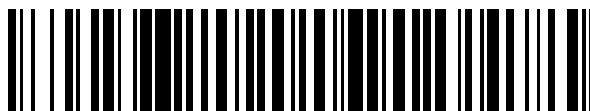


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 181**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 5/0781** (2010.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**G01N 33/537** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2010 PCT/CH2010/000044**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO2010096941**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2010 E 10705086 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2321354**

54 Título: **Métodos para identificar inmunoaglutinantes de antígenos de superficie celular**

30 Prioridad:

**24.02.2009 US 155041 P**

**24.02.2009 US 155105 P**

**02.06.2009 CH 8322009**

**25.06.2009 WO PCT/CH2009/000222**

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

**21.06.2017**

73 Titular/es:

**ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL  
RESEARCH UNIT LLC (100.0%)**

**Wagistrasse 21  
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**HULMANN-COTTIER, VALÉRIE y  
URECH, DAVID**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 618 181 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

Métodos para identificar inmunoaglutinantes de antígenos de superficie celular

## Información antecedente

5 Los inmunoaglutinantes, incluyendo los anticuerpos, sus conjugados y derivados son sumamente importantes desde el punto de vista comercial como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Los métodos tradicionales para la preparación o cribado de anticuerpos utilizan normalmente antígenos solubles. Sin embargo, para ciertos antígenos proteicos unidos a membrana, los epítopos conformacionales en los antígenos se alteran si los antígenos se solubilizan de la membrana, provocando el fallo de la preparación o cribado de los anticuerpos. Además, un problema principal en los métodos de inmunotransferencia y cromatografía de afinidad es que se seleccionarán anticuerpos con una afinidad moderada por el antígeno. Esto permite la inclusión de muchos anticuerpos con reactividad cruzada o adherentes, provocando cargas en los procedimientos secuenciales de cribado. Aunque las células que expresan antígeno unidos a membrana se han usado directamente para la preparación de anticuerpos, aún se carece de un método de cribado eficaz capaz de detectar y enriquecer anticuerpos de alta afinidad frente a antígenos de superficie celular. Erdile *et al.*, 2001 (Journal of Immunological Methods, 258:47-53) describen ELISA de células completas usando anticuerpos de ratón para la detección de antígenos expresados en superficie celular en células tumorales de mamífero. Smith *et al.*, 1997 (Biotechniques, 22:952-957) describen ELISA de células para detectar antígenos expuestos en superficie celular en sinoviocitos humanos y citometría de flujo para caracterizar dichas células. Panorchan Porntula *et al.*, 2006 (Journal of Cell Science, 119:66-74) describen un método para sondear las propiedades bioquímicas y biofísicas de las interacciones de unión entre cadherinas a nivel de molécula individual. Gawaz *et al.*, 1991 (Journal of Clinical Investigation, 88(4):1128-1134) estudiaron la agregación de células que albergan integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  usando citometría de flujo de dos colores. El documento WO 98/49286 se refiere a polipéptidos modificados por ingeniería cribando bibliotecas de polipéptidos proporcionadas en vectores modificados por ingeniería genética.

25 El documento US 2003/036092 se refiere a métodos de selección de proteínas, a partir de bibliotecas grandes, que tienen características deseables. Se ejemplifican métodos de expresión de enzimas y anticuerpos sobre la superficie de células hospedadoras y selección de las actividades deseadas. El documento WO 2005/103074 describe métodos para el cribado de bibliotecas combinatorias para permitir el aislamiento de polipéptidos de unión a ligando. En la técnica descrita, se expresan bibliotecas de proteínas de unión candidatas, tales como secuencias de anticuerpo, en el periplasma de bacterias gram negativas con un ligando diana. El documento WO2004102198 describe métodos de selección de al menos una célula B específica de antígeno desde una mezcla de células, donde el antígeno no se expresa y presenta en la superficie de una célula.

## Sumario de la invención

35 La invención, en el sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes. La invención se refiere a métodos para identificar anticuerpos, tales como anticuerpos scFv, capaces de unirse específicamente a antígenos de superficie celular. Los métodos de la invención generalmente comprenden poner en contacto células marcadas que expresan antígeno con células marcadas que expresan anticuerpo y aislar las células que expresan anticuerpo que se unen a las células que expresan antígeno usando un clasificador celular. Estos métodos son particularmente útiles para la identificación rápida y eficaz de anticuerpos frente a epítopos conformacionales presentes en proteínas integradas de membrana, tales como GPCR.

40 En un aspecto, la invención proporciona un método para identificar una célula que expresa anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de interés, donde el método comprende: proporcionar una pluralidad de células B que expresan anticuerpo originarias de un animal que se ha inmunizado con un antígeno diana o con ADN que codifica un antígeno de superficie celular, unido de forma funcional a un primer marcador clasificable; proporcionar una pluralidad de células que expresan antígeno unidas de forma funcional a un segundo marcador clasificable, donde el antígeno de interés se presenta en la superficie de la célula que expresa antígeno; poner en contacto las células que expresan antígeno con las células que expresan anticuerpo; y separar de la pluralidad de células que expresan antígeno, una o más células que expresan anticuerpo que pueden unirse específicamente a las células que expresan antígeno usando un clasificador celular (por ejemplo, un clasificador de células activadas por fluorescencia), donde la presencia del primero y segundo marcador clasificable en un complejo celular individual (por ejemplo, un complejo formado entre un antígeno y un receptor de células B) es indicativa de la unión de una célula que expresa anticuerpo con una célula que expresa antígeno, identificando de ese modo una célula que expresa un anticuerpo que se une a un antígeno de interés.

55 En algunas realizaciones, las células que expresan anticuerpo separadas se aíslan de forma clonal. En algunas realizaciones, las células que expresan anticuerpo se someten a expansión clonal. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo se aísla de las células que expresan anticuerpo. Los métodos adecuados para el aislamiento de la secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo incluyen PCR, por ejemplo, PCR de células individuales. La secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo puede aislarse después de que

las células se hayan aislado de forma clonal y/o después de la expansión clonal.

