida en la función de la proteína (o la unión del antígeno/receptor en caso de anticuerpos). También muestra dónde se pueden hacer cambios sin afectar la función.

En otro aspecto, el CPE se puede usar para generar una biblioteca de 5, 10, hasta 15 o hasta 19 aminoácidos en cada posición de interés.

Evolución completa de la eliminación de posición

La evolución completa de la eliminación posicional (CPD™) se refiere a métodos para identificar y mapear polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un polipéptido molde. La evolución del CPD elimina cada aminoácido a lo largo de la proteína una posición a la vez. Típicamente, el polipéptido comprenderá n residuos de aminoácidos, en donde el método comprende (a) generar n-1 (n-2 en el caso donde el residuo inicial es metionina) polipéptidos separados, en donde cada polipéptido difiere del polipéptido molde en que carece de una única posición

predeterminada; ensayar cada polipéptido para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; y (b) para cada miembro que identifica cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido molde.

5 En una realización de la evolución de CPD, se seleccionan una o más regiones para mutagénesis para eliminar una posición a la vez. En tal caso,  $n$  representa un subconjunto o región del polipéptido molde. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo, el anticuerpo entero o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo se someten a mutagénesis para eliminar una posición a la vez en el polipéptido molde.

10 En una realización, el CPD incluye así métodos de asignación de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo molde que tiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR), comprendiendo las CDR  $n$  residuos de aminoácidos, comprendiendo el método (a) generar  $(n-1)$  anticuerpos separados, en los que cada anticuerpo difiere del anticuerpo molde en el que carece de una única posición predeterminada; (b) ensayar cada conjunto para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; y (c) para cada miembro que identifica cualquier cambio en una propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido molde. Para anticuerpos, la propiedad, característica o propiedad predeterminada puede ser afinidad de enlace y/o inmunogenicidad, por ejemplo.

15 Un aspecto de la evolución del CPD incluye métodos para producir un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo molde que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR), comprendiendo la CDR  $n$  residuos de aminoácidos, el método que comprende: (a) generar  $n-1$  anticuerpos separados, en el que cada anticuerpo difiere del anticuerpo molde en el que carece de una única posición predeterminada de la CDR. En otra realización, el anticuerpo comprende seis CDR, y juntas las CDR comprenden  $n$  residuos de aminoácidos.

20 En otra realización de la evolución del CPD, los nuevos polipéptidos acortados descritos anteriormente mutan y se mapean adicionalmente después del cribado para identificar un cambio en una propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido acortado. Típicamente, el polipéptido acortado comprenderá  $n$  residuos de aminoácidos, en donde el método comprende (a) generar  $n$  ( $n-1$  en el caso en que el residuo inicial es metionina) conjuntos separados de polipéptidos, cada conjunto que comprende polipéptidos miembros que tienen  $X$  número de residuos de aminoácidos predeterminados en una única posición predeterminada del polipéptido; en el que cada conjunto de polipéptidos difiere en la única posición predeterminada; ensayar cada conjunto para al menos una propiedad, característica o actividad predeterminada; (b) para cada miembro que identifica cualquier cambio en dicha propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido molde; y (c) crear un mapa funcional que refleje dichos cambios. Preferiblemente, el número de polipéptidos miembros diferentes generados es equivalente a  $n \times X$  (o  $[n-1] \times X$ , según sea el caso).

25 En la alternativa, el método CPD comprende generar una población única que comprende los conjuntos de polipéptidos mutados de los polipéptidos acortados. En esta realización, se criba la población nueva entera, se identifican los miembros individuales y se genera el mapa funcional. Típicamente, cuando se usa cada aminoácido natural,  $X$  será 19 (representando los 20 residuos de aminoácidos naturales y excluyendo el residuo particular presente en una posición dada del polipéptido molde). Sin embargo, cualquier subconjunto de aminoácidos puede ser utilizado en todas partes, y cada conjunto de polipéptidos puede estar sustituido con todo o un subconjunto del total  $X$  usado para toda la población.

30 Cualquier medio mutacional o sintético puede usarse para generar el conjunto de mutantes en la evolución del CPD. En una realización, la generación de polipéptidos comprende (i) someter un polinucleótido que contiene codones para el polipéptido molde a amplificación basada en polimerasa usando un oligonucleótido degenerado de 64 veces para cada codón que va a ser mutagenizado, en el que cada uno de los 64 oligonucleótidos está compuesto por una primera secuencia homóloga y una secuencia triplete N,N,N degenerada, de manera que se genere un conjunto de polinucleótidos progenitores; y (ii) someter el conjunto de polinucleótidos de progenie a amplificación clonal de manera que se expresen los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de la progenie.

35 En una realización de la evolución del CPD, todo el polipéptido acortado se somete a mutagénesis de saturación. En otra realización, se seleccionan una o más regiones para mutagénesis por saturación. En tal caso,  $n$  representa un subconjunto o región del polipéptido molde. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo, el anticuerpo completo o una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo se someten a mutagénesis de saturación.

40 La divulgación de evolución de CPD incluye así métodos de mapeo de un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo moldeado acortado que tiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR), comprendiendo las CDR  $n$  residuos de aminoácidos, comprendiendo el método (a) generar  $n$  conjuntos separados de anticuerpos, comprendiendo cada conjunto anticuerpos miembros con un número  $X$  de diferentes residuos de aminoácidos predeterminados en una única posición predeterminada de la CDR; en el que cada conjunto de anticuerpos difiere en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos de miembros diferentes generados es equivalente a  $n \times X$ ; (b) ensayar cada conjunto para al menos una propiedad, característica o actividad

predeterminada; (c) para cada miembro que identifica cualquier cambio en una propiedad, característica o actividad relativa al polipéptido molde; y (d) crear un mapa de posición estructural de tales cambios. Para anticuerpos, la propiedad predeterminada, característica o propiedad puede ser afinidad de unión y/o inmunogenicidad. Como se ha expuesto anteriormente, en la alternativa se puede generar una población única que comprende todos los conjuntos de anticuerpos mutados.

Además, se proporcionan métodos para producir un conjunto de anticuerpos mutantes formados a partir de un anticuerpo moldeado acortado que tiene seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRx), comprendiendo la CDR n residuos de aminoácidos, comprendiendo el método: (a) generar n conjuntos separados de anticuerpos, comprendiendo cada conjunto anticuerpos miembros que tienen X número de diferentes residuos de aminoácidos predeterminados en una única posición predeterminada de la CDR; en el que cada conjunto de anticuerpos difiere en la única posición predeterminada; y el número de anticuerpos de miembros diferentes generados es equivalente a  $n \times X$ . En otra realización, el anticuerpo comprende seis CDR, y juntas las CDR comprenden n residuos de aminoácidos.

#### Síntesis Combinatoria de Proteínas

La Síntesis Combinatoria de Proteínas (CPS™) implica combinar aciertos individuales de cualquier técnica evolutiva para combinar dos o más mutaciones.

#### Moléculas de ácido nucleico

Utilizando la información proporcionada en el presente documento, tal como las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos contiguas de CDR del anticuerpo molde o fragmentos especificados, variantes o secuencias de consenso del mismo, o un vector depositado que comprende estas secuencias, se puede obtener al menos una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica al menos un anticuerpo de antígeno, utilizando métodos descritos en el presente documento o como se conoce en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNhc, ARNt o cualquier otra forma, o en forma de ADN, incluyendo, pero sin limitarse a, ADNc y ADN genómico obtenido por clonación o producción sintética, o cualquier combinación de los mismos. El ADN puede ser de cadena triple, de doble hebra o de cadena sencilla, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el ADN es de cadena doble. Cualquier parte de al menos una cadena del ADN o ARN puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena sentido, o puede ser la cadena no codificante, también denominada cadena antisentido.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención pueden incluir moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF), opcionalmente con uno o más intrones, por ejemplo, pero no limitados a, tres CDR, incluyendo CDR1, CDR2 y CDR3 de al menos una cadena pesada o cadena ligera; moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia codificadora de un anticuerpo matriz o región variable y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una variante del anticuerpo molde. Por supuesto, el código genético es bien conocido en la técnica. Por lo tanto, sería rutinario para un experto en la técnica generar dichas variantes de ácido nucleico degeneradas que codifican anticuerpos antiantígeno específicos, por ejemplo, humanizados de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, et al., supra, y tales variantes de ácido nucleico se incluyen en la presente invención. Ejemplos no limitativos de moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención incluyen fragmentos de ácido nucleico que codifican, respectivamente, las regiones CDR1, HC CDR2, HC CDR3, CDR1 LC, CDR2 LC, CDR3 LC, región variable HC y regiones variables LC.

Como se indica aquí, las moléculas de ácido nucleico preparadas por los métodos de la descripción que comprenden un ácido nucleico que codifica una variante de un anticuerpo molde pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas que codifican la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo, por la secuencia de codificación para el anticuerpo entero o una parte de la misma, la secuencia codificante para un anticuerpo, fragmento o porción, así como secuencias adicionales, tales como la secuencia codificadora de al menos un líder de señal o péptido de fusión, con o sin las secuencias de codificación adicionales mencionadas anteriormente, tales como al menos un intrón, junto con secuencias adicionales no codificantes, incluyendo, pero sin limitarse a, secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como las secuencias transcritas no traducidas que juegan un papel en la transcripción, procesamiento de ARNm, incluyendo señales de empalme y poliadenilación (por ejemplo, unión a ribosomas y estabilidad de ARNm); una secuencia de codificación adicional que codifica aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales. De este modo, la secuencia que codifica un anticuerpo puede fusionarse a una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo fusionado que comprende un fragmento o porción de anticuerpo.

Polinucleótidos que se hibridan selectivamente a un polinucleótido como se describe en este documento

La presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que se hibridan en condiciones de hibridación selectiva

con un polinucleótido descrito en el presente documento. De este modo, los polinucleótidos de esta realización pueden utilizarse para aislar, detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden dichos polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para identificar, aislar o amplificar clones parciales o completos en una biblioteca depositada. En algunas realizaciones, los polinucleótidos son secuencias genómicas o de ADNc aisladas, o complementarias de otro modo, a un ADNc de una biblioteca de ácido nucleico humano o de mamífero.

Preferiblemente, la biblioteca de ADNc comprende al menos un 80% de secuencias de longitud completa, preferiblemente al menos un 85% o un 90% de secuencias de longitud completa, y más preferiblemente al menos un 95% de secuencias de longitud completa. Las bibliotecas de cADN pueden normalizarse para aumentar la representación de secuencias raras. Las condiciones de hibridación de restricción baja o moderada se emplean típicamente, pero no exclusivamente, con secuencias que tienen una identidad de secuencia reducida con respecto a secuencias complementarias. Pueden emplearse opcionalmente condiciones moderadas y de alta severidad para secuencias de mayor identidad. Las condiciones de baja restricción permiten la hibridación selectiva de secuencias que tienen aproximadamente 70% de identidad de secuencia y pueden emplearse para identificar secuencias ortólogas o parálogas.

Los métodos anteriores de bibliotecas de proteínas diseñadas incluyen la técnica de mutagénesis de ensamblaje de genes. Se pueden ensamblar genes y plásmidos completos a partir de oligodesoxirribonucleótidos (oligos) sintéticos, relativamente cortos, mediante la extensión de ADN polimerasa. La mutagénesis de ensamblaje de gen logra una población de variantes génicas ensambladas a partir de oligonucleótidos de cadena sencilla cortos que codifican ambas cadenas del gen y que contienen bases degeneradas en las posiciones seleccionadas. Después de la PCR de ensamblaje, las variantes genéticas de longitud completa se amplifican utilizando cebadores externos. El método de mutagénesis de ensamblaje tiene una limitación técnica de introducir mutaciones no dirigidas a una tasa elevada con respecto a la PCR rutinaria. Aunque la diversidad extra puede ser una ventaja, puede ser necesario aumentar el tamaño de la biblioteca para asegurar una representación completa de todas las posibles secuencias deseadas. Véase, por ejemplo, Bassette et al., 2003, Construction of Designed Protein Libraries Using Gene Mutagenesis Assembly. Dirigido Evolution Library Creación, Métodos y protocolos. Editado por Frances H. Arnold y George Georgiou, *Methods in Molecular Biology*, 231, 29-37.

Opcionalmente, los polinucleótidos de esta invención codificarán al menos una porción de un anticuerpo codificado por los polinucleótidos descritos en el presente documento. Los polinucleótidos de esta invención abarcan secuencias de ácido nucleico que pueden emplearse para la hibridación selectiva con un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, supra; Colligan, supra, cada una de las cuales se incorpora completamente aquí como referencia.

#### Construcción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden hacerse usando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación, o combinaciones de los mismos, como es bien conocido en el arte.

Los ácidos nucleicos pueden comprender convenientemente secuencias además de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, un sitio de multiclonación que comprende uno o más sitios de restricción de endonucleasa puede insertarse en el ácido nucleico para ayudar en el aislamiento del polinucleótido. También, se pueden insertar secuencias traducibles para ayudar en el aislamiento del polinucleótido traducido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexa-histidina proporciona un medio conveniente para purificar las proteínas de la presente invención. El ácido nucleico de la presente invención -excluyendo la secuencia codificadora- es opcionalmente un vector, adaptador o enlazador para la clonación y/o expresión de un polinucleótido de la presente invención.

Se pueden añadir secuencias adicionales a tales secuencias de clonación y/o expresión para optimizar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar en el aislamiento del polinucleótido, o para mejorar la introducción del polinucleótido en una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores y enlazadores es bien conocido en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, supra, o Sambrook, supra).

#### Métodos recombinantes para la construcción de ácidos nucleicos

Las composiciones de ácido nucleico aisladas de esta invención, tales como ARN, ADNc, ADN genómico, o cualquier combinación de los mismos, pueden obtenerse a partir de fuentes biológicas utilizando cualquier número de metodologías de clonación conocidas por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se utilizan sondas de oligonucleótidos que hibridan selectivamente, en condiciones rigurosas, con los polinucleótidos de la presente invención para identificar la secuencia deseada en una biblioteca de ADNc o ADN genómico. El aislamiento de ARN, y la construcción de ADNc y bibliotecas genómicas, es bien conocido por los expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, supra, o Sambrook, supra).

## Métodos de detección y aislamiento de ácidos nucleicos

Una biblioteca de ADNc o genómica se puede cribar usando una sonda basada en la secuencia de un polinucleótido de la presente invención, tal como los descritos aquí. Las sondas pueden usarse para hibridarse con secuencias de ADN genómico o cADN para aislar genes homólogos en el mismo organismo o en organismos diferentes. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden emplear diversos grados de rigurosidad de hibridación en el ensayo; y la hibridación o el medio de lavado pueden ser estrictos. A medida que las condiciones para la hibridación se hacen más estrictas, debe existir un mayor grado de complementariedad entre la sonda y el objetivo para que se produzca la formación de dúplex. El grado de rigurosidad puede ser controlado por uno o más de temperatura, fuerza iónica, pH y la presencia de un disolvente parcialmente desnaturalizante tal como formamida. Por ejemplo, la rigurosidad de la hibridación se varía convenientemente cambiando la polaridad de la solución reaccionante a través, por ejemplo, de la manipulación de la concentración de formamida dentro del intervalo de 0% a 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) requerido para la unión detectable variará de acuerdo con la rigurosidad del medio de hibridación y/o medio de lavado. El grado de complementariedad será óptimamente del 100%, o del 70-100%, o cualquier intervalo o valor en el mismo. Sin embargo, debe entenderse que las variaciones menores de secuencia en las sondas y cebadores pueden compensarse reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación y/o lavado.

Los métodos de amplificación de ARN o ADN son bien conocidos en la técnica y pueden usarse de acuerdo con la presente invención sin experimentación excesiva, basándose en la enseñanza y la orientación presentadas en el presente documento.

Los procedimientos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y procesos de amplificación relacionados (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos números 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, de Mullis et al.; 4,795,699 y 4,921,794 de Tabor et al., 5,142,033 de Innis, 5,122,464 de Wilson y otros 5,091,310 de Innis, 5,066,584 de Gyllensten y otros, 4,889,818 de Gelfand y otros, 4,994,370 de Silver y otros, 4,766,067 de Biswas; 4,656,134 a Ringold) y amplificación mediada por ARN que usa ARN antisentido a la secuencia diana como molde para la síntesis de ADN de doble hebra (Patente US No. 5,130,238 de Malek, et al., con el nombre comercial NASBA), todo el contenido de los cuales las referencias se incorporan aquí por referencia. (Véase, por ejemplo, Ausubel, supra, o Sambrook, supra).