En algunas realizaciones, las células que expresan anticuerpo aisladas usando los métodos de la invención se someten a ensayos basados en células para caracterizar funcionalmente el anticuerpo. Los ensayos adecuados basados en células incluyen CELISA.

- 5 Los anticuerpos incluyen anticuerpos de ratón, de conejo, adaptados a conejo, de pollo, de camélido, adaptados a camélido, humanos, humanizados y quiméricos, los formatos adecuados de anticuerpo incluyen, sin limitación, Fab, Dab, nanocuerpo y scFv.

10 En algunas realizaciones, el antígeno de interés se expresa a partir de un gen exógeno. En otras realizaciones, el antígeno de interés es un antígeno modificado por ingeniería genética. En otras realizaciones, el antígeno de interés es una proteína integrada de membrana. Las proteínas integradas de membrana adecuadas incluyen, sin limitación, GPCR (por ejemplo, CXCR2) o canales de iones.

En algunas realizaciones, el primero o segundo marcador clasificable es un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, sin limitación, proteínas fluorescentes, conjugados de anticuerpo/flúor y marcadores celulares fluorescentes.

- 15 En algunas realizaciones, las células que expresan antígeno son células de levadura o de mamífero (por ejemplo, células humanas). En algunas realizaciones, las células que expresan antígeno expresan un antígeno exógeno. En algunas realizaciones, las células que expresan antígeno se transfectan con un vector de expresión.

20 En algunas realizaciones, las células que expresan anticuerpo son células B de conejo. Las células B se aíslan de un animal inmunizado, por ejemplo, un animal inmunizado por vacunación de ADN. En algunas realizaciones, las células que expresan anticuerpo comprenden un anticuerpo expresado a partir de un vector de expresión.

Se describe adicionalmente en este documento una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo identificado por los métodos de la invención.

25 También se describe en este documento un método de producción de un inmuoaglutinante capaz de unirse a un antígeno de interés, que comprende introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo identificada por los métodos de la invención en un entorno de expresión de modo que se produzca el anticuerpo codificado.

Se describe adicionalmente en este documento también un anticuerpo producido por los métodos de la invención.

30 En otro aspecto, la invención también proporciona un método para identificar un clon de célula B que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de interés que comprende: inmunizar un animal no humano con ADN que codifica un antígeno de superficie celular; aislar células B del animal inmunizado; marcar las células B con un primer marcador clasificable; proporcionar una pluralidad de células que expresan antígeno unidas de forma funcional a un segundo marcador clasificable donde el antígeno de interés se presenta en la superficie de la célula que expresa antígeno; poner en contacto las células que expresan antígeno con las células B; y separar de la pluralidad de células B, una o más células B que pueden unirse una o más células B que pueden unirse específicamente a las células que expresan antígeno usando un clasificador celular, donde la presencia del primero y segundo marcador clasificable en un complejo celular individual es indicativa de la unión de una célula B a una célula que expresa antígeno, identificando de ese modo un clon de célula B que se une a un antígeno de interés.

### Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 muestra esquemáticamente una célula B 1 marcada con un anticuerpo 2 fluorescente que interactúa con una célula que expresa diana teñida con un colorante 3 intracelular. (4: diana de elección/antígeno; 5: receptor de célula B (BCR)).

45 Figura 2: el proceso de selección FACS de células B de conejo que se unen a la diana soluble ESBA903. Fig. 2A: los linfocitos se sincronizaron de acuerdo con dispersión directa y lateral. Fig. 2B: entre ellas, las células IgG+ IgM- (probablemente células B de memoria) se seleccionaron (mostradas en círculo). Fig. 2C: se esperaba que las células con tinción doble con ESBA903-PE y ESBA903-PerCP (mostradas en círculo) codificarán y IgG de alta afinidad contra ESBA903. Las células que muestran la fluorescencia más brillante (sin círculo) se clasificaron en placas de 96 pocillos.

50 Figura 3: perlas recubiertas con anticuerpos anti-TNFalfa (marcados con PE) se unen a células CHO transfectadas con TNFalfa (panel superior). Las perlas de control recubiertas con anticuerpos anti-CD19 (marcados con APC) no se unían a células CHO transfectadas con TNFalfa (panel central). Las perlas recubiertas con anticuerpos anti-TNFalfa (marcados con PE) no se unían a células CHO de tipo silvestres (wt) (panel inferior). Los diagramas de puntos en la izquierda muestran dispersiones directas y laterales, que indican respectivamente el tamaño y la granularidad de los eventos. La población de perlas individuales (~3 um) se

sincronizó en P2. Las células CHO finalmente unidas a perlas (~30 um) se sincronizaron en P1. Los diagramas de puntos en el centro muestran los eventos P1 (células CHO) respecto a su tinción con PE o APC. Por tanto, las células que interactúan con perlas anti-TNF $\alpha$  aparecerían en el portal P3, y las células que interactúan con las perlas anti-CD19 aparecerían en el portal P4. A la derecha se detalla la estadística para cada muestra.

5 Figura 4: perlas recubiertas con anti-TNF $\alpha$ -PE y perlas recubiertas con anti-CD19-APC se mezclaron junto con células CHO transfectadas con TNF $\alpha$ . Las células CHO se sincronizaron (PI), y entre ellas las células que se unen a perlas recubiertas anti-TNF $\alpha$ -PE o perlas recubiertas anti-CD19-APC se muestran en los portales P3 y P4, respectivamente. Las perlas no unidas son visibles en el portal P2.

10 Figura 5a: análisis FACS de las tres diferentes suspensiones de CHO-TNF $\alpha$ -células B de memoria. Parte superior izquierda: diagrama de puntos que muestra la dispersión directa y lateral de la suspensión celular. Las células vivas, que comprenden una gran población de células CHO transgénicas y una pequeña población de células B de memoria, se sincronizaron. Parte inferior izquierda: diagrama de puntos que muestra la fluorescencia APC y FITC. Aquí, las células B de memoria (IgG+/IgM-) se sincronizaron. Estos dos diagramas de puntos eran idénticos para las tres muestras; por lo tanto, se muestran solamente una vez.

15 Figura 5b: histogramas y jerarquía de población de las 3 muestras: superior: células CHO-TNF $\alpha$  + ESBA105 + células B de memoria de conejo inmunizado con ESBA105; centro: células CHO-TNF $\alpha$  + ESBA105 + células B de memoria de conejo no inmunizado; inferior: células CHO-TNF $\alpha$  + células B de memoria de conejo inmunizado con ESBA105. En los histogramas, las células B de memoria que se unen a células CHO se sincronizaron.

20 Figura 6: análisis FACS de la suspensión que consiste en linfocitos inmunizados mezclados con células CHO transgénicas para TNF $\alpha$  "recubiertas" con ESBA105. Figura 6a: diagrama de puntos que muestra dispersión directa y lateral de la suspensión celular. Las células vivas, que comprenden una gran población de células CHO transgénicas y una pequeña población de linfocitos, se sincronizaron. Figura 6b: diagrama de puntos que muestra la fluorescencia APC y FITC. Aquí, las células B de memoria (IgG+/IgM-) se sincronizaron. Figura 6c: histograma que muestra la fluorescencia de calceína de células B de memoria, sincronizadas. La población sincronizada se clasificó (células B de memoria que se unen al complejo CHO-TNF $\alpha$ -ESBA105).

25 Figura 7: imágenes de microscopía de campo brillante de perlas recubiertas con IgG anti-TNF $\alpha$  que interactúan con células transgénicas CHO-TNF $\alpha$  (B220).

30 Figura 8: imágenes de microscopía de campo brillante (columna de la izquierda) e imágenes de microscopía de fluorescencia (columna de la derecha) de células CHO-TNF $\alpha$ / ESBA105 (células grandes) unidas a células B que tienen anticuerpos anti- ESBA105 sobre la superficie (células más pequeñas).

### Descripción detallada

La invención, en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

35 La invención se refiere a métodos para identificar inmunoaglutinantes, tales como anticuerpos scFv, capaces de unirse específicamente a antígenos de superficie celular. Los métodos de la invención comprenden generalmente poner en contacto células marcadas que expresan antígeno con células marcadas que expresan inmunoaglutinante y aislar células que expresan inmunoaglutinante que se unen a las células que expresan antígeno usando un clasificador celular. Estos métodos son particularmente útiles para la identificación rápida y eficaz de inmunoaglutinantes frente a epítopos conformacionales presentes en proteínas integradas de membrana, tales como GPCR. La invención también se refiere a inmunoaglutinantes y ácidos nucleicos que codifican inmunoaglutinante aislados identificados usando los métodos de la invención.

40 En un aspecto, la invención proporciona un método para identificar una célula que expresa anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de interés, donde el método comprende: proporcionar una pluralidad de células B que expresan anticuerpo originadas en un animal que se ha inmunizado con un antígeno diana o con ADN que codifica un antígeno de superficie celular, unido de forma funcional a un primer marcador clasificable; proporcionar una pluralidad de células que expresan antígeno unidas de forma funcional a un segundo marcador clasificable, donde el antígeno de interés se presenta en la superficie de la célula que expresa antígeno; poner en contacto la célula que expresa antígeno con las células que expresan anticuerpo; y separar de la pluralidad de células que expresan anticuerpo, una o más células que expresan anticuerpo que pueden unirse específicamente a las células que expresan antígeno usando un clasificador celular (por ejemplo, un clasificador de células activadas por fluorescencia), donde la presencia del primero y segundo marcador clasificable en un complejo celular individual (por ejemplo, un complejo formado entre un antígeno y un receptor de células B) es indicativa de la unión de la célula que expresa anticuerpo a la célula que expresa antígeno, identificando de ese modo una célula que expresa un anticuerpo que se une a un antígeno de interés.

En algunas realizaciones, las células separadas que expresan anticuerpo se aíslan de forma clonal.

55 En ciertas realizaciones, las células que expresan anticuerpo aisladas de forma clonal se someten a expansión clonal usando métodos bien conocidos para los expertos en la materia.

En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo se aísla de las células que expresan anticuerpo. El aislamiento de la secuencia de ácido nucleico puede suceder después del aislamiento clonal o

después de la expansión clonal. Los métodos adecuados para el aislamiento de la secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo incluyen PCR, por ejemplo, PCR de células individuales.

5 En algunas realizaciones, las células que expresan anticuerpo aisladas usando los métodos de la invención se someten a ensayos basados en células para caracterizar funcionalmente el anticuerpo. Los ensayos adecuados basados en células incluyen CELISA.

Los anticuerpos incluyen, anticuerpos de ratón, de conejo, adaptados a conejo, de pollo, de camélido, adaptados a camélido, humanos, humanizados y quiméricos. Los formatos de anticuerpo adecuados incluyen sin limitación, Fab, Dab nanocuerpo y scFv.

10 En algunas realizaciones, el antígeno de interés se expresa a partir de un gen exógeno. En otras realizaciones, el antígeno de interés es un antígeno modificado por ingeniería genética. En otras realizaciones, el antígeno de interés es una proteína integrada de membrana. Las proteínas integradas de membrana adecuadas incluyen, sin limitación, receptores acoplados a proteína G (GPCR, tales como CXCR2) o canales de iones.

15 En algunas realizaciones, el primero o segundo marcador clasificable es un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, sin limitación, proteínas fluorescentes, conjugados de anticuerpo/flúor y marcadores celulares fluorescentes.

En algunas realizaciones, las células que expresan antígeno son células de levadura o de mamífero (por ejemplo, células humanas). En algunas realizaciones, las células que expresan antígeno expresan un antígeno exógeno. En algunas realizaciones, las células que expresan antígeno se transfectan con un vector de expresión.