Por ejemplo, la tecnología de reacción en cadena de polimerasa (PCR) puede usarse para amplificar las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y genes relacionados directamente a partir de bibliotecas de ADN genómico o de ADNc. La PCR y otros métodos de amplificación in vitro también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácidos nucleicos que codifican para proteínas que se van a expresar, para hacer que los ácidos nucleicos se utilicen como sondas para detectar la presencia del mRNA deseado en muestras, para secuenciación de ácidos nucleicos o para otros fines. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a personas de habilidad mediante métodos de amplificación in vitro se encuentran en Berger, supra, Sambrook, supra, y Ausubel, supra, así como en Mullis, et al., Pat. N° 4,683,202 (1987); e Innis, et al., Protocolos PCR Una Guía para Métodos y Aplicaciones, Eds., Academic Press Inc., San Diego, California (1990). Los kits comercialmente disponibles para la amplificación genómica por PCR son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Adicionalmente, por ejemplo, puede usarse la proteína del gen T4 32 (Boehringer Mannheim) para mejorar el rendimiento de productos de PCR largos.

## Métodos sintéticos para la construcción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención también pueden prepararse a través de síntesis química directa mediante métodos conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel y col., supra). La síntesis química generalmente produce un oligonucleótido de cadena sencilla, que puede convertirse en ADN de doble hebra por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con un ADN polimerasa utilizando la hebra simple como molde. Un experto en la técnica reconocerá que mientras que la síntesis química de ADN puede limitarse a secuencias de aproximadamente 100 o más bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

## Casetes de expresión recombinante

La presente invención proporciona además casetes de expresión recombinante que comprenden un ácido nucleico de la presente invención. Se puede usar una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, por ejemplo un ADNc o una secuencia genómica que codifica un anticuerpo de la presente invención, para construir un casete de expresión recombinante que se puede introducir en al menos una célula huésped deseada. Un casete de expresión recombinante comprenderá típicamente un polinucleótido de la presente invención operativamente unido a secuencias reguladoras de iniciación transcripcional que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula huésped pretendida. Pueden emplearse tanto promotores heterólogos como no heterólogos (es decir, endógenos) para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos de la presente invención.

5 En algunas realizaciones, se pueden introducir ácidos nucleicos aislados que sirven como promotores, potenciadores u otros elementos en la posición apropiada (aguas arriba, corriente abajo o intrón) de una forma no heteróloga de un polinucleótido de la presente invención, de manera que para aumentar o disminuir la expresión de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, los promotores endógenos pueden ser alterados in vivo o in vitro por mutación, eliminación y/o sustitución.

Las bibliotecas que codifican fragmentos de marco de dsADN que codifican para la totalidad o una parte de las regiones HC FW1, HC FW2, HC FW3, LC FW1, LC FW2 y LC FW3 se seleccionan de un conjunto de marco humano seleccionado sólo a partir de anticuerpos expresados funcionalmente de secuencias de líneas germinales humanas. El conjunto de marco humano se selecciona para la máxima diversidad de secuencias.

10 El procedimiento de la descripción comprende además la etapa de ensamblar a partir de las bibliotecas de fragmentos HC por ligación en fase líquida escalonada de fragmentos de codificación FW de cadena pesada y fragmentos que codifican CDR en el orden de: FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3 para producir una biblioteca de codificación de dominio variable de HC humanizado.

15 El método de la descripción comprende además la etapa de ensamblar a partir de las bibliotecas de fragmentos LC por ligación en fase líquida por etapas, fragmentos de codificación FW de cadena ligera y fragmentos que codifican CDR en el orden de: FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3 para producir una biblioteca de codificación de dominio variable LC humanizado.

20 Se puede emplear la síntesis en fase líquida de bibliotecas humanizadas de dominio variable combinatorio para la cadena ligera y la cadena pesada. El ensamblaje de una biblioteca de dominio variable de cadena ligera humanizada (LC), por ejemplo, contiene marcos de cadenas ligeras humanas (FW) y regiones no determinantes de complementariedad (CDR) no humanas. La biblioteca se ensambla, por ejemplo, usando ligación en fase líquida por pasos de FW y fragmentos de ADN de CDR. Las bibliotecas se ensamblan utilizando ligación por etapas en fase líquida de FW y fragmentos de ADN de CDR en el orden de FW1-CDR1-FW2-CDR2-FW3-CDR3 por técnicas conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, mediante las técnicas de una o más de las siguientes referencias, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia. Lo, B.K., 2003, Antibody humanization by CDR grafting. Antibody Engineering, Methods and protocols. Edit by Benny K. C. Lo, Methods in Molecular Biology, 248, 135-159; Kashmiri et al., 2003, Developing a minimally immunogenic humanized antibody by SDR grafting. Antibody Engineering, Methods and protocols. Edit by Benny K. C. Lo, Methods in Molecular Biology, 248, 361-376; Bassette, P. H., et al., 2003, Construction of Designed Protein Libraries Using Gene Assembly Mutagenesis. Directed Evolution Library Creation, Methods and protocols. Edit. Arnold and Georgiou, Methods in Molecular Biology, 231, 29-37; Chames, P., et al., 2001, Selections on Biotinylated antigens. Antibody Engineering, Edit by R. Kontermann and S. Dubel, Springer Lab Manual, 149-166; O'Brien S., and Jones, T., 2001, Humanising antibodies by CDR grafting. Antibody Engineering, Edit by R. Kontermann and S. Dubel, Springer Lab Manual, 567-590. El montaje de fragmentos se describe adicionalmente en detalle en el presente documento.

35 Como se ha indicado, la invención se refiere también a un método para producir anticuerpos humanizados de longitud completa, que comprenden CDR derivadas de un anticuerpo molde y regiones de armazón a partir de un conjunto de marco humano con marcos sólo de anticuerpos expresados funcionalmente. El conjunto de estructuras humanas se selecciona para proporcionar la máxima diversidad de secuencia del marco. Tales anticuerpos humanizados pueden incluir una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos, ya sea a partir de mutaciones naturales o manipulación humana, como se especifica en el presente documento. Preferiblemente, dichos anticuerpos pueden unirse al antígeno con alta afinidad (por ejemplo,  $K_D$  menor o igual a aproximadamente  $10^{-9}$  M). Las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente las mismas que las secuencias descritas aquí incluyen secuencias que comprenden sustituciones conservativas de aminoácidos, así como eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos. Una sustitución conservadora de aminoácidos se refiere a la sustitución de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, hidrofobicidad/hidrofiliidad) que son similares a las del primer aminoácido. Las sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un aminoácido por otro dentro de los siguientes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), K, R, H, D y E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G); F, W e Y; C, S y T.

Por supuesto, el número de sustituciones de aminoácidos que haría un experto en la técnica depende de muchos factores, incluyendo los descritos anteriormente. En general, el número de sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos para cualquier anticuerpo, fragmento o variante humanizado dado no será superior a 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, tal como 1-30 o cualquier intervalo o valor en el mismo, como se especifica aquí.

Los aminoácidos en un anticuerpo antiantígeno de la presente invención que son esenciales para la función pueden ser identificados por métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por escaneo de alanina (por ejemplo, Ausubel, supra, Capítulos 8, 15; Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Este

5 último procedimiento introduce mutaciones en alaninas individuales en cada residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se someten entonces a prueba para determinar su actividad biológica, tal como, pero no se limitan a, al menos, una actividad neutralizante del antígeno. Los sitios que son críticos para la unión a anticuerpos también pueden identificarse mediante análisis estructural tales como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcaje por fotoafinidad (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992) y de Vos, et al, Science 255: 306-312 (1992)).

El método de la descripción también comprende la etapa de clonar la biblioteca de dominio variable de cadena pesada humanizada ensamblada y la biblioteca de dominio variable de cadena ligera ensamblada en un vector de expresión para crear una biblioteca de humanización. El vector de expresión también comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región de armazón. La biblioteca de humanización se transfecta en células.

## 10 Vectores y células anfitrionas

15 La presente invención también se refiere a vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, células huésped que se manipulan genéticamente con los vectores recombinantes y la producción de al menos un anticuerpo humanizado mediante técnicas recombinantes, como es bien conocido en el arte. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., supra; Ausubel, et al., supra, cada una de las cuales se incorpora completamente aquí como referencia.

Los polinucleótidos pueden unirse opcionalmente a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, se introduce un vector de plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse in vitro usando una línea celular de empaquetamiento apropiada y después transducirse en células huésped.

20 El inserto de ADN debe estar operativamente unido a un promotor apropiado. Los constructos de expresión contendrán además sitios para la iniciación, terminación de la transcripción, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción de codificación de los transcritos maduros expresada por las construcciones incluirá preferiblemente una traducción que se inicie al principio y un codón de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) adecuadamente posicionado al final del ARNm que se va a traducir, prefiriéndose UAA y UAG para la expresión en células de mamíferos o eucariotas.

25 Los vectores de expresión incluirán preferible, pero opcionalmente, al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR, Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017, ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico o glutamina sintetasa (GS, Patentes US 5,122,464, 5,770,359, 5,827,739) para el cultivo de células eucarióticas y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para cultivo en E. coli y otras bacterias o procarióticas (las patentes anteriores se incorporan por entero por referencia). Se conocen en la técnica medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente. Los vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica. La introducción de un constructo de vector en una célula huésped puede efectuarse mediante transfección de fosfato cálcico mediada por DEAE-dextrano transfección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Tales métodos se describen en la técnica, tales como Sambrook, supra, capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, supra, capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

## Clonación y expresión de anticuerpos humanizados en células de mamíferos

40 Un vector de expresión típico de mamífero contiene al menos un elemento promotor, que media la iniciación de la transcripción del ARNm, la secuencia codificadora del anticuerpo y las señales necesarias para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donante y aceptor para el empalme de ARN. Se puede lograr una transcripción altamente eficiente con los promotores tempranos y tardíos de SV40, las repeticiones terminales largas (LTRS) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV1, HIV1 y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden usarse elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humana). Los vectores de expresión 45 adecuados para uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN o pLNCX (Clonotech Labs, Palo Alto, CA), pADNc3.1 (+/-), PADNc/Zeo (+/-) o pADNc3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL y PMSG (Farmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109). Las células huésped de mamífero que podrían usarse incluyen células Hela 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV 1, células de codorniz QC1-3, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

Alternativamente, el gen puede expresarse en líneas celulares estables que contienen el gen integrado en un cromosoma. La cotransfección con un marcador seleccionable tal como dhfr, gpt, neomicina o higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas.

El gen transfectado también puede amplificarse para expresar grandes cantidades del anticuerpo codificado. El

marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que llevan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al., *Biochem. J.* 227:277-279 (1991), Bebbington et al., *Bio/Technology* 10:169-175 (1992). Usando estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen el gen amplificado(s) integrado(s) en un cromosoma. El ovario de hámster chino (CHO) y las células NSO se utilizan a menudo para la producción de anticuerpos.

#### Clonación y expresión en células CHO

En un aspecto, la región variable y constante aislada que codifica el ADN y el vector desfosforilado se ligan con T4 ADN ligasa. Las células azules de *E. coli* HB101 o XL-1 se transforman a continuación y se identifican bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC4 usando, por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

Por ejemplo, en un aspecto, se usan células de ovario de hámster chino (CHO) que carecen de un gen DHFR activo para la transfección. 5 µg del plásmido de expresión pC4 se cotransfectan con 0,5 µg del plásmido pSV2-neo usando lipofectina. El plásmido pSV2neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos incluyendo G418. Las células se sembraron en alfa-MEM suplementado con 1 µg/ml de G418. Después de 2 días, las células se tripsinizaron y se sembraron en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en Alfa-MEM suplementado con 10, 25 o 50 ng/ml de metotrexato más 1 µg/ml de G418. Después de aproximadamente 10-14 días, los clones individuales se tripsinizan y después se siembran en placas de Petri de 6 pocillos o matraces de 10 ml usando diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato se transfieren entonces a nuevas placas de 6 pocillos que contienen concentraciones aún más altas de metotrexato (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). Se repite el mismo procedimiento hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100-200 mM. La expresión del producto génico deseado se analiza, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y Transferencia Western, ELISA, o mediante análisis por HPLC de fase inversa.

Ejemplos ilustrativos de cultivos celulares útiles para la producción de los anticuerpos, porciones especificadas o variantes de los mismos, son células de mamífero. Los sistemas de células de mamíferos a menudo estarán en forma de monocapas de células, aunque también se pueden usar suspensiones o biorreactores de células de mamíferos. En la técnica se han desarrollado varias líneas de células huésped adecuadas capaces de expresar proteínas glicosiladas intactas. En un aspecto, las células se seleccionan de una línea de células huésped de producción de células eucariotas seleccionada de un miembro del grupo que consiste en células de fibroblastos de ratón 3T3; células de fibroblastos de hámster sirio BHK21; células epiteliales de perro MDCK; células epiteliales humanas Hela; células epiteliales de rata canguro PtK1; células plasmáticas de ratón SP2/0; y células de plasma de ratón NS0; células de riñón embrionario humano HEK 293; células de riñón de mono COS, incluyendo COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC CRL-1651); células de ovario de hámster chino CHO, CHO-S; células embrionarias de ratón R1; células embrionarias de ratón E14.1; células embrionarias humanas H1; células embrionarias humanas H9; células embrionarias humanas PER C.6; células de levadura de *S. cerevisiae*; y células de levadura *picchia*. En un aspecto específico, la línea celular huésped de producción de células eucariotas es CHO-S. En otro aspecto específico, la línea celular huésped de producción de células eucarióticas es HEK293. En un aspecto específico adicional, la línea celular huésped de producción de células eucariotas es CHOK1SV. En otro aspecto específico, la línea de células huésped de producción de células eucariotas es NSO.

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir una o más de las secuencias de control de expresión siguientes, tales como, pero sin limitación, un origen de replicación; un promotor (por ejemplo, promotores tardíos o tempranos de SV40, el promotor de CMV (Patentes de los Estados Unidos 5,168,062, 5,385,839), un promotor tk de HSV, un promotor de pgk (fosfoglicerato quinasa), un promotor alfa de EF-1 (U.S. Patente No. 5,266,491), al menos un promotor de inmunoglobulina humana; un potenciador y/o sitios de información de procesamiento, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación (por ejemplo, un sitio de adición de T Ag poli A de SV40) y secuencias terminadoras transcripcionales. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., supra; Sambrook et al., supra. Otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención son conocidas y/o están disponibles, por ejemplo, en la American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)) u otras fuentes conocidas o comerciales.

Cuando se emplean células huésped eucariotas, las secuencias de poliadenilación o terminación de la transcripción se incorporan típicamente en el vector. Un ejemplo de una secuencia terminadora es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona del crecimiento bovino. También se pueden incluir secuencias para el empalme exacto del transcrito. Un ejemplo de una secuencia de empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague, et al., *J. Virol.*, 45:773-781 (1983)). Adicionalmente, las secuencias génicas para controlar la replicación en la célula huésped pueden incorporarse al vector, como se conoce en la técnica.

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden expresarse en una célula huésped activando (mediante manipulación) en una célula huésped que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo de la presente invención. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. Nos.



5,580,734; 5,641,670; 5,733,746 y 5,733,761, incorporados completamente aquí como referencia.

El método de la descripción también comprende la etapa de expresar anticuerpos humanizados de longitud completa en las células para crear una biblioteca de anticuerpos humanizada. En un aspecto, la célula es un huésped de producción de células eucariotas con visualización de superficie de células de anticuerpo. En otro aspecto, una o ambas de las etapas de selección se realizan en el huésped de producción de células eucariotas.

#### Producción de un anticuerpo

Al menos un anticuerpo humanizado de la presente invención puede producirse opcionalmente mediante una línea celular, una línea celular mixta, una célula inmortalizada o una población clonal de células inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Harlow y Lane, *anticuerpos, Manual de Laboratorio*, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Colligan, et al., Eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley y Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), cada una de las cuales se incorpora por completo como referencia.

En un enfoque, se produce un hibridoma fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero sin limitarse a, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A), o similares, o heteromilomas, productos de fusión de los mismos o cualquier célula o célula de fusión derivada de la misma o cualquier otra línea celular adecuada como se conoce en la técnica. Ver, por ejemplo, [www.atcc.org](http://www.atcc.org), [www.lifetech.com](http://www.lifetech.com), y similares, con células productoras de anticuerpos, tales como, pero sin limitarse a, bazo aislado clonado, sangre periférica, linfa, amígdala u otras células inmunes o células B que contienen células, o cualesquiera otras células que expresan cadena constante o variable o secuencias de CDR o de cadena pesada o ligera, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como recombinante o endógeno, ADN, RNA, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN del cloroplasto, ARNhc, ARNm, ARNt, híbrido de cadena sencilla, doble o triple, hibridado, vírico, bacteriano, de alga, procariótico, de anfibio, de insecto, de reptil, pez, mamífero, roedor, equino, ovino, de cabra, de oveja, de primate, eucariota, y similares o cualquier combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, Ausubel, supra, y Colligan, *Immunology*, supra, capítulo 2, incorporados completamente aquí como referencia.

También se puede usar cualquier otra célula huésped adecuada para expresar ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, de la presente invención. Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes se pueden aislar utilizando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y se clonan mediante dilución limitativa o clasificación celular, u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden seleccionarse mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden preparar usando al menos un anticuerpo humanizado que codifica ácido nucleico para proporcionar animales transgénicos o mamíferos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas y similares, que producen tales anticuerpos en su leche. Tales animales se pueden proporcionar usando métodos conocidos. Véase, por ejemplo, pero no limitándose a, Patente de los Estados Unidos No. 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616, 5,565,362; 5,304,489, y similares, cada uno de los cuales se incorpora completamente aquí como referencia.

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse adicionalmente usando al menos un anticuerpo humanizado codificante de ácido nucleico para proporcionar plantas transgénicas y células de plantas cultivadas (por ejemplo, pero no limitadas a tabaco y maíz) que producen tales anticuerpos, porciones especificadas o variantes en las partes de planta o en células cultivadas a partir de la misma. Como ejemplo no limitativo, las hojas de tabaco transgénicas que expresan proteínas recombinantes se han utilizado con éxito para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. Véase, por ejemplo, Cramer et al., *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240:95-118 (1999) y las referencias citadas en la misma. También se ha utilizado maíz transgénico para expresar proteínas de mamífero a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas a partir de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147 (1999) y las referencias citadas en el mismo. También se han producido anticuerpos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas que incluyen fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos de cadena única (scFv), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 (1998) y las referencias citadas en el mismo. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención también se pueden producir usando plantas transgénicas, según métodos conocidos. Véase también, por ejemplo, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (octubre, 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); Whitelam et al., *Biochem Soc. Trans.* 22:940-944 (1994); y las referencias citadas en el mismo. Cada una de las referencias anteriores se incorpora completamente aquí como referencia.

## Purificación de un anticuerpo

Un anticuerpo humanizado puede ser recuperado y purificado a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos que incluyen, pero sin limitación, purificación de proteína A, purificación de proteína G, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. La cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") también puede emplearse para la purificación. Véase, por ejemplo, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, o *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley y Sons, NY, NY, (1997-2001), por ejemplo, capítulos 1, 4, 6, 8, 9 y 10, cada uno incorporado completamente aquí como referencia.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos sintéticos químicos y productos producidos por técnicas recombinantes de un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, células de levadura, células de plantas, insectos y mamíferos superiores. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede ser glicosilado o puede ser no glicosilado, preferiblemente glicosilado. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Sambrook, *supra*, Secciones 17.37-17.42; Ausubel, *supra*, Capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, *Protein Science*, *supra*, Capítulos 12-14, todos incorporados completamente aquí como referencia.

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse, por ejemplo, por ELISA, ELISPOT, citometría de flujo, inmunocitología, análisis Biacore®, ensayo de exclusión cinética Sapidne KinExA™, SDS-PAGE y transferencia Western, o por análisis HPLC, así como por una serie de otros ensayos funcionales descritos aquí.

El método de la divulgación también comprende la etapa de cribar la biblioteca de anticuerpos humanizada para determinar el nivel de expresión de los anticuerpos humanizados. El método de la descripción también comprende la etapa de explorar la biblioteca de anticuerpos humanizada para determinar la afinidad de los anticuerpos humanizados para el antígeno en comparación con la afinidad del anticuerpo molde contra el antígeno. En un aspecto, los anticuerpos purificados se seleccionan. En otro aspecto, el huésped de producción de células eucariotas es capaz de mostrar la superficie de las células del anticuerpo, y las etapas de selección se realizan en el hospedador de la producción de células eucariotas.

En aspectos específicos, las etapas de criba se seleccionan del grupo que consiste en ELISA cuantitativo; ELISA de afinidad; ELISPOT; citometría de flujo, inmunocitología, análisis de resonancia de plasmón de superficie Biacore®, ensayo de exclusión cinética Sapidne KinExA™; SDS-PAGE; Transferencia Western y análisis por HPLC así como por una serie de otros ensayos funcionales descritos en el presente documento.

En otros aspectos de la presente invención, la optimización de la expresión descendente en los huéspedes de fabricación se lleva a cabo desarrollando la región Fc del anticuerpo, codones silenciosos en el anticuerpo, y/o los genes de vector y/o anfitrón usados en la expresión de proteínas. En un aspecto, una biblioteca Fc se genera por cualquier técnica evolutiva. En un aspecto específico de la optimización de la expresión, el CPE se realiza sobre el dominio Fc de un anticuerpo para crear una biblioteca de mutantes Fc que puede usarse para seleccionar un socio óptimo para cualquier Fv. La optimización se diseña para la conexión rápida de todas las variantes de CPE de Fc a cada nueva región de Fv. Alternativamente, un subconjunto de estos Fcs se puede utilizar para atar a Fvs diferentes. Cada una de estas combinaciones de Fc CPE variante/Fv se selecciona como un anticuerpo de longitud completa expresado en células de mamífero (por ejemplo, CHO, medio de coste efectivo) para una expresión óptima. Además, se puede realizar CPS para examinar todas las permutaciones teóricas de hasta 12 o más de estos golpes CPE en células de mamífero para mejorar la expresión. También pueden seleccionarse cambios de codones deseables específicos para identificar clones con expresión aumentada. Se identifican codones silenciosos y se realiza CPE en estas posiciones. Esta biblioteca CPE se selecciona para identificar los golpes de expresión óptimos. Además, todas las permutaciones teóricas de hasta 12 o más golpes de CPE se pueden utilizar en el proceso CPS para generar una nueva biblioteca que se puede cribar en células de mamífero para mejorar la expresión. Los golpes de mutación silenciosa de CPS se utilizan para personalizar la proteína para una expresión óptima en una línea celular y un medio específico. Esto proporciona la oportunidad para el control biosimilar de la estructura fina.

Otras áreas para mejorar la expresión incluyen: optimización del vector, incluyendo promotor, sitios de empalme, terminales 5' y 3', secuencias flanqueantes, reducción de eliminación y reordenación de genes, mejora de las actividades del gen de la célula huésped, optimización de las enzimas glicosilantes del huésped, y mutagénesis y selección amplias de cromosomas de células huésped. Se ha demostrado que las secuencias de aminoácidos 5' son importantes para el aumento de la expresión.

## Ejemplos

Abreviaturas:

- BSA--seroalbúmina bovina
- EIA--inmunoensayo enzimático
- FBS--suero bovino fetal
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>--peróxido de hidrógeno
- 5 HRP--peroxidasa de rábano picante
- Ig--inmunoglobulina
- IL-6-Interleucina-6
- IP--intraperitoneal
- IV-Intravenoso
- 10 Mab--anticuerpo monoclonal
- OD--densidad óptica
- OPD—Dihidroclorhidrato de o-fenilendiamina
- PEG--polietilenglicol
- PSA--penicilina, estreptomicina, anfotericina
- 15 RT--temperatura ambiente
- SQ--subcutáneos
- v/v--volumen por volumen
- p/v--peso por volumen

**Ejemplo 1**

- 20 **Ejemplo 1.** Preparación de fragmentos de ADN de hebra doble de cadena pesada y cadena ligera.

Este protocolo describe la preparación de fragmentos de ADN de cadena doble (ds) que se usan para el ensamblaje de dominios variables de cadena pesada y cadena ligera [[SOP 2A]]. Los fragmentos de dsADN se preparan primero por hibridación de oligonucleótidos sintéticos (oligos). Los oligos son 5'- fosforilados para permitir que los fragmentos se ligen entre sí y dentro del vector de clonación.

- 25 Los reactivos, consumibles y equipos requeridos para este procedimiento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos, consumibles y equipo.

|  | Descripción                   | Proveedor aprobado | No. de catálogo |
|--|-------------------------------|--------------------|-----------------|
|  | Agarosa SeaKem LE             | Cambrex            | 50004           |
|  | Bromuro de etidio             | Sigma-Aldrich      | E1510           |
|  | Regulador TAE (10x) – 1000 ml | Ambion             | 9869            |
|  | Tris/HCl 1M, pH 8.0 - 100 ml  | Ambion             | 9855G           |
|  | KCl 2M - 100 ml               | Ambion             | 9640G           |

ES 2 609 439 T3

|  |  |                |               |
|--|--|----------------|---------------|
|  | DTT Forma de polvo                       | Fisher         | BP1725        |
|  | MgCl <sub>2</sub> 1M - 100 ml            | Ambion         | 9530G         |
|  | Nucleasa libre de agua – 5 x 100 ml      | Ambion         | 9939          |
|  | Aparato de gel de agarosa                | Bio-Rad        | 1707764       |
|  | Fuente de alimentación de gel de agarosa | Bio-Rad        | 1645050       |
|  | Gel de agarosa 4%                        | Ver Apéndice 1 | N/D           |
|  | Regulador de carga de gel de agarosa     | Invitrogen     | 10816-015     |
|  | 25 pares de bases (bp) Escalera de ADN   | Invitrogen     | 10597-011     |
|  | Microcentrífuga                          | Eppendorf      | 5417C         |
|  | Centrífuga de alta velocidad             | Beckman        | Avanti J-30I  |
|  | Rotor centrífugo de alta velocidad       | Beckman        |               |
|  | Termo-mezclador                          | Eppendorf      | 5350-0000-013 |
|  | Termociclador                            | MJ o Eppendorf |               |
|  | Tubos de PCR                             | VWR            | 53509-304     |
|  | Placa PCR de 96 pocillos                 | VWR            |               |

Se muestran las formulaciones de regulador requeridas.

Regulador TAE 50X

- 242 g de base de Tris
- 5 • 57,1 ml de ácido acético glacial
- 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O
- Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro

regulador TAE 1X

- 20 ml de regulador TAE 50X
- 10 • 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada

DTT 0,1 M

- 1,54 g de TDT
- 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- Almacenar a -20°C

- 15 • 80% de glicerol

## ES 2 609 439 T3

- 20 ml de glicerol
- 80 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- Esterilizar en autoclave

Gel de Agarosa al 4% con bromuro de etidio

- 5
- 4g LE agarosa
  - 100 ml de regulador TAE 1X
  - Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme
  - Enfriar la agarosa hasta 55°C
  - Añadir 2,5 µl de bromuro de etidio a 20 mg/ml a agarosa

- 10
- Verter sobre una plataforma de gel

Procedimientos.

- 15
- Los oligonucleótidos se ordenaron a partir de IDT (escala de 1 µmol, PAGE purificada, liofilizada y 5' fosforilada). Los oligos liofilizados se centrifugaron en microcentrífuga a 12.000 x g durante 30 segundos antes de abrir los tubos. Los oligos se resuspendieron en H<sub>2</sub>O libre de nucleasa a 100 pMol/µl de acuerdo con los datos obtenidos de IDT. Los oligonucleótidos suspendidos se incubaron a 37°C durante 30 minutos en un termomezclador a 1.000 RPM. Los oligonucleótidos resuspendidos se centrifugaron en microcentrífuga a 12.000 x g durante 30 segundos y se combinaron con 75 µl de cebadores directos e inversos correspondientes en tubos de PCR de pared delgada (o placas de PCR de 96 pocillos). Los oligonucleótidos se recoció en un termociclador usando el siguiente perfil de temperatura:

- 20
- 5' a 94°C → 5' a 90°C → 5' a 85°C → 5' a 80°C → 5' a 75°C → 5' a 70°C → 5' a 65°C → 5' a 60°C → 5' a 55°C → 5' a 50°C → 5' a 45°C → 5' a 40°C → 5' a 35°C → 5' a 30°C

La concentración final para la concentración del fragmento de DNA recocido fue 50 pMol/µl. Los fragmentos de ADN recocidos se almacenaron a -20°C.

- 25
- El análisis de control de calidad de fragmentos de dsADN (o agrupaciones de fragmentos), se realizó estableciendo las siguientes reacciones en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml:

|                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| Fragmentos de dsADN                  | 1 µl        |
| Agua                                 | 20 µl       |
| <u>Regulador de carga de muestra</u> | <u>1 µl</u> |
| Total                                | 22 µl       |

- 30
- Se cargaron diez µl de cada muestra en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio; se utilizó una escala de ADN de 25 pb como patrón. Los geles se hicieron funcionar a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

- 35
- Referencias estándar para los procedimientos incluyen Current Protocols in Molecular biology. Edited by Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. John Wiley & Sons Inc.; Whitehouse, A., Deeble, J., Parmar, R., Taylor, G. R., Markham, A. F., and Meredith, D. M., Analysis of the mismatch and insertion/deletion binding properties of *Thermus thermophilus*, HB8, MutS. Biochemical and Biophysical Research Communications 233, 834-837; Wang, J. and L. J. Directly fishing out subtle mutations in genomic DNA with histidine-tagged *Thermus thermophilus* MutS. Mutation Research 547 (2004) 41-47.

**Ejemplo 2.** Síntesis en fase líquida de bibliotecas combinatorias de dominios variables de cadena pesada.

- 40
- Este protocolo describe el ensamblaje de una biblioteca de dominio variable de cadena pesada humanizada (HC). La

## ES 2 609 439 T3

biblioteca contiene marcos de cadena pesada humana (FW) y regiones no determinantes de complementariedad (CDR) no humanas en el orden de: FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3. Hay un total de 7 fragmentos FW1, 5 FW2 y 8 FW3. La biblioteca se ensambla utilizando ligación en fase líquida por etapas de FW y fragmentos de ADN de CDR. Un tiempo típico de la terminación para este protocolo es cuatro días con la creación de cerca de cuatro bibliotecas de la cadena pesada por persona.

5

Tabla 2: Reactivos, consumibles y equipo

| Ítem # | Descripción  | Proveedor aprobado | No. de catálogo |
|--------|--|--------------------|-----------------|
| 1      | Tris/HCl 1M, pH 8.0 - 100 ml                                   | Ambion             | 9855G           |
| 2      | EDTA0.5 M, pH 8.0 – 100 ml                                     | Ambion             | 9260G           |
| 3      | NaCl 5 M - 500 ml  | Ambion             | 9759            |
| 4      | Tris básico  | Fisher             | BP154-1         |
| 5      | Acido acético glacial - 500 ml                                 | Fisher             | BP1185500       |
| 6      | Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O                         | Sigma-Aldrich      | E9884           |
| 7      | Nucleasa libre de agua - 1000 ml                               | Ambion             | 9932            |
| 8      | agarosa SeaKem LE  | Cambrex            | 50004           |
| 9      | Bromuro de etidio  | Sigma-Aldrich      | E1510           |
| 10     | Fuente de alimentación de gel de agarosa                       | Bio-Rad            | 1645050         |
| 11     | Aparato de gel de agarosa                                      | Bio-Rad            | 1707764         |
| 12     | Gel de agarosa 3% y al 4%                                      | Véase Apéndice 1   | N/D             |
| 13     | Regulador de carga de gel de agarosa                           | Invitrogen         | 10816-015       |
| 14     | Escalera de ADN1 kB plus                                       | Invitrogen         | 10787-026       |
| 15     | Microcentrífuga  | Eppendorf          | 5417C           |
| 16     | Termomezclador   | Eppendorf          | 5350-0000-013   |
| 17     | Agitadores de tubos Labquake                                   | VWR                | 56264-306       |
| 18     | Papel de aluminio  | En casa            | N/D             |
| 19     | Tubo estéril de polipropileno de fondo redondo Falcon de 14 ml | VWR                | 60819-761       |
| 20     | Tubo de microcentrífuga de 1,5 ml                              | ISC Bioexpress     | I5019-07        |
| 21     | Tiras de tubos de PCR con tapas                                | VWR                | 53509-304       |
| 22     | T4 ADN ligasa (20.000 unidades)                                | NewEngland Biolab  | M0202M          |
| 23     | rATP 10 mM   | Promega            | P1132           |

## ES 2 609 439 T3

Se muestran las recetas de regulador requeridas

regulador TAE 50X

• 242 g de base de Tris • 57,1 ml de ácido acético glacial • 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O • Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro

5 regulador TAE 1X

• 20 ml de regulador TAE 50X

• 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada

Gel de Agarosa al 3% con bromuro de etidio

• 3 g LE agarosa

10 • 100 ml de regulador TAE 1X

• Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme

• Enfriar la agarosa hasta 55°C

• Añadir 2,5 µl de bromuro de etidio a 20 mg/ml a agarosa

• Verter sobre una plataforma de gel

15 Gel de Agarosa al 4% con bromuro de etidio

• 4 g LE agarosa

• 100 ml de regulador TAE 1X

• Fundir la agarosa en un horno de microondas y agitar para asegurar una mezcla uniforme

• Enfriar la agarosa hasta 55°C

20 • Añadir 2,5 µl de bromuro de etidio a 20 mg/ml a agarosa

• Verter sobre una plataforma de gel

Los procedimientos de síntesis en fase líquida se siguieron como se muestra en el siguiente formato por etapas. El día 1, el ensamblaje del dominio variable de HC implica realizar la Ligación 1 y la ligación 2 al mismo tiempo y realizar la ligación 3 y la ligación 4 al mismo tiempo.