20 En algunas realizaciones, las células que expresan anticuerpo son células B de conejo. Las células B se aíslan de un animal inmunizado, por ejemplo, un animal inmunizado por vacunación de ADN. En algunas realizaciones, las células que expresan anticuerpo comprenden un anticuerpo expresado a partir de un vector de expresión.

En otro aspecto, se describe en este documento una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un anticuerpo identificado por los métodos de la invención.

25 En otro aspecto, se describe en este documento un método de producción de un inmuoaglutinante capaz de unirse a un antígeno de interés, que comprende introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo identificada por los métodos de la invención en un entorno de expresión de modo que se produzca el anticuerpo codificado.

En otro aspecto, se describe en este documento un anticuerpo producido por los métodos de la invención.

30 En otro aspecto, la invención también proporciona un método para identificar un clon de célula B que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de interés que comprende: inmunizar un animal no humano con ADN que codifica un antígeno de superficie celular; aislar células B del animal inmunizado; marcar las células B con un primer marcador clasificable; proporcionar una pluralidad de células que expresan antígeno unidas de forma funcional a un segundo marcador clasificable, donde el antígeno de interés se presenta en la superficie de la célula que expresa antígeno; poner en contacto las células que expresan antígeno con las células B; y separar de la pluralidad de células B, una o más células B que pueden unirse específicamente a las células que expresan antígeno usando un clasificador celular, donde la presencia del primero y segundo marcador clasificable en un complejo celular individual es indicativa de la unión de una célula B a una célula que expresa antígeno, identificando de ese modo un clon de célula B que se une a un antígeno de interés.

### **Definiciones**

40 Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definirán ciertos términos del siguiente modo. Se exponen definiciones adicionales durante toda la descripción detallada.

45 El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno", "polipéptido de unión a antígeno" o "inmuoaglutinante") o cadena sencilla del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H), y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más

conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada VH y VL está compuesto de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo aminoterminal hasta el extremo carboxiterminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas, pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores hospedadores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a una molécula de anticuerpo en que (a) la región constante, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión a antígeno (región variable) esté unido a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo ") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, TNF). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento de F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los fragmentos VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un dominio individual tal como un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes diferentes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les posibilite prepararse como una única cadena proteica en que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Se pretende que dichos anticuerpos de cadena sencilla también estén abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia, y los fragmentos se criban para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno pueden producirse por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden ser de diferente isotipo, por ejemplo, un anticuerpo IgG (por ejemplo, un subtipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE, o IgM.

El término "inmunoaglutinante" se refiere a una molécula que contiene todo o una parte del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, todo o parte del dominio variable de cadena pesada y/o ligera, de modo que el inmunoaglutinante reconoce específicamente un antígeno diana. Ejemplos no limitantes de inmunoaglutinantes incluyen moléculas de inmunoglobulina de longitud completa y scFv, así como fragmentos de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fab' que es esencialmente un Fab con parte de la región de bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.<sup>a</sup> ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (vi) un anticuerpo de dominio individual tal como un fragmento Dab (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH o VL, un anticuerpo de camélido (véase, Hamers-Casterman, *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993), y Dumoulin, *et al.*, *Protein Science* 11:500-515 (2002)) o de tiburón (por ejemplo, Ig-NAR de tiburón Nanobodies®); y (vii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes.

Como se usa en este documento, la expresión "propiedad funcional" es una propiedad de un polipéptido (por ejemplo, un inmunoaglutinante) para la que es deseable y/o ventajosa una mejora (por ejemplo, respecto a un polipéptido convencional) para un experto en la materia, por ejemplo, para mejorar las propiedades de fabricación o eficacia terapéutica del polipéptido. En una realización, la propiedad funcional es estabilidad mejorada (por ejemplo, estabilidad térmica). En otra realización, la propiedad funcional es solubilidad mejorada (por ejemplo, en condiciones celulares). En otra realización más, la propiedad funcional es ausencia de agregación. En otra realización más, la propiedad funcional es una mejora en la expresión (por ejemplo, en una célula procarionota). En otra realización más, la propiedad funcional es una mejora en el rendimiento de replegamiento después de un proceso de purificación de cuerpos de inclusión. En ciertas realizaciones, la propiedad funcional no es una mejora en la afinidad de unión a antígeno.

El término "regiones flanqueantes" se refiere a las partes reconocidas en la técnica de una región variable de anticuerpo que existen entre las regiones CDR más divergentes. Dichas regiones flanqueantes se mencionan típicamente como regiones flanqueantes 1 a 4 (FR1, FR2, FR3, y FR4) y proporcionan una estructura para

mantener, en el espacio tridimensional, las tres CDR encontradas en una región variable de anticuerpo de cadena pesada o ligera, de modo que las CDR puedan formar una superficie de unión a antígeno. Dichas regiones flanqueantes también pueden mencionarse como estructuras que proporcionan soporte para la presentación de las CDR más divergentes. Otras CDR y regiones flanqueantes de la superfamilia de inmunoglobulinas, tales como repeticiones de anquirina y fibronectina, pueden usarse como moléculas de unión a antígeno (véanse también, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.300.064, 6.815.540 y la publicación de Estados Unidos n.º 20040132028).

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Las expresiones "unión específica", "unión selectiva", "se une selectivamente" y "se une específicamente" se refieren a la unión del anticuerpo a un epítipo en un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad (KD) de aproximadamente menos de  $10^{-7}$  M, tal como de aproximadamente menos de  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o incluso inferior.

El término " $K_D$ ", se refiere a la constante en equilibrio de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. Típicamente, los anticuerpos de la invención se unen a un antígeno con una constante en equilibrio de disociación ( $K_D$ ) de menos de aproximadamente  $10^{-7}$  M, tal como menos de aproximadamente  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o incluso inferior, por ejemplo, como se determina usando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE.