25 Ligación 1: FW1b → FW1a

Preparar las siguientes reacciones de Ligación en tubos de microcentrífuga sobre hielo. Hay 7 reacciones de Ligación (FW1-1 a FW1-7). Preparar cada reacción de Ligación en un tubo de microcentrífuga diferente, total de 7 tubos.

Fragmentos FW1a (250 pMol) x µL

Fragmentos FW1b (250 pMol) x µL

30 Regulador 10X T4 ligasa 2 µL

10 mM rATP 1 µL

Agua libre de nucleasa QS a 19 µL

T4 ligasa 1 µL





## ES 2 609 439 T3

Volumen de reacción total 20 µL

18. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

19. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

20. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

|   |  |             |
|---|--|-------------|
| 5 | Ligaciones FW 3                          | 20 µL       |
|   | <u>Regulador de carga de muestra 10x</u> | <u>3 µL</u> |

Volumen total 23 µL

21. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

10 22. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.

23. Combinar fragmentos de gel de las 7 reacciones de Ligación en dos tubos de microcentrífuga.

24. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

25. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

15 26. Coloque una columna de centrifugado QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

27. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

28. Desechar el flujo y colocar la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

29. Se añaden 0,75 ml de regulador PE a la columna QIAquick y se centrifuga durante 1 minuto.

30. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

20 31. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

32. Añadir 52 µl de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

33. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µl) y cargar 6 µl en gel de agarosa al 4% a QC.

Ligación 3: CDR1 → FW1

25 1. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

fragmentos CDR1 (1 nMol) x µL

Los fragmentos FW1 combinados purificados con gel 94 µL

Regulador 10X T4 ligasa 14 µL

rATP 10 mM 1 µL

30 Agua libre de nucleasa QS a 139 µL

T4 ligasa 1 µL

Volumen de reacción total 140 µL

## ES 2 609 439 T3

2. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

4. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

Ligaciones CDR1-FW 1 140 µl

5 Regulador 10x de carga de muestra 15 µl

Volumen total 155 µl

5. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

6. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando el QIAquick Gel Extraction Kit.

10 7. Combinar los fragmentos de gel en dos tubos de microcentrífuga.

8. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

9. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

10. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

15 11. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

12. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

13. Añadir 0.75 ml de regulador PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

14. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

15. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.

20 16. Añadir 52 µl de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

17. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µl) y cargar 6 µl en gel de agarosa al 4% a QC.

Ligación 4: CDR2 → FW3

18. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

25 fragmentos CDR2 (1 nMol) x µL

Fragmentos FW3 combinados purificados con gel 94 µL

Regulador 10X T4 ligasa 14 µL

rATP 10 mM 1 µL

Agua libre de nucleasa QS a 139 µL

30 T4 ligasa 1 µL

Volumen de reacción total 140 µL

19. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

## ES 2 609 439 T3

20. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

21. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

|                                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| Ligaciones CDR2-FW3               | 140 $\mu$ l |
| Regulador 10x de carga de muestra | 15 $\mu$ l  |
| 5 Volumen total                   | 155 $\mu$ l |

22. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

23. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando el QIAquick Gel Extraction Kit.

24. Combinar los fragmentos de gel en dos tubos de microcentrífuga.

10 25. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

26. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

27. Coloque una columna giratoria QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

28. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

15 29. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

30. Añadir 0.75 ml de regulador de PE a QIAquick columna y centrifugar durante 1 minuto.

31. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

32. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.

20 33. Añadir 52  $\mu$ l de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

34. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104  $\mu$ l) y cargar 6  $\mu$ l en gel de agarosa al 4% a QC.

El Día 2, el ensamblaje del dominio variable de HC se continuó, realizando la Ligación 5 y la Ligación 6 al mismo tiempo

Ligación 5: FW2 → CDR1-FW1

25 1. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

|   |                  |
|---|------------------|
| fragmento FW2 reunido (450 pMol)        | x $\mu$ L        |
| Fragmentos CDR1-FW1 purificados con gel | 94 $\mu$ L       |
| Regulador 10X T4 ligasa                 | 14 $\mu$ L       |
| rATP 10 mM                              | 1 $\mu$ L        |
| 30 Agua libre de nucleasa               | QS a 139 $\mu$ L |
| T4 ligasa                               | 1 $\mu$ L        |
| Volumen de reacción total               | 140 $\mu$ L      |

El conjunto de fragmentos de FW2 contenía 5 fragmentos FW2, cada uno a 90 pMol.

## ES 2 609 439 T3

2. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

4. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

Ligaciones FW2-CDR-1-FW1 140 µl

5 Regulador 10x de carga de muestra 15 µl

Volumen total 155 µl

5. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

6. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.

10 7. Combinar fragmentos de gel de las 7 reacciones de ligación en dos tubos de microcentrífuga

8. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

9. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

10. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

15 11. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

12. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

13. Añadir 0.75 ml de regulador PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

14. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

15. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.

20 16. Añadir 30 µL de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

17. Combinar el ADN eluido (volumen total de 60 µL) y cargar 3 µl en gel de agarosa al 4% a QC.

Ligación 6: CDR3 → FW3-CDR2

18. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

25 Conjunto de fragmentos CDR3 (500 pMol) x µL

Fragmentos FW3-CDR2 purificados con gel 94 µL

Regulador 10X T4 ligasa 14 µL

rATP 10 mM 1 µL

Agua libre de nucleasa QS a 139 µL

30 T4 ligasa 1 µL

Volumen de reacción total 140 µL

[[El conjunto de fragmentos FW2 contenía 5 fragmentos FW2, cada uno a 90 pMol]]

## ES 2 609 439 T3

19. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

20. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

21. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

ligaciones CDR3 - FW3 - CDR2 140  $\mu$ l

5 Regulador 10x de carga de muestra 15  $\mu$ l

Volumen total 155  $\mu$ l

22. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

23. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.

10 24. Combinar fragmentos de gel de las 7 reacciones de ligación en dos tubos de microcentrífuga.

25. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

26. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto por completo. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

27. Coloque una columna giratoria QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

15 28. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

29. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

30. Añadir 0.75 ml de regulador de PE a QIAquick columna y centrifugar durante 1 minuto.

31. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

32. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.

20 33. Añadir 30  $\mu$ l de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

34. Combinar el ADN eluido (volumen total de 60  $\mu$ L) y cargar 3  $\mu$ L en gel de agarosa al 4% a QC.

Ligación 7: Dominio variable de HC de longitud completa

1. Preparar reacciones de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

25 Fragmentos FW1-CDR1-FW2 49  $\mu$ L

Fragmentos CDR2- W3-CDR3 49  $\mu$ L

Regulador 10X T4 ligasa 12  $\mu$ L

rATP 10 mM, 5  $\mu$ L

Agua libre de nucleasa QS a 345  $\mu$ L

30 T4 ligasa 5  $\mu$ L

Volumen de reacción total 350  $\mu$ L

35. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

## ES 2 609 439 T3

36. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

37. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

Ligaciones de dominio variable de HC de longitud completa 140  $\mu$ l

Regulador 10x de carga de muestra 15  $\mu$ l

5 Volumen total 155  $\mu$ l

38. Cargar en un gel TAE de agarosa al 3% con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Utilice la escala de ADN de 100 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

39. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.

40. Combinar fragmentos de gel en un tubo de microcentrífuga.

10 41. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

42. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

43. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

44. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

15 45. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

46. Añadir 0.75 ml de regulador PE a QIAquick columna y centrifugar durante 1 minuto.

47. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

48. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

20 49. Añadir 30  $\mu$ l de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

50. Cargar 3  $\mu$ l de gel de agarosa al 3% a QC.

Determinación de las CDR de la cadena pesada. El siguiente conjunto de reglas permite la identificación de las CDR en la mayoría de las secuencias del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo.

### CDR-H1

25 Inicio: ~ posición 26, siempre 4 después de un residuo de cisteína

Residuos antes: C-X-X-X

Longitud: 10 - 12 aminoácidos

Residuos después: siempre un W, usualmente W-V, pero también W-I, W-A

### CDR-H2

30 Inicio: siempre 15 residuos después del final de CDR-H1

Residuos antes: generalmente L-E-W-I-G, pero con una serie de variaciones

Longitud: 16 - 19 aminoácidos

Residuos después de: K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A

## ES 2 609 439 T3

### CDR-H3

Inicio: siempre 33 residuos después del final de CDR-H2 (siempre 2 después de una cisteína)

Residuos antes: siempre C-X-X, usualmente C-A-R

Longitud: 3-25 residuos

5 Residuos después de: W-G-X-G (típicamente W-G-Q-G)

10 Las referencias para este protocolo incluyen L. B. K. C. Antibody humanization by CDR grafting. *Antibody Engineering, Methods and protocols*. Edit by Benny K. C. Lo, *Methods in Molecular Biology*, 2004; 248, 135-159; Developing a minimally immunogenic humanized antibody by SDR grafting. *Antibody Engineering, Methods and protocols*. Edit by Benny K. C. Lo, *Methods in Molecular Biology*, 2004, 248, 361-376; Bassette, P. H., Mena, M. A., Nguyen, A. W. and Daugherty, P. S. Construction of Designed Protein Libraries Using Gene Assembly Mutagenesis. *Directed Evolution Library Creation, Methods and protocols*. Edit by Frances H. Arnold and George Georgiou, *Methods in Molecular Biology*, 2003, 231, 29-37; Chames, P., Hoogenboom, H. R., and Henderikx, P. Selection on Biotinylated antigens. *Antibody Engineering*, Edit by R. Kontermann and S. Dubel, *Springer Lab Manual*, 149-166; Obrien S., and Jones, T. Humanising antibodies by CDR grafting. *Antibody Engineering*, Edit by R. Kontermann and S. Dubel, *Springer Lab Manual*, 567-590.

#### **Ejemplo 3.** Síntesis de fase líquida de bibliotecas de dominio variable combinatorio - cadena ligera.

20 Este protocolo describe el ensamblaje de una biblioteca de dominio variable de cadena ligera humanizada (LC). La biblioteca contiene cadenas de cadenas ligeras humanas (FW) y regiones no determinantes de complementariedad (CDR) no humanas en el orden de: FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3. Hay un total de 7 fragmentos FW1, 4 FW2 y 8 FW3. La biblioteca se ensambla utilizando ligación en fase líquida por etapas de FW y fragmentos de ADN de CDR. Un tiempo típico de la terminación para este protocolo es cuatro días con la creación de cerca de cuatro bibliotecas de la cadena pesada por persona. Los reactivos, consumibles y equipos se describen en el Ejemplo 2, Tabla 2, anterior. Las formulaciones reguladoras requeridas se muestran arriba en el Ejemplo 2.

25 Los procedimientos de síntesis en fase líquida se siguieron como se muestra en el siguiente formato por etapas. El día 1, el ensamblaje del dominio variable de HC implica realizar la Ligación 1 y la Ligación 2 al mismo tiempo y realizar la Ligación 3 y la Ligación 4 al mismo tiempo

Ligación 1: FW1b → FW1a

30 34. Prepare las siguientes reacciones de ligación en tubos de microcentrífuga sobre hielo. Hay 7 reacciones de Ligación (FW1-1 a FW1-7). Preparar cada reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga diferente, total de 7 tubos.

|                            |                            |  |
|----------------------------|----------------------------|--|
| Fragmentos FW1a (250 pMol) | x $\mu$ L                  |  |
| Fragmentos FW1b (250 pMol) | x $\mu$ L                  |  |
| Regulador 10X T4 ligasa    | 2 $\mu$ L                  |  |
| rATP 10 mM                 | 1 $\mu$ L                  |  |
| 35 Agua libre de nucleasa  | QS a 19 $\mu$ L            |  |
| <u>T4 ligasa</u>           | <u>1 <math>\mu</math>L</u> |  |
| Volumen de reacción total  | 20 $\mu$ L                 |  |

35. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

36. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

40 37. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

|                |            |  |
|----------------|------------|--|
| Ligaciones FW1 | 20 $\mu$ l |  |
|----------------|------------|--|

## ES 2 609 439 T3

|    |   |             |
|----|---|-------------|
|    | <u>Regulador 10x de carga de muestra</u>  | 3 µl        |
|    | Volumen total   | 23 µl       |
|    | 38. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.                                       |             |
| 5  | 39. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.  |             |
|    | 40. Combinar fragmentos de gel de las 7 reacciones de Ligación en dos tubos de microcentrífuga.   |             |
|    | 41. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.  |             |
|    | 42. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.  |             |
| 10 | 43. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.   |             |
|    | 44. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.  |             |
|    | 45. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.   |             |
|    | 46. Añadir 0.75 ml de regulador PE a QIAquick columna y centrifugar durante 1 minuto.   |             |
|    | 47. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).   |             |
| 15 | 48. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.   |             |
|    | 49. Añadir 52 µl de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.  |             |
|    | 50. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µl) y cargar 6 µl en gel de agarosa al 4% a QC los productos de ligación purificados.  |             |
| 20 | Ligación 2: FW3b → FW3a   |             |
|    | 51. Preparar las siguientes reacciones de ligación en tubos de microcentrífuga sobre hielo. Hay 8 reacciones de Ligación (FW3-1 a FW3-8). Preparar cada reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga diferente, total de 7 tubos. |             |
|    | fragmentos FW3a (250 pMol)  | x µL        |
| 25 | fragmentos FW3b (250 pMol)  | x µL        |
|    | Regulador 10X T4 ligasa   | 2 µL        |
|    | rATP 10 mM  | 1 µL        |
|    | Agua libre de nucleasa  | QS a 19 µL  |
|    | <u>T4 ligasa</u>  | <u>1 µL</u> |
| 30 | Volumen de reacción total   | 20 µL       |
|    | 52. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.  |             |
|    | 53. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.  |             |
|    | 54. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:   |             |
|    | Ligaciones FW 3   | 20 µL       |



## ES 2 609 439 T3

Regulador 10x de carga de la muestra      3  $\mu$ L

Volumen total      23  $\mu$ L

55. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

5    56. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.

57. Combinar fragmentos de gel de las 7 reacciones de Ligación en dos tubos de microcentrífuga.

58. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

59. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

10    60. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

61. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

62. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

63. Añadir 0.75 ml de regulador de PE a QIAquick columna y centrifugar durante 1 minuto.

64. Descartar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

15    65. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

66. Añadir 52  $\mu$ l de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

67. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104  $\mu$ L) y cargar 6  $\mu$ L de gel de agarosa al 4% a QC.

Ligación 3: CDR1 → FW1

20    35. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

Fragmentos CDR1 (1 nMol)      x  $\mu$ L

Los fragmentos FW1 combinados purificados con gel      94  $\mu$ L

Regulador 10X T4 ligasa      14  $\mu$ L

rATP 10 mM      1  $\mu$ L

25    Agua libre de nucleasa      QS a 139  $\mu$ L

T4 ligasa      1  $\mu$ L

Volumen de reacción total      140  $\mu$ L

36. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

37. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

30    38. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

Ligaciones CDR1 - FW 1      140  $\mu$ l

Regulador 10x de carga de muestra      15  $\mu$ l

## ES 2 609 439 T3

Volumen total 155 µl

39. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

40. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando el QIAquick Gel Extraction Kit.

5 41. Combinar los fragmentos de gel en dos tubos de microcentrífuga.

42. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

43. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

44. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

10 45. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

46. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

47. Se añaden 0.75 ml de regulador PE a la columna QIAquick y se centrifuga durante 1 minuto.

48. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

49. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

15 50. Añadir 52 µl de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

51. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µl) y cargar 6 ul en gel de agarosa al 4% a QC.

Ligación 4: CDR2 → FW3

52. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

20 fragmentos CDR2 (1 nMol) x µL

Fragmentos FW3 combinados purificados con gel 94 µL

Regulador 10X T4 ligasa 14 µL

rATP 10 mM 1 µL

Agua libre de nucleasa QS a 139 µL

25 T4 ligasa 1 µL

Volumen de reacción total 140 µL

53. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

54. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

55. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

30 Ligaciones CDR2 - FW3 140 µl

Regulador 10x de carga de muestra 15 µl

Volumen total 155 µl

## ES 2 609 439 T3

56. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.
57. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando el QIAquick Gel Extraction Kit.
58. Combinar los fragmentos de gel en dos tubos de microcentrifuga.
- 5 59. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.
60. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.
61. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.
62. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
- 10 63. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.
64. Añadir 0.75 ml de regulador PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
65. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).
66. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml limpio.
- 15 67. Añadir 52 µL de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.
68. Combinar el ADN eluido (volumen total de 104 µL) y cargar 6 µL de gel de agarosa al 4% a QC.
- El Día 2, el montaje del dominio variable de HC se continuó realizando la Ligación 5 y la Ligación 6 al mismo tiempo.
- Ligación 5: FW2 → CDR1 - FW1
51. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrifuga sobre hielo:
- |    |   |             |
|----|---|-------------|
| 20 | fragmento FW2reunido (450 pMol)           | x µL        |
|    | Fragmentos CDR1 - FW1 purificados con gel | 94 µL       |
|    | Regulador 10X T4 ligasa                   | 14 µL       |
|    | rATP 10 mM                                | 1 µL        |
|    | Agua libre de nucleasa                    | QS a 139 µL |
| 25 | <u>T4 ligasa</u>                          | <u>1 µL</u> |
|    | Volumen de reacción total                 | 140 µL      |
- El conjunto de fragmentos de FW2 contenía 5 fragmentos FW2, cada uno a 90 pMol.
52. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrifuga.
53. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 30 54. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml:
- |  |              |
|--|--------------|
| Ligación FW2-CDR-1-FW1                   | 140 µl       |
| <u>Regulador 10x de carga de muestra</u> | <u>15 µl</u> |

## ES 2 609 439 T3

Volumen total 155 µl

55. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

56. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.

5 57. Combinar fragmentos de gel de las 7 reacciones de ligación en dos tubos de microcentrífuga.

58. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

59. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

60. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

10 61. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

62. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

63. Añadir 0.75 ml de regulador de PE a QIAquick columna y centrifugar durante 1 minuto.

64. Descartar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

65. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

15 66. Añadir 30 µl de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

67. Combinar el ADN eluido (volumen total de 60 µl) y cargar 3 µl en gel de agarosa al 4% a QC.

Ligación 6: CDR3 → FW3-CDR2

68. Preparar la reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

|    |   |             |
|----|---|-------------|
| 20 | Fragmento de fragmentos CDR3 (500 pMol) | x µL        |
|    | FW3-CDR2 purificado con gel             | 94 µL       |
|    | Regulador 10X T4 ligasa                 | 14 µL       |
|    | rATP 10 mM                              | 1 µl        |
|    | Agua libre de nucleasa                  | QS a 139 µL |
| 25 | <u>T4 ligasa</u>                        | <u>1 µL</u> |
|    | Volumen de reacción total               | 140 µl      |

[[El conjunto de fragmentos FW2 contenía 4 fragmentos de FW2, cada uno a 90 pMol]]

69. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

70. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

30 71. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

|  |              |
|--|--------------|
| ligaciones CDR3 - FW3 - CDR2             | 140 µl       |
| <u>Regulador 10x de carga de muestra</u> | <u>15 µl</u> |

## ES 2 609 439 T3

Volumen total 155 µl

72. Cargar en un gel TAE de agarosa al 4% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilizar la escala de ADN de 25 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

73. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.

5 74. Combinar fragmentos de gel de las 7 reacciones de Ligación en dos tubos de microcentrífuga.

75. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.

76. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.

77. Coloque una columna de giro QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.

10 78. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

79. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.

80. Añadir 0.75 ml de regulador PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.

81. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).

82. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml.

15 83. Añadir 30 µl de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.

84. Combinar el ADN eluido (volumen total de 60 µl) y cargar 3 µl en gel de agarosa al 4% a QC.

Ligación 7: longitud variable LC dominio variable

2. Preparar reacciones de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

20 Fragmentos FW1-CDR1-FW2 49 µL

Fragmentos CDR2-FW3-CDR3 49 µl

Regulador 10X T4 ligasa 12 µL

rATP 10 mM 5 µl

Agua libre de nucleasa QS a 345 µL

25 T4 ligasa 5 µL

Volumen de reacción total 350 µl

85. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga.

86. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

87. Realizar las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

30 Ligas de dominio variable LC de longitud completa 140 µl

Regulador 10x de carga de muestra 15 µl

Volumen total 155 µl

## ES 2 609 439 T3

88. Carga en un gel TAE de agarosa al 3% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilice la escala de ADN de 100 pb como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.
89. Cortar las bandas correspondientes a los tamaños correctos y purificar usando QIAquick Gel Extraction Kit.
90. Combinar fragmentos de gel en un tubo de microcentrifuga.
- 5 91. Añadir 3 volúmenes de regulador QG a 1 volumen de gel.
92. Incubar a 50°C durante 10 minutos hasta que la sección de gel se haya disuelto completamente. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar.
93. Coloque una columna de rotación QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.
94. Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
- 10 95. Deseche el flujo y coloque la columna QIAquick en el mismo tubo de recolección.
96. Añadir 0.75 ml de regulador PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 1 minuto.
97. Desechar el flujo y centrifugar la columna QIAquick durante 1 minuto adicional a 17.900 x g (13.000 rpm).
98. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml limpio.
- 15 99. Añadir 30 µl de regulador EB al centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 minuto. Dejar reposar la columna durante 1 minuto, y luego centrifugar durante 1 minuto.
100. Cargar 3 µl de gel de agarosa al 3% a QC.

Determinación de las CDR de cadena ligera. El siguiente conjunto de reglas permite la identificación de las CDR en la mayoría de las secuencias de dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo.

### CDR-L1

- 20 Inicio: ~ posición 24, siempre 1 después de un residuo de cisteína
- Residuos antes: C
- Longitud: 10 - 17 aminoácidos
- Residuos después: siempre W, usualmente W-Y-Q, pero también W-L-Q, W-F-Q, W-Y-L

### CDR-L2

- 25 Inicio: siempre 16 residuos después del final del CDR-L1
- Residuos antes: usualmente I-Y, pero también V-Y, I-K, I-F
- Longitud: siempre 7 aminoácidos

### CDR-L3

- Inicio: siempre 33 residuos después del final de CDR-L2 (siempre 2 después de una cisteína)
- 30 Residuos antes: siempre C
- Longitud: 7-11 residuos
- Residuos después de: F-G-X-G (típicamente F-G-Q-G)

**Ejemplo 4.** Clonación de dominios variables ensamblados. ligación de HC y LC dominio variable con Fc.

## ES 2 609 439 T3

Este protocolo describe la clonación de dominios variables de cadena pesada y ligera humanizada ensamblados en vectores de expresión de BioAtla, pBA-K y pBA-L. El tiempo estimado de terminación 7 días con 4 procedimientos de clonación por persona. La Tabla 3 muestra los reactivos, consumibles y equipos requeridos.

Tabla 3: Reactivos, consumibles y equipo

| Ítem # | Descripción  | Proveedor Aprobado | Catálogo No. |
|--------|--|--------------------|--------------|
| 1      | Escalera de ADN 1 kB plus                                      | Invitrogen         | 10787-026    |
| 2      | 1% de gel de agarosa   | Véase Apéndice 1   | N/A          |
| 3      | Tubo de microcentrífuga de 1,5 ml                              | ISC Bioexpress     | I5019-07     |
| 4      | Tubo estéril de polipropileno de fondo redondo Falcon de 14 ml | VWR                | 60819-761    |
| 5      | NaCl 5 M - 500 ml  | Ambion             | 9759         |
| 6      | Agar   |                    |              |
| 7      | Aparato de gel de agarosa                                      | Bio-Rad            | 1707764      |
| 8      | Regulador de carga de gel de agarosa                           | Invitrogen         | 10816-015    |
| 9      | Fuente de alimentación de gel de agarosa                       | Bio-Rad            | 1645050      |
| 10     | Bsal   | New England Biolab | R0535S       |
| 11     | BsmBI  | New England Biolab | R0580L       |
| 12     | Bromuro de etidio  | Sigma-Aldrich      | E1510        |
| 13     | Ácido acético glacial - 500 ml                                 | Fisher             | BP1185500    |
| 14     | Microcentrífuga  | Eppendorf          | 5417C        |
| 15     | Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O                         | Sigma-Aldrich      | E9884        |
| 16     | 1000 ml Agua libre de nucleasa - 1000 ml                       | Ambion             | 9932         |
| 17     | Tiras de tubos de PCR con tapas                                | VWR                | 53509-304    |
| 18     | Raspador de placas   |                    |              |
| 19     | Perlas de revestimiento  |                    |              |
| 20     | QIAprep Sping Miniprep kit                                     | Qiagen             | 27104        |
| 21     | Kit de purificación PCR QIAquick                               | Qiagen             | 28104        |
| 22     | SeaKem LE agarosa  | Cambrex            | 50004        |
| 23     | T4 ADN ligasa (20.000 unidades)                                | NewEngland Biolab  | M0202T       |

## ES 2 609 439 T3

|    |                                   |            |         |
|----|-----------------------------------|------------|---------|
| 24 | Tris base                         | Fisher     | BP154-1 |
| 25 | Triptona                          |            |         |
| 26 | Baño de agua                      |            |         |
| 27 | Células XLI Blue Supercompetentes | Stratagene | 200236  |
| 28 | Extracto de levadura              |            |         |

Para este protocolo se requieren los siguientes reguladores.

Regulador TAE 50X

242 g de Tris base

5 57.1 ml de ácido acético glacial

37.2 g de Na<sub>2</sub>EDTA - 2H<sub>2</sub>O

Añadir H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen final de 1 litro

Regulador TAE 1X

20 ml de regulador TAE 50X

10 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada

1% Gel de Agarosa con bromuro de etidio

1 g de LE agarosa

100 ml de regulador TAE 1X

Funda la agarosa en un horno de microondas y agite para asegurar una mezcla uniforme

15 Enfriar la agarosa hasta 55°C

Añadir 2.5 µl de bromuro de etidio a 20 mg/ml a agarosa

Verter sobre una plataforma de gel

LB

10 g de NaCl

20 10 g de triptona

5 g de extracto de levadura

Añadir H<sub>2</sub>O destilada a un volumen final de 1 litro

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N

Autoclave

25 Agar LB-carbenicilina

10 g de NaCl



## ES 2 609 439 T3

- 10 g de triptona  
5 g de extracto de levadura  
20 g de agar  
Añadir H<sub>2</sub>O destilada a un volumen final de 1 litro
- 5 Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N  
Autoclave  
Enfriar a 55 °C  
Añadir 10 ml de 10 mg/ml de carbenicilina esterilizada por filtración  
Verter en cajas de Petri (caja de 25 ml/100 mm)
- 10 Medio SOC  
0,5 g de NaCl  
20 g de triptona  
0.5 g de extracto de levadura  
2 ml de glucosa al 20% esterilizada con filtro
- 15 Añadir H<sub>2</sub>O destilada a un volumen final de 1 litro  
Autoclave  
Añadir 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M esterilizado con filtro y 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M esterilizado con filtro antes de usar  
El día 1 se digiere el vector pBA con Bsal. Preparar la siguiente reacción de digestión en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:
- |    |                           |             |
|----|---------------------------|-------------|
| 20 | PBA (5 ug)                | x µL        |
|    | Regulador 310X NEB        | 10 µL       |
|    | Agua libre de nucleasa    | QS a 97 µL  |
|    | <u>Bsal (10 U/µL)</u>     | <u>3 µL</u> |
|    | Volumen de reacción total | 100 µL      |
- 25 1. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga  
2. Incubar la reacción a 50°C durante la noche  
Día 2  
3. Añadir 2 µl de Apex fosfatasa al tubo de microcentrífuga  
4. Incubar a 37°C durante 10 minutos
- 30 5. Calentar a 70°C durante 5 minutos para inactivar la fosfatasa Apex  
Purificar el vector pBA digerido con Bsal con QIAquick PCR Purification Kit

## ES 2 609 439 T3

6. Añadir 500 µL de regulador PBI a la microcentrífuga
  7. Mezclar por vórtex y centrifuga rápida
  8. Cargue 750 µl a la vez en una columna
  9. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y decantar el líquido del tubo de recolección
  - 5 10. Repita hasta que se haya procesado toda la muestra.
  11. Lavar con 750 µl de regulador PE (Etanol añadido!)
  12. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y decantar el líquido del tubo de recolección
  13. Vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección y centrifugue otra vez
  14. Coloque la columna en nuevos tubos de microcentrífuga y eluya con 50 µl de regulador EB
- 10 **Análisis de control de calidad**
1. Para QC el vector pBA digerido con Bsal, se ejecutan las siguientes reacciones en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:
- |    |                                      |             |                                      |             |
|----|--------------------------------------|-------------|--------------------------------------|-------------|
|    | PBA-Bsal                             | 2 µl        | pBA sin cortar                       | 2 µl        |
| 15 | Agua                                 | 7 µl        | Agua                                 | 7 µl        |
|    | <u>Regulador de carga de muestra</u> | <u>1 µl</u> | <u>Regulador de carga de muestra</u> | <u>1 µl</u> |
|    | Volumen total                        | 10 µl       | Volumen total                        | 10 µl       |
2. Cargar 10 µl en un gel TAE de agarosa al 1% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Utilice una escala de 1 kb más ADN como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.
- 20 3. Determine la concentración del vector pBA digerido con Bsal con espectrofotómetro (OD<sub>260/280</sub>)
4. Establecer las siguientes reacciones de ligación para determinar el fondo y la eficacia de ligación del vector pBA digerido con Bsal:
    - a. Vector de ligación de fondo
- |    |                                 |             |  |  |
|----|---------------------------------|-------------|--|--|
|    | PBA - Bsal (100 ng)             | x µL        |  |  |
| 25 | Regulador 5X T4 ligasa          | 4 µL        |  |  |
|    | Agua libre de nucleasa          | QS a 19 µL  |  |  |
|    | <u>T4 ligasa (2.000 U / mL)</u> | <u>1 µL</u> |  |  |
|    | Volumen de reacción total       | 20 µL       |  |  |
- b. Pruebe las Ligaciones de inserción
- |    |                                 |      |  |  |
|----|---------------------------------|------|--|--|
|    | PBA - Bsal (100 ng)             | x µL |  |  |
| 30 | Inserto de prueba (5 ng, 10 ng) | y µL |  |  |
|    | Regulador 5X T4 ligasa          | 4 µL |  |  |

## ES 2 609 439 T3

Agua libre de nucleasa      QS a 19  $\mu$ L

T4 ligasa (2.000 U /  $\mu$ L)      1  $\mu$ L

Volumen de reacción total      20  $\mu$ L

5. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) En microcentrífuga
- 5 6. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas o 16°C durante la noche
7. Transformar cada una de las mezclas de reacción de ligación en células XLI Blue Supercompetent
8. Preenfriar tubos de fondo redondo de polipropileno BD Falcon de 14 ml sobre hielo. Medio SOC caliente hasta 42°C
9. Descongele las células XLI Blue Supercompetent en hielo. Cuando se descongela, mezcle suavemente y tome alícuota de 100  $\mu$ l de células en cada uno de los tubos preenfriados.
- 10 10. Añadir 1.7  $\mu$ L de beta-mercaptoetanol a cada alícuota de células. Incubar las células en hielo de 10 minutos, girando suavemente cada 2 minutos.
11. Añadir 2  $\mu$ L de la mezcla de reacción de ligación a una alícuota de células. Sacuda los tubos suavemente.
12. Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos.
13. Caliente los tubos en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos.
- 15 14. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos
15. Añadir 900  $\mu$ l de medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37°C durante 1 hora con agitación a 225-250 rpm.
16. Se siembran 20  $\mu$ L y 200  $\mu$ L de la mezcla de transformación en placas de agar LB que contienen carbenicilina.
17. Incubar las placas a 37°C durante la noche.