Como se usa en este documento, "identidad" se refiere a la coincidencia de secuencia entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad monomérica de aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en cada uno de los dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición. El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias dividida por la cantidad de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes, entonces las dos secuencias tienen un 60 % de identidad. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten un 50 % de identidad (3 de las 6 posiciones totales son coincidentes). Generalmente, una comparación se hace cuando dos secuencias se alinean para dar la identidad máxima. Dicha alineación puede proporcionarse usando, por ejemplo, el método de Needleman *et al.*, (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453, implementado convenientemente por programas informáticos tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos ponderados PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Secuencias "similares" son aquellas que, cuando se alinean, comparten restos de aminoácido idénticos y similares, donde restos similares son sustituciones conservativas para restos correspondientes de aminoácido en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una "sustitución conservativa" de un resto en una secuencia de referencia es una sustitución por un resto que es física o funcionalmente similar al resto de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Por tanto, una secuencia "modificada por sustitución conservativa" es una que difiere de una secuencia de referencia o una secuencia de tipo silvestre en que están presentes una o más sustituciones conservativas. El "porcentaje de similitud" entre dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones que contienen restos coincidentes o sustituciones conservativas compartidas por las dos secuencias dividida por la cantidad de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes y 2 de 10 posiciones contienen sustituciones conservativas, entonces las dos secuencias tienen un 80 % de similitud positiva.

Como se usa en este documento, la expresión "modificaciones conservativas de secuencia" pretende hacer referencia a modificaciones de aminoácidos que no afectan negativamente o alteran las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas de secuencia incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, pueden introducirse modificaciones por técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen aquellas en que el resto de aminoácidos se reemplaza con un resto de aminoácido que tienen una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen

aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho puede remplazarse con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Los métodos de identificación de sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell *et al.*, *Biochem. J.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

"Secuencia consenso de aminoácidos" como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede generarse usando una matriz de al menos dos, y más preferiblemente más, secuencias alineadas de aminoácidos, y permitiendo huecos en la alineación, de modo que sea posible determinar el resto de aminoácido más frecuente en cada posición. La secuencia consenso es esa secuencia que comprende los aminoácidos que están más frecuentemente representados en cada posición. En el caso de que dos o más aminoácidos estén igualmente representados en una única posición, la secuencia consenso incluye ambos o todos esos aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de una proteína puede analizarse a diversos niveles. Por ejemplo, puede mostrarse conservación o variabilidad a nivel de un resto individual, a nivel de múltiples restos, múltiples restos con huecos, etc. los restos pueden mostrar conservación del resto idéntico o pueden conservarse a nivel de clase. Ejemplos de clases de aminoácidos incluyen grupos R polares, pero no cargados (serina, treonina, asparagina y glutamina); grupos R cargados positivamente (lisina, arginina e histidina); grupos R cargados negativamente (ácido glutámico y ácido aspártico); grupos R hidrófobos (alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, valina y tirosina); y aminoácidos especiales (cisteína, glicina y prolina). Otras clases son conocidas para los expertos en la materia y pueden definirse usando determinaciones estructurales u otros datos para evaluar la capacidad de sustitución. En ese sentido, un aminoácido sustituible puede referirse a cualquier aminoácido que pueda sustituirse y mantener la conservación funcional en esa posición.

Se reconocerá, sin embargo, que aminoácidos de la misma clase pueden variar en grado por sus propiedades biofísicas. Por ejemplo, se reconocerá que ciertos grupos R hidrófobos (por ejemplo, alanina) son más hidrófilos (es decir, de mayor hidrofiliidad o inferior hidrofobicidad) que otros grupos R hidrófobos (por ejemplo, valina o leucina). La hidrofiliidad o hidrofobicidad relativa puede determinarse usando métodos reconocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Rose *et al.*, *Science*, 229:834-838 (1985) y Cornette *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 195: 659-685 (1987)).

Como se usa en este documento, cuando una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una primera secuencia VH o VL) se alinea con una o más secuencias adicionales de aminoácidos (por ejemplo, una o más secuencias VH o VL en una base de datos), una posición de aminoácido en una secuencia (por ejemplo, la primera secuencia VH o VL) puede compararse con una "posición correspondiente" en la una o más secuencias adicionales de aminoácidos. Como se usa en este documento, la "posición correspondiente" representa la posición equivalente en la secuencia o secuencias que se están comparando cuando las secuencias se alinean de forma óptima, es decir, cuando las secuencias se alinean para conseguir el mayor porcentaje de identidad o porcentaje de similitud.

La expresión "molécula de ácido nucleico", se refiere a moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. Un ácido nucleico está "unido de forma funcional" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia.

El término "vector", se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector vírico, donde pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en que e introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador.

La expresión "célula hospedadora" se refiere a una célula en que se ha introducido un vector de expresión. Las células hospedadoras pueden incluir células bacterianas, microbianas, vegetales o animales. Las bacterias que son susceptibles a transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. Los microbios adecuados incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las líneas de células hospedadoras animales adecuadas incluyen células CHO (líneas de ovario de hámster chino) y NSO.



5 Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", se refieren a medidas terapéuticas y preventivas descritas en este documento. Los "tratamientos" emplean la administración a un sujeto, que necesita dicho tratamiento, de un anticuerpo descrito en este documento, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno mediado por GPCR o un sujeto que finalmente puede adquirir dicho trastorno, para prevenir, curar, retardar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas del trastorno o trastorno recidivante, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

10 La expresión "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir o conseguir al menos parcialmente el efecto deseado. La expresión "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o detener al menos parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que se esté tratando y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente.

El término "sujeto" se refiere a cualquier humano o animal no humano. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar a un sujeto con un trastorno mediado por GPCR.

15 El término "conejo" como se usa en este documento se refiere a un animal que pertenece a la familia de los lepóridos.

20 La expresión "clasificador celular" se refiere a cualquier medio para separar células basándose en la presencia de un marcador "clasificable" detectable. Dicho medio incluye, sin limitación, un clasificador de células activadas por fluorescencia. Puede usarse cualquier marcador celular como marcador clasificable incluyendo, sin limitación, proteínas fluorescentes, por ejemplo, proteína verde fluorescente, conjugados de anticuerpo/fluór y marcadores celulares fluorescentes, por ejemplo, ionóforos fluorescentes de calcio.

25 La expresión "complejo celular" se refiere a una o más células que expresan antígeno unidas a una o más células que expresan anticuerpo, donde la unión está mediada por el antígeno sobre la superficie de la célula que expresa antígeno. En algunas realizaciones, la unión de una célula que expresa antígeno a una célula que expresa anticuerpo consiste en una interacción directa entre el antígeno sobre la superficie de la célula que expresa antígeno y el anticuerpo sobre la superficie de la célula que expresa anticuerpo.

La expresión "aislamiento clonal" se refiere a cualquier medio para el aislamiento de clones celulares individuales de una población celular. Los medios adecuados incluyen, sin limitación, la dilución limitante y la transferencia de células a placas de múltiples pocillos de modo que cada pocillo contenga no más de una única célula.

30 La expresión "obtener la secuencia de ácido nucleico que codifica el inmunoaglutinante" se refiere a cualquier medio para obtener la secuencia de ácido nucleico de un inmunoaglutinante expresado por una célula que expresa inmunoaglutinante. Los medios adecuados incluyen, sin limitación, aislamiento de ácido nucleico, amplificación por PCR y secuenciación de ADN de la secuencia de ácido nucleico que codifica el inmunoaglutinante a partir de la célula que expresa el inmunoaglutinante. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico que codifican inmunoaglutinantes se amplifican por PCR a partir de células individuales, es decir, "PCR de células individuales".

35 La expresión "antígeno exógeno" se refiere a un antígeno que no se expresa normalmente en una célula hospedadora particular. Por ejemplo, un antígeno exógeno puede ser de un reino, filo, clase, orden, género o especie diferente de la célula hospedadora, por ejemplo, un antígeno humano expresado en una célula de levadura. De forma adicional o alternativa, un antígeno exógeno puede ser de la misma especie, pero expresado de forma inapropiada en esa célula hospedadora, por ejemplo, un antígeno específico de pulmón expresado en una célula cerebral. "Antígeno exógeno" también se refiere a un antígeno mutante no encontrado normalmente en una célula normal, por ejemplo, un antígeno mutante específico de cáncer expresado en una célula pulmonar.

45 La expresión "antígeno modificado por ingeniería genética" se refiere a cualquier antígeno que se ha producido por técnicas de ADN recombinantes e incluye antígenos que son quimeras o contienen mutaciones puntuales, deleciones y/o inserciones. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

50 Diversos aspectos de la invención se describen en mayor detalle en las siguientes subsecciones. Se entiende que las diversas realizaciones, preferencias e intervalos pueden combinarse a voluntad. Además, dependiendo de la realización específica, pueden no tener aplicación definiciones, realizaciones o intervalos seleccionados.

El método de cribado puede ser usando FACS para identificar y separar células que expresan anticuerpo en adherencia con células que expresan el antígeno correspondiente.

### **Expresión de antígeno**

5 El antígeno diana para la preparación de anticuerpos puede ser cualquier proteína, péptido, nucleótido, carbohidrato, lípido y otras moléculas que son solubles o se expresan sobre la superficie celular o están integradas en la membrana plasmática. Los antígenos pueden ser nativos o sintéticos. Preferiblemente, un antígeno diana es una proteína o péptido. Ejemplos no limitantes de un antígeno diana incluyen CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CFTR, CIC-1, CIC-2, CIC-4, CIC-5, CIC-7, CIC-Ka, CIC-Kb, bestrofinas, TMEM16A, receptor de GABA, receptor de glicina, transportadores ABC, NAV1.1, NAV1.2, NAV1.3, 10 NAV1.4, NAV1.5, NAV1.6, NAV1.7, NAV1.8, NAV1.9, receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P1R), canal de NMDA, etc. En una realización, el antígeno diana es una proteína transmembrana. En otra realización, el antígeno diana es una proteína de múltiples dominios transmembrana, por ejemplo, receptores acoplados a proteína G (GPCR), canales de iones, etc.

15 La familia de GPCR tiene al menos 250 miembros (Strader *et al.*, FASEB J., 9:745-754, 1995; Strader *et al.*, Annu. Rev. Biochem., 63:101-32, 1994).se ha estimado que el uno por ciento de los genes humanos pueden codificar GPCR. Los GPCR se unen a una amplia diversidad de ligandos que varían desde fotones, aminas biogénicas pequeñas (es decir, epinefrina e histamina), péptidos (es decir, IL-8), hasta hormonas glucoproteicas grandes (es decir, hormona paratiroidea). Tras la unión a ligando, los GPCR regulan las rutas de señalización intracelular activando proteínas que se unen a nucleótidos de guanina (proteínas G). De forma interesante, los GPCR tienen 20 homólogos funcionales en citomegalovirus y herpesvirus humanos, lo que sugiere que los GPCR se pueden haber adquirido durante la evolución por patogénesis vírica (Strader *et al.*, FASEB J., 9:745-754, 1995; Arvanitakis *et al.*, Nature, 385:347-350, 1997; Murphy, Annu. Rev. Immunol. 12:593-633, 1994).

25 El rasgo característico de la mayoría de GPCR que se conoce hasta ahora es que siete grupos de restos de aminoácidos hidrófobos están localizados en la estructura primaria y pasan a través (abarcan) la membrana celular en cada región de la misma. Se cree que los dominios representan hélices alfa transmembrana conectadas por tres bucles intracelulares, tres bucles extracelulares y dominios amino y carboxilo terminales (K. Palczewski *et al.*, Science 289, 739-45 (2000)). La mayoría de GPCR tienen restos de cisteína conservados individuales en cada uno de los dos primeros bucles extracelulares que forman enlaces disulfuro que se cree que estabilizan la estructura de la proteína funcional. Las 7 regiones transmembrana se denominan TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, y TM7. Se 30 sabe bien que estas estructuras detalladas anteriormente son comunes entre las proteínas receptoras acopladas a proteína G y que las secuencias de aminoácidos correspondientes al área donde la proteína pasa a través de la membrana (región que abarca membrana o región transmembrana) y las secuencias de aminoácidos cerca de la región que abarca membrana a menudo están altamente conservadas entre los receptores. Por tanto, debido al alto grado de homología en los GPCR, la identificación de novedosos GPCR, así como la identificación de partes tanto 35 intracelulares como extracelulares de dichos novedosos miembros, se consigue fácilmente por los expertos en la materia. A modo de ejemplo, el libro de Watson y Arkinstall (1994) proporciona las secuencias de más de 50 GPCR. El libro describe adicionalmente, para cada secuencia, los restos precisos que comprenden cada uno de los dominios transmembrana.