Día 3

- 20 18. Contar las colonias y calcular la eficiencia y el fondo del vector, así como la cantidad óptima de inserto para la Ligación.

Dominio Variable de la Cadena Pesada Ligada (HC) en el vector pBA digerido con Bsal para preparar la siguiente reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

PBA - Bsal (100 ng)      x  $\mu$ L

- 25 Dominio variable de cadena pesada (HC)      y  $\mu$ L

Regulador 5X T4 ligasa      4  $\mu$ L

Agua libre de nucleasa      QS a 19  $\mu$ L

T4 ligasa 12.000 U /  $\mu$ l)      1  $\mu$ l

Volumen de reacción total      20  $\mu$ l

- 30 1. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga
2. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas o 16°C durante la noche
3. Transforme cada una de las mezclas de reacción de ligación en células XLI Blue Supercompetent
4. Preenfriar tubos de fondo redondo de polipropileno BD Falcon de 14 ml sobre hielo. Preparar el medio SOC a 42°C

## ES 2 609 439 T3

5. Descongele las células XLI Blue Supercompetent en hielo. Cuando se descongela, mezcle suavemente y tome alícuota de 100  $\mu$ l de células en cada uno de los tubos preenfriados.
6. Añadir 1.7  $\mu$ L de beta-mercaptoetanol a cada alícuota de células. Incubar las células en hielo durante 10 minutos, girando suavemente cada 2 minutos.
- 5 7. Añadir 2  $\mu$ L de la mezcla de reacción de ligación a una alícuota de células. Sacudir los tubos suavemente.
8. Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos.
9. Caliente los tubos en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos.
10. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos
11. Añadir 900  $\mu$ l de medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37°C durante 1 hora con agitación a 225-250 rpm.
- 10 12. Se siembran 20  $\mu$ L y 200  $\mu$ L de la mezcla de transformación en placas de agar LB que contienen carbenicilina.
13. Incubar las placas a 37°C durante la noche.
- Día 4
14. Contar colonias en placas y recoger 24 colonias para Miniprep y secuenciación.
15. Repita las transformaciones para obtener al menos 2000 colonias.
- 15 16. Añadir 6 ml de medio LB a cada placa que contenga colonias y raspe suavemente las bacterias con un esparcidor para formar una suspensión densa.
17. Lave cada placa con 2 ml de medio LB adicional para recuperar las bacterias residuales.
18. Reunir las bacterias en un solo frasco estéril con una tapa.
19. Tomar la mitad de las bacterias agrupadas y realizar la preparación del plásmido
- 20 20. Al resto de las bacterias reunidas, añadir 0.2 volúmenes de glicerol al 80% y mezclar bien.
21. Dispensar alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 ml y congelar a -80°C.
- Purificar el ADN de la biblioteca de dominio variable de cadena pesada de pBA (pBA-HC) con el kit QIAprep Spin Miniprep .
- 25 1. Resuspender las células bacterianas sedimentadas en 500  $\mu$ L de regulador P1 (con RNasa A) y transferir a dos tubos de microcentrífuga.
2. Añadir 250  $\mu$ L de regulador P2 y mezclar completamente invirtiendo los tubos 4-6 veces.
3. Añadir 350  $\mu$ L de regulador N3 y mezclar inmediata y completamente mediante vórtex
4. Centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm en una microcentrífuga.
5. Aplicar los sobrenadantes a las columnas de centrifugado QIAprep por decantación.
- 30 6. Centrifugar durante 1 min a 13.000 rpm en una microcentrífuga. Deseche el flujo.
7. Lavar las columnas de centrifugado QIAprep añadiendo 0.75 ml de regulador de PE.
8. Centrifugar durante 1 min a 13.000 rpm en una microcentrífuga.
9. Deseche el flujo y centrifugue durante 1 minuto adicional para eliminar el regulador de lavado de residuos.

## ES 2 609 439 T3

10. Coloque las columnas QIAprep en tubos de microcentrífuga limpios de 1.5 ml. Para eluir ADN, añadir 50 µL de regulador EB al centro de cada columna de giro QIAprep, dejar reposar durante 1 min a temperatura ambiente.

11. Centrifugar durante 2 min a 13.000 rpm en una microcentrífuga.

12. Determinar la concentración de ADN con espectrofotómetro ( $OD_{260/280}$ ).

### 5 Digestión con BsmBI de la biblioteca pBA-HC

Preparar la siguiente reacción de digestión en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

ADN de biblioteca pBA-HC (5 µg)                      x µL

Regulador 3 10X NEB                                      10 µL

Agua libre de nucleasa                                  QS a 97 µL

10 BsmBI (10 U/µl)    3 µL

Volumen de reacción total                              100 µL

1. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga

2. Incubar la reacción a 55°C durante la noche

Día 5

15 3. Añadir 2 µL de Apex fosfatasa a la microcentrífuga

4. Incubar a 37°C durante 10 minutos

5. Calentar a 70°C durante 5 minutos para inactivar la fosfatasa Apex

Purificar la biblioteca de pBA-HC digerida con BsmBI con el kit QIAquick PCR Purification

1. Añadir 500 µL de regulador PBI a la microcentrífuga.

20 2. Mezclar por vórtex y centrifuga rápida.

3. Cargar 750 µL a la vez en una columna.

4. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y decantar el líquido del tubo de recolección.

5. Repita hasta que se haya procesado toda la muestra.

6. Lavar con 750 µL de regulador PE (Etanol añadido!).

25 7. Centrifugar a 12.000 x g durante 1 minuto y decantar el líquido del tubo de recolección.

8. Vuelva a colocar la columna en el tubo de recolección y centrifugue de nuevo.

9. Colocar la columna en nuevos tubos de microcentrífuga y eluir con 50 µL de regulador EB.

Análisis de control de calidad

30 1. Para QC la biblioteca pBA-HC digerida con BsmBI, se estableció la siguiente reacción en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml:

pBA-HC-BsmBI                                      2 µl                      pBA-HC sin cortar                                      2 µl

Agua    7 µl                      Agua    7 µl

## ES 2 609 439 T3

|  |  |
|--|--|
| <u>Regulador de carga de muestra</u> 1 $\mu$ l | <u>Regulador de carga de muestra</u> 1 $\mu$ l |
| Volumen total                                  | Volumen total                                  |
| 10 $\mu$ l                                     | 10 $\mu$ l                                     |

2. Cargar 10  $\mu$ l en un gel TAE 1% de agarosa con 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Utilice una escala de 1 kb más ADN como estándar. Ejecutar el gel a 100V durante 20-30 minutos en regulador TAE 1X.

5    3. Determine la concentración de la biblioteca pBA-HC digerida con BsmBI con espectrofotómetro ( $OD_{260/280}$ ).

4. Establecer las siguientes reacciones de ligación de control para determinar el fondo y la eficacia de ligación del vector pBA digerido con BsmBI:

c. Vector de Ligación de Fondo

|    |  |                            |
|----|--|----------------------------|
|    | pBA - HC - BsmBI (100 ng)                      | x $\mu$ L                  |
| 10 | Regulador 5X T4 ligasa                         | 4 $\mu$ L                  |
|    | Agua libre de nucleasa                         | QS a 19 $\mu$ L            |
|    | <u>T4 ligasa (2.000 U / <math>\mu</math>L)</u> | <u>1 <math>\mu</math>L</u> |
|    | Volumen de reacción total                      | 20 $\mu$ l                 |

d. Pruebe las Ligaciones de inserción

|    |  |                            |
|----|--|----------------------------|
|    | pBA - HC - BsmBI (100 ng)                    | x $\mu$ L                  |
|    | Inserto de prueba (5 ng, 10 ng)              | y $\mu$ L                  |
|    | Regulador 5X T4 ligasa                       | 4 $\mu$ L                  |
|    | Agua libre de nucleasa                       | QS a 19 $\mu$ L            |
|    | <u>T4 ligasa (2.000 U/<math>\mu</math>L)</u> | <u>1 <math>\mu</math>L</u> |
| 20 | Volumen de reacción total                    | 20 ml                      |

5. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga

6. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas o 16°C durante la noche

7. Transformar cada una de las mezclas de reacción de ligación en células XLI Blue Supercompetent

8. Preenfriar tubos de fondo redondo de polipropileno BD Falcon de 14 ml sobre hielo. Caliente medio SOC hasta 42°C

25    9. Descongele las células XLI Blue Supercompetent en hielo. Cuando se descongele, mezcle suavemente y tome alícuota de 100  $\mu$ l de células en cada uno de los tubos preenfriados.

10. Añadir 1.7  $\mu$ l de beta-mercaptoetanol a cada alícuota de células. Incubar las células en hielo durante 10 minutos, girando suavemente cada 2 minutos.

11. Añadir 2  $\mu$ l de la mezcla de reacción de ligación a una alícuota de células. Sacudir los tubos suavemente.

30    12. Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos.

13. Caliente los tubos en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos.

14. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos

15. Añadir 900  $\mu$ l de medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37°C durante 1 hora con agitación a 225-250 rpm.

## ES 2 609 439 T3

16. Se siembran 20  $\mu\text{L}$  y 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de transformación en placas de agar LB que contienen carbenicilina.

17. Incubar las placas a 37°C durante la noche.

Día 6

5 18. Contar las colonias y calcular la eficiencia y el fondo del vector, así como la cantidad óptima de inserto para la ligación.

Ligar la cadena liviana (LC) en la biblioteca pBA-HC digerida con BsmBI

Preparar la siguiente reacción de ligación en un tubo de microcentrífuga sobre hielo:

|    |   |                                   |
|----|---|-----------------------------------|
|    | PBA-HC-BsmBI (100 ng)                                 | x $\mu\text{L}$                   |
|    | Dominio variable de cadena ligera (LC)                | y $\mu\text{L}$                   |
| 10 | Regulador 5X T4 ligasa                                | 4 $\mu\text{L}$                   |
|    | Agua libre de nucleasa                                | QS a 19 $\mu\text{L}$             |
|    | <u>T4 ligasa (2.000 U / <math>\mu\text{L}</math>)</u> | <u>1 <math>\mu\text{L}</math></u> |
|    | Volumen de reacción total                             | 20 $\mu\text{l}$                  |

1. Mezclar suavemente y rotar brevemente (5 seg.) en microcentrífuga

15 2. Incubar a temperatura ambiente durante 2 horas o 16°C durante la noche

3. Transforme cada una de las mezclas de reacción de ligación en células XLI Blue Supercompetent

4. Preenfriar tubos de fondo redondo de polipropileno BD Falcon de 14 ml sobre hielo. Preparar el medio SOC a 42°C

5. Descongele las células XLI Blue Supercompetent en hielo. Cuando se descongela, mezcle suavemente y tome alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de células en cada uno de los tubos preenfriados.

20 6. Añadir 1.7  $\mu\text{l}$  de beta-mercaptoetanol a cada alícuota de células. Incubar las células en hielo durante 10 minutos, girando suavemente cada 2 minutos.

7. Añadir 2  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción de ligación a una alícuota de células. Sacudir los tubos suavemente.

8. Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos.

9. Caliente los tubos en un baño de agua a 42°C durante 45 segundos.

25 10. Incubar los tubos en hielo durante 2 minutos

11. Añadir 900  $\mu\text{l}$  de medio SOC precalentado e incubar los tubos a 37°C durante 1 hora con agitación a 225-250 rpm.

12. Placa 20  $\mu\text{l}$  y 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla de transformación en placas de agar LB que contienen Carbenicilina.

13. Incubar las placas a 37°C durante la noche.

Día 7

30 14. Contar las colonias en las placas. Elija 48 colonias para Miniprep y secuenciación.

15. Repita las transformaciones para obtener al menos 20.000 colonias.

16. Añadir 6 ml de medio LB a cada placa que contenga colonias y raspe suavemente las bacterias con un esparcidor para formar una suspensión densa.

17. Lave cada placa con 2 ml de medio LB adicional para recuperar las bacterias residuales.
18. Reunir las bacterias en un solo frasco estéril con una tapa.
19. Al resto de las bacterias reunidas, añadir 0.2 volúmenes de glicerol al 80% y mezclar bien.
20. Dispensar alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 ml y congelar a -80°C.

5 Ejemplo 5. Transfección de la biblioteca de humanización en células CHO-S.

Este protocolo describe el método de transfección de ADN en células CHO-S. El tiempo estimado de finalización es de 3 días con 384 muestras por persona. La Tabla 4 muestra los reactivos, consumibles y equipos requeridos.

Tabla 4: Reactivos, consumibles y equipo

| Ítem # | Descripción                            | Proveedor Aprobado | . Catálogo No. |
|--------|--|--------------------|----------------|
| 1      | Medio de Eagle modificado por Dulbecco | Invitrogen         | 11965-092      |
| 2      | CD-CHO                                 | Invitrogen         | 10743-029      |
| 3      | Suplemento de HT                       | Invitrogen         | 11067-030      |
| 4      | Aminoácidos MEM no esenciales 10 mM    | Invitrogen         | 11965-092      |
| 5      | Suero bovino fetal                     | Invitrogen         | 26140-079      |
| 6      | Lipofectamina 2000                     | Invitrogen         | 11668-027      |
| 7      | PBS                                    | Invitrogen         |                |
| 8      | Medio Opti-MEM Reducido en Suero       | Invitrogen         | 31985-062      |

10 Los siguientes reguladores son necesarios para este protocolo.

Suero bovino fetal inactivado por calor

500 ml de suero fetal bovino inactivado por calor en la botella original del vendedor

Calentar durante 30 minutos a 56°C con mezcla cada 5 minutos

Preparar alícuotas de 50 ml y almacenar a -20°C

15 Suero suplementado con suero de Eagle Modificado de Dulbecco

500 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco

50 ml de suero fetal bovino inactivado por calor

5 ml MEM 10 mM de aminoácidos no esenciales

Día 1

20 1. Una semana antes de la transfección, transferir células CHO-S a un cultivo monocapa en medio Dulbecco modificado Eagle (D-MEM) suplementado con suero.

2. Un día antes de la transfección, se siembran  $0.4 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l de D-MEM suplementado con suero por muestra de transfección en formatos de 96 pocillos.



Día 2

3. Realizar la transfección al final del día de trabajo.
4. Para cada muestra de transfección, preparar complejos de ADN-lipofectamina.
5. Diluir 0.2 µg de ADN en medio sérico reducido de 25 µL de Opti-MEM. Mezclar suavemente
- 5 6. Diluir 0.5 µL de lipofectamina en medio sérico reducido de 25 µL de Opti-MEM. Mezclar suavemente e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
7. Combinar el ADN diluido con la lipofectamina diluida. Mezclar suavemente e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 10 8. Añadir los complejos de 50 µL de ADN-lipofectamina a cada pocillo que contiene células y medio. Mezclar suavemente balanceando la placa hacia adelante y hacia atrás.
9. Incubar las células a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub> al 5% durante la noche

Día 3

10. Aspirar el medio en cada pocillo. Añadir 100 µL de D-MEM suplementado con suero a cada pocillo. Recoger el sobrenadante para el ensayo ELISA y el lisado celular para el ensayo de beta-galactosidasa.
- 15 Ejemplo 6. Determinación de los niveles de expresión de clones humanizados mediante ELISA de cuantificación.

Este protocolo describe el método para determinar el nivel de expresión de anticuerpos en sobrenadante de cultivo celular. El tiempo estimado de finalización es de 2 días con 96 muestras por persona. La Tabla 5 muestra los reactivos, consumibles y equipos requeridos.

Tabla 5: Reactivos, consumibles y equipo

| Ítem # | Descripción   | Proveedor Aprobado | Catálogo No. |
|--------|---|--------------------|--------------|
| 1      | Tween-20  | Invitrogen         | 11965-092    |
| 2      | Leche desnatada Carnation   | Supermercado local |              |
| 3      | PBS   | Irvine Scientific  | 9242         |
| 4      | IgG antihumano (H+L)-RHP  | Promega            | W4031        |
| 5      | IgG humana  | Invitrogen         | I12000C      |
| 6      | Placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp                          | Nalge Nunc         | 439454       |
| 7      | IgG anti-humana de cabra específica para Fc purificada por afinidad | Sigma              | 12136-1 ml   |
| 8      | Substrato líquido de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina               | Sigma              | T4444        |

20

Los siguientes reguladores son necesarios para este protocolo.