40 Los sitios de unión para ligandos pequeños de receptores acoplados a proteína G se cree que comprenden un bolsillo hidrófilo localizado cerca de la superficie extracelular y formado por varios dominios transmembrana receptores acoplados a proteína G, estando rodeado dicho bolsillo por restos hidrófobos de los receptores acoplados a proteína G. El lado hidrófilo de cada hélice transmembrana de receptor acoplado a proteína G se postula que está enfocado hacia dentro y forma el sitio de unión del ligando polar. TM3 se ha implicado en varios receptores acoplados a proteína G que tiene un sitio de unión a ligando, tal como incluyendo el resto aspartato en TM3. 45 Adicionalmente, las serinas en TM5, una asparagina en TM6 y fenilalaninas o tirosinas en TM6 o TM7 también están implicadas en la unión del ligando. El sitio de unión al ligando para receptores de hormonas peptídicas y receptores con otros ligandos más grandes tales como glucoproteínas (LH, FSH, hCG, TSH), y las clases Ca<sup>2+</sup>/glutamato/GABA de receptores probablemente residen en los dominios y bucles extracelulares.

50 Un evento clave del cambio de receptor inactivo a activo es, los cambios conformacionales inducidos por ligando de las hélices transmembrana 3 (TM3) y 6 (TM6) de los GPCR que tienen 7 hélices transmembrana (U. Gether, y B. K. Kolbilka, J. Biol. Chem. 273, 17979-17982 (1998)). Estos movimientos de las hélices, a su vez, alteran la conformación de los bucles intracelulares del receptor para promover la activación de proteínas G heterotriméricas asociadas. Estudios de mutagénesis (S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. A. Kjelsberg, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz, J. Biol. Chem. 267, 1633-1639 (1992); E. Kostenis, B. R. Conklin y J. Wess, Biochemistry 36, 1487-1495 (1997); M. A. Kjelsberg, S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. G. Caron, y R. J. Lefkowitz, J. Biol. Chem. 267, 1430-1433 (1992)) 55 demostraron que el tercer bucle intracelular (i3) media una gran parte del acoplamiento entre el receptor y la proteína G. Los bucles i3 expresados como minigenes también han demostrado competir directamente con receptores adrenérgicos por la unión a Gq (L. M. Luttrell, J. Ostrowski, S. Cotecchia, H. Kendal y R. J. Lefkowitz, Science 259, 1453-1457 (1993)), o pueden activar proteínas G como péptidos solubles en condiciones sin células (T.

Okamoto *et al.*, Cell 67, 723-730 (1991)).

El antígeno de interés puede ser de una fuente endógena en la célula diana (a veces también mencionada como célula que expresa antígeno). Como alternativa, las moléculas exógenas pueden introducirse en células para que expresen el antígeno. La introducción del antígeno en las células puede ponerse en práctica por cualquier método conocido para un experto en la materia. En una realización, puede insertarse un polinucleótido que codifica el antígeno como un polipéptido *in vitro* en un vector, que puede introducirse adicionalmente en las células diana para su expresión. El polinucleótido puede contener la secuencia de ADNc, la secuencia de ADN u otras secuencias conocidas en la técnica, del antígeno diana. El vector puede ser un vector plasmídico, cósmido, de liposomas u otros vectores naturales o artificiales conocidos en la técnica. La introducción puede ser un proceso de transfección, transformación, infección, microinyección directa de materiales, suministro de partículas biolísticas, electroporación u otros métodos conocidos en la técnica. La célula diana que expresa el antígeno puede ser cualquier célula conocida en la técnica incluyendo, por ejemplo, células recogidas directamente de animales, por ejemplo, células cancerosas, células no cancerosas, células primarias, etc., o células con ingeniería molecular, por ejemplo, células de cultivo (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK293, etc.), células inmortalizadas, células transfectadas/infectadas, células T, etc. como alternativa, la célula diana puede provenir de fuentes no animales, por ejemplo, bacterias, insectos, etc. En una realización, las células que expresan el antígeno diana son células de levadura, preferiblemente esferoblastos de levadura. Como alternativa, la "célula" diana puede ser un cuerpo o estructura de tipo célula artificial, por ejemplo, liposoma, cuerpo de membrana monocapa, etc. la expresión del antígeno en la célula diana o cuerpos de tipo célula puede ser transitoria, es decir, la expresión se atenuará o detendrá después de un periodo comparativamente corto de tiempo (por ejemplo, de minutos a varios días) o estable, es decir, la expresión estará sostenida a un nivel comparativamente estable durante un tiempo comparativamente largo (por ejemplo, después de varios días o varias generaciones de células. En una realización preferible, el antígeno se expresa sobre la superficie extracelular de la membrana plasmática de la célula diana. En otra realización preferible, el antígeno es un antígeno integrado o de múltiples dominios de membrana. Para llegar a su localización en la membrana plasmática, el antígeno puede expresarse directamente en estas localizaciones o puede trasladarse a estas localizaciones después de su expresión en el citoplasma de la célula diana. Este traslado puede ser un proceso natural de la célula diana o un proceso modificado por ingeniería por, por ejemplo, unión de una molécula señal/marca (por ejemplo, señales de clasificación de Golgi, anticuerpos contra ciertas moléculas unidas a membrana, etc.), injerto de anclaje (por ejemplo, un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI)) o reticulación química con el antígeno, mutación del antígeno u otros métodos conocidos en la técnica, antes o después de la expresión del antígeno, que conduce a su traslado.