Solución de lavado

0,05% de Tween-20 en PBS

Solución de bloqueo

2% Leche desnatada Carnation en PBS

Día 1

11. Se cubren placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 100 µl de IgG anti-humano de cabra específica para Fc de 10 µg/ml purificada por afinidad en solución de recubrimiento.

5 12. Cubrir las placas con selladores e incubar durante la noche a 4°C.

Día 2

13. Decantar las placas y extraer el líquido residual.

14. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

15. Decantar las placas y extraer residuo líquido.

10 16. Añadir 200 µl de solución de bloqueo. Agitar a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.

17. Decantar las placas y extraer residuo líquido.

18. Añadir a las placas duplicados de 100 µl/pocillo de concentración normalizada de IgG de suero humano purificado en solución de bloqueo.

19. Añadir a las placas duplicados de 100 µl de sobrenadante del procedimiento de transfección.

15 20. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.

21. Decantar las placas y extraer el líquido residual.

22. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

23. Repita el paso 11-12 3 veces.

20 24. Añadir 100 µl de dilución 1:5000 de conjugado de anticuerpo anti-humano de cabra purificado por afinidad con HRP en solución de bloqueo a cada pocillo.

25. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.

26. Decantar las placas y extraer el líquido residual.

27. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

28. Repita el paso 17-18 3 veces.

25 29. Añadir 100 µl de sustrato Sigma TMB a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente y revisar cada 2-5 minutos.

30. Se añaden 100 µl de HCl 1N para detener la reacción.

31. Lectura a 450 nm.

Ejemplo 7. Determinación de afinidad de clones humanizados por ELISA de afinidad.

30 Este protocolo describe el método de comparación de la afinidad de anticuerpos en sobrenadante de cultivo celular. El tiempo estimado de terminación es de 2 días con 96 muestras por persona. La Tabla 6 muestra los reactivos, consumibles y equipos requeridos.

Tabla 6: Reactivos, consumibles y equipo

| Ítem # | Descripción | Proveedor aprobado | Catálogo No. |
|--------|-------------|--------------------|--------------|
|--------|-------------|--------------------|--------------|

## ES 2 609 439 T3

|   |   |                          |           |
|---|---|--------------------------|-----------|
| 1 | Tween-20  | Invitrogen               | 11965-092 |
| 2 | Leche desnatada Carnation                             | Supermercado local       |           |
| 3 | PBS   | Irvine Scientific        | 9242      |
| 4 | IgG antihumano (H+L)-RHP                              | Promega                  | W4031     |
| 5 | Control de anticuerpos                                | Dependiente del proyecto |           |
| 6 | Placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp            | Nalge Nunc               | 439454    |
| 7 | Antígeno  | Dependiente del proyecto |           |
| 8 | Substrato líquido de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina | Sigma                    | T4444     |

Los reguladores requeridos para este protocolo son como se describe en el Ejemplo 6.

Día 1

5 32. Recubrir placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 100 µl de 2 µg/ml de antígeno en solución de revestimiento.

33. Cubrir las placas con selladores e incubar durante la noche a 4°C.

Día 2

34. Decantar las placas y extraer el líquido residual.

35. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

10 36. Decantar las placas y extraer el líquido residual.

37. Añadir 200 µl de solución de bloqueo. Agitar a 200 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.

38. Decantar las placas y extraer residuo líquido.

39. Añadir duplicados de 100 µl/pocillo de anticuerpo de control (2 µg/ml) en solución de bloqueo a las placas.

40. Añadir duplicados de 100 µl de sobrenadante de la transfección (SOP 5A) a las placas.

15 41. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.

42. Decantar las placas y extraer el líquido residual.

43. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

44. Repita el paso 11-12 3 veces.

20 45. Añadir 100 µl de dilución 1:5000 de conjugado de anticuerpo anti-humano de cabra purificado por afinidad con HRP en solución de bloqueo a cada pocillo.

46. Agitar a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente.

47. Decantar las placas y extraer el líquido residual.

48. Añadir 200 µl de solución de lavado. Agitar a 200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

49. Repita el paso 17-18 3 veces.

50. Añadir 100 ul de sustrato Sigma TMB a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente y revisar cada 2-5 minutos.

51. Añadir 100 ul de HCl 1N para detener la reacción.

52. Leer a 450 nm.

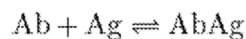
5 **Ejemplo 8.** Medida de afinidad de Biacore (Resonancia Plasmónica de Superficie) de BA001 y derivados humanizados.

10 Se utilizó BiAcCore 3000, GE Healthcare, para determinar curvas de unión y parámetros cinéticos. Se diluyó una Fc anti-humana (1.8 mg/ml) a una concentración de 50 ug/ml en regulador NaOAc (10 mM, pH 4.8) y se acopló a la matriz de dextrano carboximetilada de un chip sensor CM-5 utilizando la química de acoplamiento de amina tal como se describe en el manual de sistemas BiAcCore. Utilizando el asistente de preparación de superficie con el objetivo de 10000RU, los grupos carboxilo en las superficies del sensor se activaron primero con NHS/EDC seguido de la adición de Fc anti-humano. Los grupos activados restantes se bloquearon mediante la inyección de etanolamina 1M. Cada una de las células de flujo se acopló individualmente. Empleando estas condiciones, se prepararon las cuatro superficies de células de flujo que contenían 7554-9571 RU de Fc anti-humano. En experimentos preliminares, se determinó que tres inyecciones (15 ul a 30 ul/min) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM/CHAPS al 0.05% eliminarían eficientemente la inmunoglobulina unida y preservarían la capacidad de unión del Fc anti-humano inmovilizado.

20 Se realizaron experimentos en el BiAcCore 3000 a 25°C y un caudal de 30 ul/min. El anticuerpo candidato se disolvió en HBS (HEPES 10 mM con NaCl 0.15 M, EDTA 3.4 mM y 0.05% de tensioactivo P20 a pH 7.4) a 5 ug/ml. El analito, IL-6, se disolvió en HBS a 0.25, 0.125, 0.062, 0.031 y 0.015 ug/ml. 3\*30 ul de 5 ug/ml de anticuerpo BA001 se hicieron fluir sobre su respectiva célula de flujo seguido de inyecciones de 240 ul de cada concentración de IL-6 a 30 ul/min (fase de asociación) y un flujo intermedio de disolución de regulador de 1200 segundos). La superficie del chip se regeneró mediante tres inyecciones secuenciales de 15 ul cada una con 100 mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/0.05% de CHAPS. Las inyecciones de HBS sirven como referencia (sensograma en blanco) para la sustracción de índices de refracción a granel para análisis. Utilizando el modelo 1:1 en BiAevaluation 4.1, se realizaron tanto un ajuste local como un ajuste global para la disociación (kd,[s<sup>-1</sup>]) y asociación (ka,[M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>]) y la constante de disociación (KD, [M]) calculado (kd/ka).

25 El análisis se realizó utilizando BiAevaluation versión 3.0. Las constantes cinéticas se obtuvieron a partir de los datos del sensograma, ajustando las curvas experimentales a las ecuaciones de velocidad derivadas de los modelos de los mecanismos de interacción. Se determinó un análisis global usando un modelo de unión 1:1 con ajuste de RUmáx local, ka, kd y KD.

30 Se utilizaron las siguientes ecuaciones:



$$K_a = \frac{[AbAg]}{[Ab][Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

35 Los datos de Biacore para Mabs anti-IL6 humanizados antes de la maduración por afinidad se exponen en la figura 4.

**Ejemplo 9** Preparación de anticuerpos humanizados a partir de un anticuerpo molde anti-IL6

40 Las secuencias para el anticuerpo molde y los aciertos líder y las secuencias de ácido nucleico y proteína de fragmento se describen en la Publicación US No. 2010/0138945, Anti-IL-6 Humanized Antibodies, Frey et al., que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. En este ejemplo, el anticuerpo molde fue BA001; un anticuerpo anti-IL-6 humano. El anticuerpo modelo BA001 es la misma secuencia, pero fabricado en un sistema de expresión diferente, en comparación con CNTO328, un anticuerpo quimérico, murino humano, del documento US 2006/0257407, que se incorpora aquí como referencia.

45 La figura 1 muestra un esquema del método análogo al utilizado para la humanización del anticuerpo molde BA001. Los pasos detallados se describen en los Ejemplos 1-8. El anticuerpo molde se clonó, y se identificaron secuencias para cada región determinante de complementariedad (CDR). Se sintetizaron las CDR originales; y se preparó una biblioteca sintética de fragmentos de ADN ds basada en cada CDR. Se preparó un conjunto marcos humanos sólo a

- partir de anticuerpos humanos expresados funcionalmente obtenidos a partir de secuencias de líneas germinales humanas. Las CDR y los marcos humanos se ensamblaron, en este caso mediante ligación en fase líquida por etapas, para formar una biblioteca de codificación de dominio variable de cadena ligera humanizada (LC); y una biblioteca de codificación de dominio variable de cadena pesada humanizada (HC). Los dominios LC y HC se insertaron en un vector. El vector contiene además la secuencia que codifica el marco LC y HC 4. El vector con el inserto se transfecta y se expresa en una línea celular de mamífero para preparar una biblioteca de variantes de anticuerpos humanos de longitud completa; En este caso una biblioteca de variantes de IgG humana. La biblioteca se seleccionó para seleccionar anticuerpos humanizados que eran comparables o superiores al anticuerpo donante en al menos una característica, por ejemplo afinidad de antígeno o nivel de expresión en una línea celular de producción de mamífero.
- 5
- 10 La figura 2 muestra datos de la criba primaria de variantes humanizadas del anticuerpo molde BA001. La criba primaria comprendía ELISA de alto rendimiento de variantes en comparación con el anticuerpo donante, mostrado con un asterisco. Los ELISA se usaron para determinar la unión y cuantificación del antígeno. Los protocolos de ELISA se presentan en detalle en los Ejemplos.
- 15 La Figura 3 muestra los 8 aciertos de variantes de anticuerpos humanizados confirmados en términos de expresión y función en comparación con el anticuerpo molde BA001. La selección de éxitos se basó en el nivel de expresión de unión a antígeno en una línea celular de mamífero y diversidad de secuencias. Las secuencias de ADN y proteína para BA001 y las variantes humanizadas mostradas se describen en la Publicación de los Estados Unidos No. US 2010/0138945, que se incorpora aquí como referencia.
- 20 La figura 4 muestra datos de resonancia de plasmón de superficie BiaCore de afinidad de unión para anticuerpos anti-IL6 humanizados en comparación con un anticuerpo molde. Los datos para el molde, CNTO328, un anticuerpo quimérico, murino humano, es del documento US 2006/0257407, que se incorpora aquí como referencia. BA001 es también un anticuerpo molde que tiene la misma secuencia que el molde CNTO328, pero que se fabricó en un sistema de expresión diferente. Se obtuvieron los anticuerpos variantes humanizados h1-h8 sin maduración de afinidad adicional.
- 25 La figura 5 muestra los resultados de un ELISA en el que las variantes de anticuerpos humanizados bloquean la unión al antígeno del anticuerpo molde BA001.

Está claro que la invención se puede poner en práctica de maneras diferentes a la descrita en particular en la descripción y ejemplos anteriores.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir un anticuerpo humanizado, comprendiendo el método:

5 (a) sintetizar bibliotecas de fragmentos de ADN de doble hebra de cadena pesada de inmunoglobulina que comprenden bibliotecas que codifican fragmentos de regiones determinantes de complementariedad y bibliotecas de codificación de fragmentos de marcos, en las que cada biblioteca de fragmentos de regiones determinantes de complementariedad se deriva de un anticuerpo molde y cada biblioteca de fragmentos de marco se deriva de un conjunto de marco humano obtenido a partir de anticuerpos humanos expresados funcionalmente;

10 (b) sintetizar bibliotecas de fragmentos de ADN de doble hebra de cadena ligera de inmunoglobulina que comprenden bibliotecas de codificación de fragmentos de regiones determinantes de complementariedad y bibliotecas de codificación de fragmentos de marcos, en las que cada biblioteca de fragmentos de regiones determinantes de complementariedad se deriva del anticuerpo molde y cada biblioteca de fragmentos de marco se deriva de un conjunto de marcos obtenido a partir de anticuerpos humanos expresados funcionalmente;

15 (c) ensamblar las bibliotecas de fragmentos de cadena pesada mediante ligación en fase líquida por etapas de fragmentos codificantes de la estructura de cadena pesada y fragmentos codificantes de la región determinante de la complementariedad que codifican fragmentos en el orden de: marco1 - región determinante de complementariedad1 - marco2 - región determinante2 de complementariedad – marco3 - región determinante de complementariedad3 para producir una biblioteca de codificación de dominio variable de cadena pesada humanizada;

20 (d) ensamblar a partir de las bibliotecas de fragmentos de la cadena ligera por ligación en fase líquida escalonada de fragmentos codificantes de la estructura de cadena ligera y fragmentos codificantes de la región determinante de complementariedad que codifican fragmentos en el orden de: marco1 - región determinante de complementariedad1 - marco2 - región determinante2 de complementariedad – marco3 - región determinante de complementariedad3 para producir una biblioteca de codificación de dominio variable de cadena ligera humanizada;

25 (e) clonar la biblioteca de dominio variable de cadena pesada humanizada ensamblada y la biblioteca de dominio variable de cadena ligera ensamblada en un vector de expresión para crear una biblioteca de humanización y cuando dicho anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, el vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el marco 4 de cadena pesada derivado de un dominio variable de cadena pesada humana de un anticuerpo humano expresado funcionalmente y una secuencia de nucleótidos que codifica el marco 4 derivado de un dominio variable de cadena ligera humana de un anticuerpo humano expresado funcionalmente;

(f) transfectar la biblioteca de humanización en células;

30 (g) expresar anticuerpos humanizados en las células para crear una biblioteca de anticuerpos humanizada;

(h) seleccionar la biblioteca de anticuerpos humanizada para determinar el nivel de expresión de los anticuerpos humanizados; y

i) cribar la biblioteca de anticuerpos humanizada para determinar la afinidad de los anticuerpos humanizados para un antígeno en comparación con la afinidad del anticuerpo molde para el antígeno.

35 2. El método de la reivindicación 1, en el que el número de miembros de la biblioteca de anticuerpos humanizados es 10.000.000 miembros o menos, o 1.000.000 de miembros o menos, o 100.000 miembros o menos.

40 3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de clonación comprende clonar la biblioteca de dominio variable de cadena pesada humanizada ensamblada en el vector de expresión para crear una biblioteca de ADN de vector-dominio variable de cadena pesada y ligar la biblioteca de dominio variable de cadena ligera ensamblada en la biblioteca vector- cadena ligera para crear la biblioteca de humanización.

4. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de expresión comprende expresar tanto el dominio variable de la cadena pesada humanizada como el dominio variable de la cadena ligera humanizada a partir de un solo promotor.

45 5. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de cribado para un anticuerpo humanizado que tiene una o más características mejoradas adicionales cuando se compara con el anticuerpo molde; consistiendo la una o más características seleccionadas del grupo de: constante de disociación de equilibrio  $K_D$ ; estabilidad; temperatura de fusión  $T_m$ ;  $pI$ ; solubilidad; nivel de expresión; inmunogenicidad reducida y función efectora mejorada con relación al anticuerpo molde.

6. El método de la reivindicación 1, en el que las células se seleccionan de una línea de células huésped de producción

- de células eucarióticas seleccionada de un miembro del grupo que consiste en células de fibroblasto de ratón 3T3; células de fibroblastos de hámster sirio BHK21; células epiteliales de perro MDCK; células epiteliales humanas Hela; células epiteliales de rata canguro PtK1; células plasmáticas de ratón SP2/0; y células de plasma de ratón NS0; células de riñón embrionario humano HEK 293; células de riñón de mono COS; células de ovario de hámster chino CHO, CHO-S; células embrionarias de ratón R1; células embrionarias de ratón E14.1; células embrionarias humanas H1; células embrionarias humanas H9; células embrionarias humanas PER C.6; células de levadura de *S. cerevisiae*; y células de levadura *picchia*.
- 5 7. El método de la reivindicación 6, en el que la línea celular hospedadora de la producción de células eucarióticas es CHO-S o HEK293.
- 10 8. El método de la reivindicación 6, en el que la línea celular huésped de producción de células eucariotas es CHOK1SV o NS0.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la célula es un huésped de producción de células eucariotas con despliegue de superficie de células de anticuerpo.
- 15 10. El método de la reivindicación 9, en el que una o ambas de las etapas de selección se realizan en el huésped de producción de células eucariotas.
11. El método de la reivindicación 1, en el que una o ambas de las etapas de selección se seleccionan del grupo que consiste en ELISA cuantitativo; ELISA de afinidad; ELISPOT; citometría de flujo, inmunocitología, análisis de resonancia de plasmón de superficie Biacore®, ensayo de exclusión cinética Sapidyne KinExA™; SDS-PAGE; Transferencia Western, y HPLC.
- 20 12. El método de la reivindicación 5, en el que dicha una o más características tiene una mejora de 1% a 500%, relativa a una misma característica del anticuerpo molde o una mejora de 2 veces a 1000 veces, con respecto a una misma característica del anticuerpo molde.
13. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo humanizado exhibe afinidad igual o mayor para el antígeno en comparación con el anticuerpo molde.
- 25 14. El método de la reivindicación 1, en el que el vector de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena pesada y una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena ligera.
15. El método de la reivindicación 14, en el que los anticuerpos humanizados son anticuerpos de longitud completa.

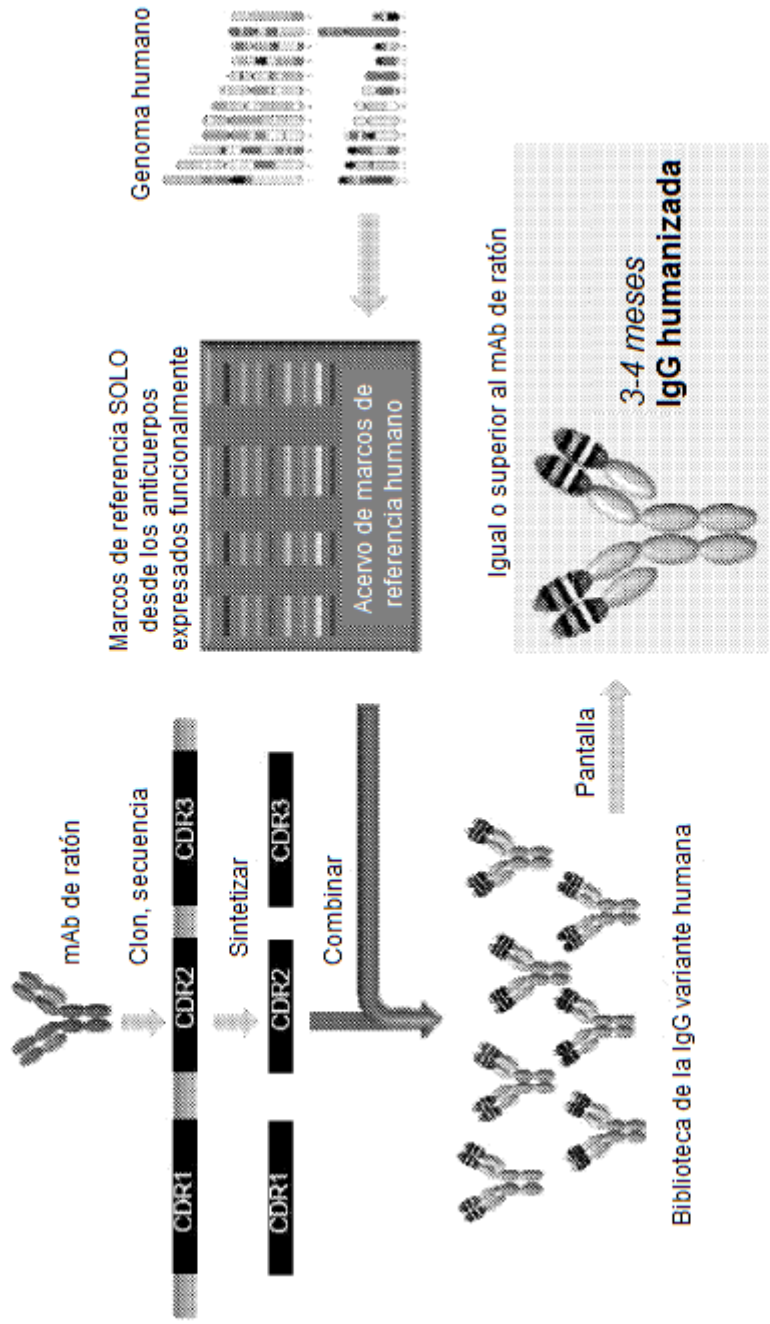
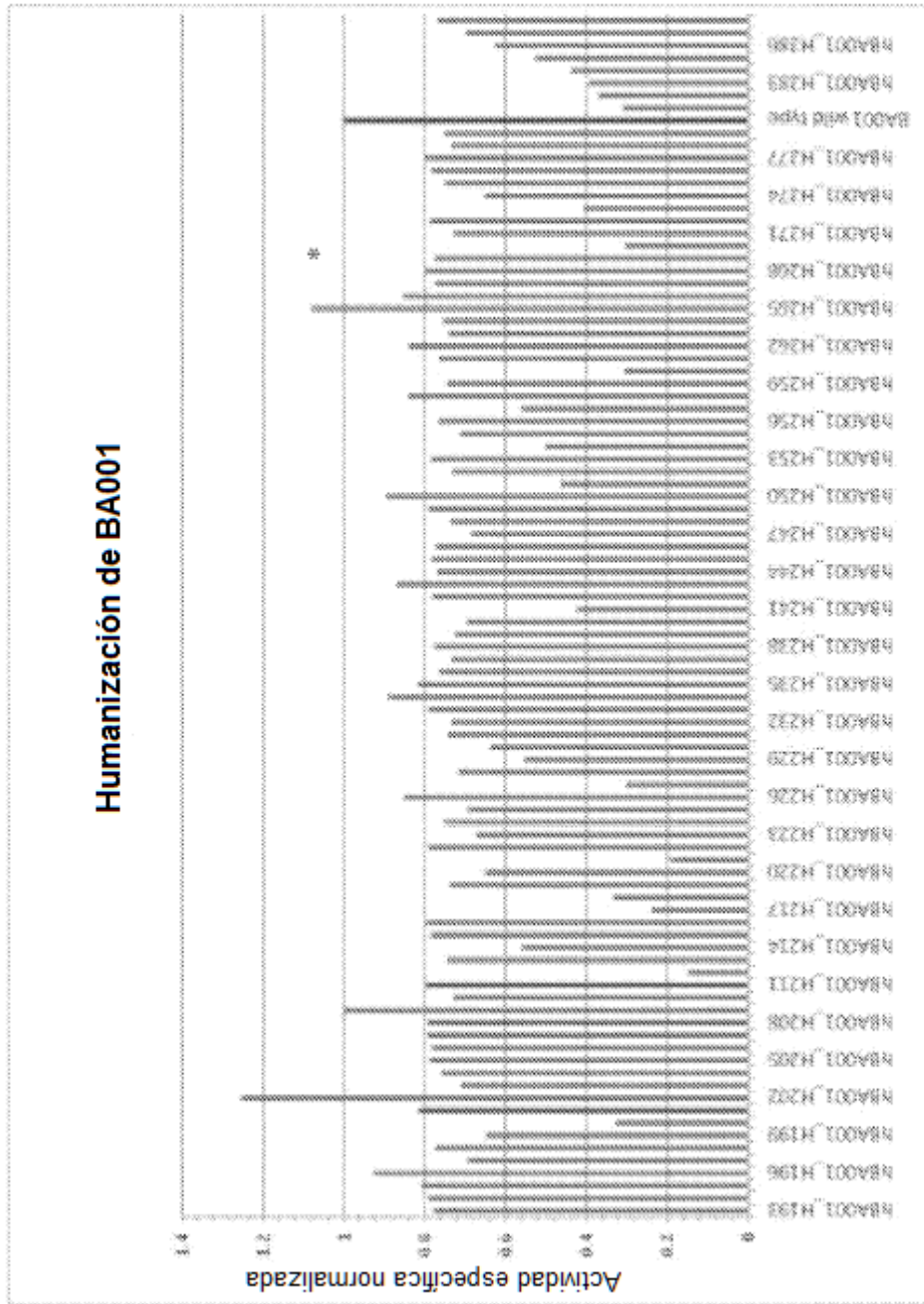


FIGURA 1





**FIGURA 2**

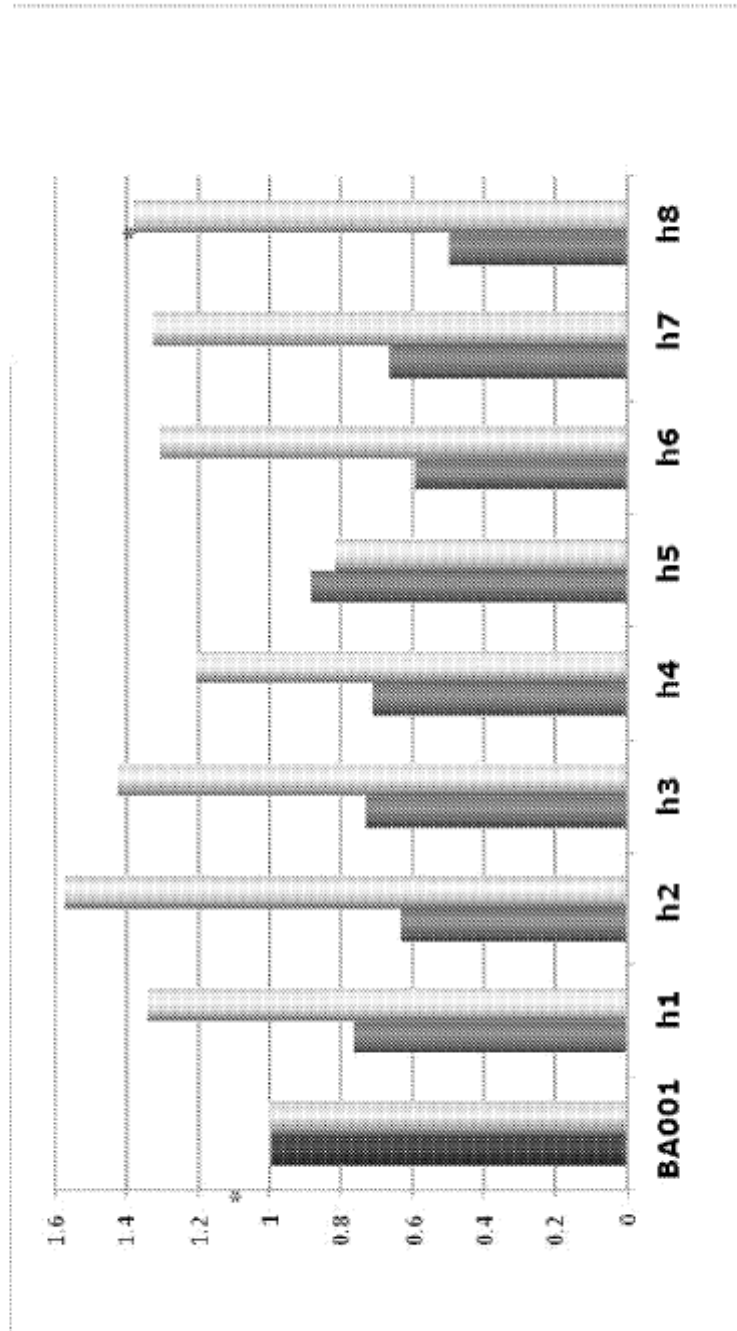


FIGURA 3

| Clon              | $K_a$ (1/Ms)                          | $K_d$ (1/s)                             | $K_D$ (M)                               |
|-------------------|---------------------------------------|---|---|
| <b>Molde</b>      |                                       |   |   |
| BA001             | $1.1 \times 10^6$                     | $6.2 \times 10^{-5}$                    | $57 \times 10^{-12}$                    |
| <b>h1 = BA399</b> | <b><math>0.973 \times 10^6</math></b> | <b><math>0.53 \times 10^{-5}</math></b> | <b><math>5.4 \times 10^{-12}</math></b> |
| h2 = BA436        | $1.20 \times 10^6$                    | $4.33 \times 10^{-5}$                   | $36 \times 10^{-12}$                    |
| h3 = BA802        | $1.48 \times 10^6$                    | $5.88 \times 10^{-5}$                   | $39.6 \times 10^{-12}$                  |
| h4 = BA808        | $1.31 \times 10^6$                    | $6.59 \times 10^{-5}$                   | $50.5 \times 10^{-12}$                  |
| h5 = BA840        | $1.01 \times 10^6$                    | $23.7 \times 10^{-5}$                   | $236 \times 10^{-12}$                   |
| h6 = BA848        | $1.25 \times 10^6$                    | $15.8 \times 10^{-5}$                   | $127 \times 10^{-12}$                   |
| h7 = BA890        | $7.45 \times 10^6$                    | $6.44 \times 10^{-5}$                   | $86.5 \times 10^{-12}$                  |
| h8 = BA939        | $1.44 \times 10^6$                    | $5.76 \times 10^{-5}$                   | $40 \times 10^{-12}$                    |

FIGURA 4

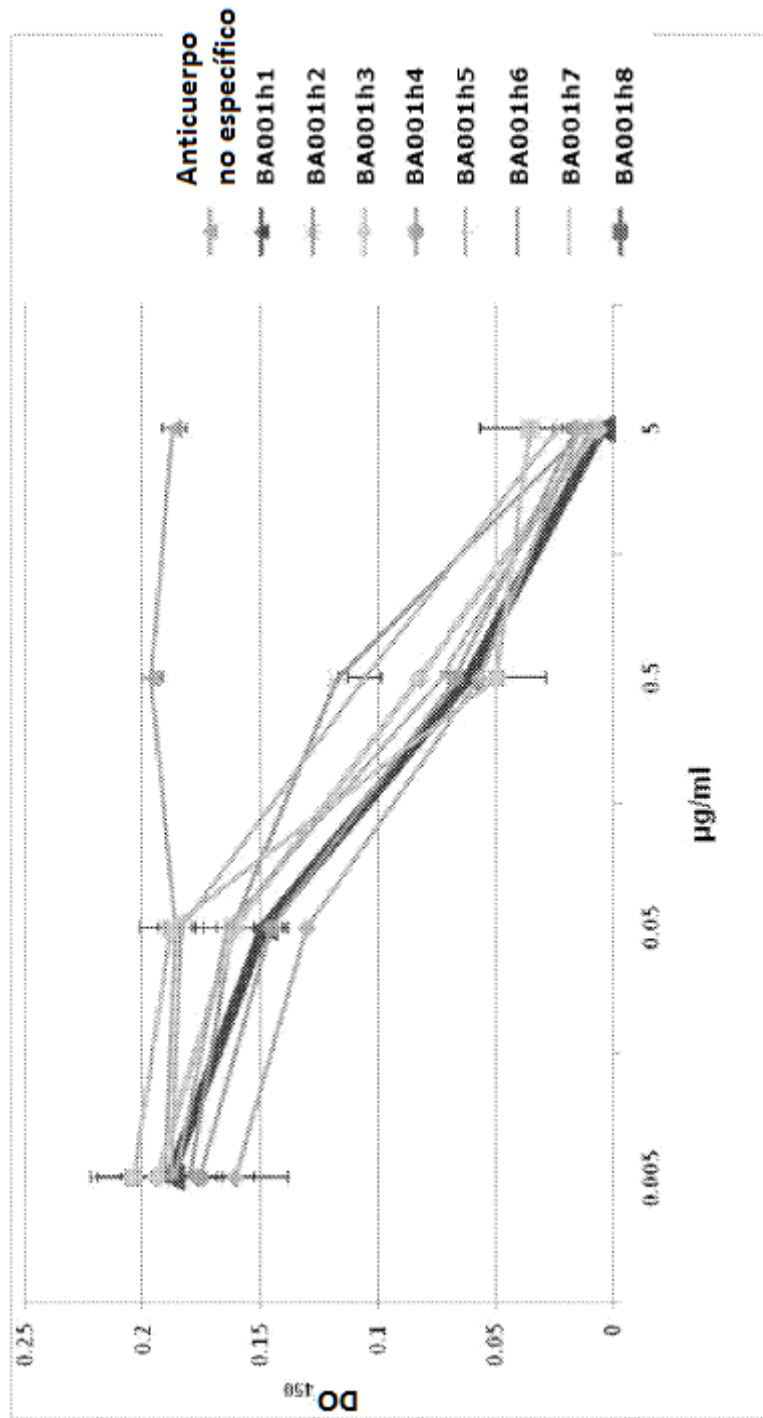


FIGURA 5