### **Células que expresan inmunoaglutinante e inmunización**

Las células que expresan anticuerpo a seleccionarse por el método descrito en este documento son células B de mamífero, preferiblemente células C de conejo.

Las células B se originan en un animal que se inmunizó con la diana de interés. La inmunización del animal puede ponerse en práctica por cualquier método conocido por un experto con habilidades habituales en la materia. Típicamente, las células B se aíslan de órganos linfáticos de un animal inmunizado (tal como bazo o ganglios linfáticos). En una realización preferida, la inmunización del antígeno de interés se hace por inmunización/vacunación de ADN. Como alternativa, las células que expresan el antígeno diana se inyectan en animales (por ejemplo, conejo, rata, ratón, hámster, oveja, cabra, pollo, etc.) para la inmunización. El animal preferido para esta etapa de inmunización es un conejo. La inmunización/vacunación de ADN induce una rápida respuesta inmunitaria y permite la expresión nativa, y habitualmente la expresión nativa solamente, de antígenos diana. Como esto no implica la expresión y manipulación de proteínas recombinantes, este proceso es más eficaz y rentable que la inmunización tradicional con proteínas recombinantes. Además, de forma más importante, el antígeno expresado *in vivo* posee las mismas estructuras secundarias e incluso puede poseer las mismas modificaciones postraduccionales que la proteína diana en su contexto natural, que mejora la corrección del reconocimiento por los anticuerpos preparados contra el antígeno diana. Una inmunización de ADN ejemplar se ilustra en una solicitud de patente canadiense CA2350078 y en el documento WO04/087216. Específicamente, el ADN que codifica el polipéptido como antígeno diana se introduce directamente en un animal a través de un método de pistola génica, provocando la expresión de un polipéptido en el animal, cuya expresión causa la formación de anticuerpos contra el polipéptido. Para conseguir una formación más vigorosa de anticuerpos, se aplican los denominados adyuvantes genéticos simultáneamente con el ADN que codifica el polipéptido. Estos adyuvantes genéticos son plásmidos que expresan citoquinas (por ejemplo, GM-CSF, IL-4 e IL-10) y que estimulan la respuesta inmunitaria humoral en animales de laboratorio. En una realización preferida, el anticuerpo contra el antígeno diana se expresa sobre la superficie celular de células B como un receptor de células B (BCR). En otra realización preferida, la célula que expresa anticuerpo es una célula B de memoria, caracterizada y distinguible de células B normales por la ausencia de cualquier IgM sobre su superficie.

**Cribado usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)**

Después de la etapa de inmunización, el anticuerpo unido a membrana sobre las células B que se une específicamente al antígeno diana tiene que separarse de otras células que expresan anticuerpos no específicos. En una realización preferida, a través de la unión de antígeno-anticuerpo, las células B que expresan el anticuerpo específico sobre la membrana plasmática se adhieren a las células diana que expresan el antígeno. En otra realización preferida, pueden producirse otras o más interacciones (por ejemplo, interacciones iguales o diferentes de antígeno-anticuerpo, reticulaciones químicas, interacciones de ligando-receptor, etc.) entre las células B y las células diana. Las células B pueden estar en una combinación de células B que expresan diferentes anticuerpos, o en combinación con otras células inmunitarias, recogidas directamente del animal inmunizado, de una combinación de animales inmunizados/no inmunizados, o de procesos de ingeniería *in vitro*, por ejemplo, una biblioteca de células B que expresan diferentes anticuerpos por la técnica de recombinación genética de V(D)J.

La separación de las células B que expresan anticuerpos específicos para el antígeno diana puede hacerse en cualquier método conocido en la técnica. Estos incluyen, aunque sin limitación, paneo sobre el antígeno, dilución limitante, purificación por afinidad u otros métodos que utilizan las características de los anticuerpos expresados o las células B que producen anticuerpo.

En una realización preferida, las células que expresan antígeno se marcan con una marca útil para la futura detección y/o aislamiento de las células B adheridas. La marca puede ser un reticulante, antígeno/anticuerpo, moléculas pequeñas (por ejemplo, glutatión (GSH), biotina/avidina, etc.), partículas magnéticas, marca de fluorescencia, etc. En una realización preferida, las células que expresan antígeno se marcan con una proteína/péptido fluorescente. En otra realización, las células B que producen anticuerpo también se marcan con una marca, preferiblemente, una proteína/péptido fluorescente diferente. En otra realización más, las células B en adherencia a las células que expresan antígeno pueden detectarse por la emisión de fluorescencia desde la proteína/péptido fluorescente marcada en las células B. En otra realización más, la célula B y la célula que expresa antígeno en adherencia pueden detectarse por la emisión de fluorescencia desde dos diferentes proteínas/péptidos fluorescentes marcados en las mismas. En una realización preferida, las células B que expresan anticuerpos específicos para el antígeno diana pueden detectarse y separarse adicionalmente de otras células B que producen anticuerpo por la emisión de fluorescencia tanto de proteínas/péptidos fluorescentes marcados en las mismas como en APC adheridas. Preferiblemente, esta detección y separación puede realizarse por la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

El acrónimo FACS es marca registrada y propiedad de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). Como se usa en este documento, el término FACS representará cualquier forma de clasificación celular basada en citometría de flujo.

La clasificación de células activadas por fluorescencia es un tipo especializado de citometría de flujo. Proporciona un método para clasificar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula cada vez, basado en la dispersión de luz específica, y las características fluorescentes de cada célula. Es un instrumento científico útil ya que proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de las señales fluorescentes desde las células individuales, así como la separación física de células de interés particular.

En un sistema FACS típico, la suspensión celular se introduce en el centro de una corriente estrecha de líquido de flujo rápido. El flujo está dispuesto de modo que haya una gran separación entre las células respecto a su diámetro. Un mecanismo de vibración causa que la corriente de células se descomponga en gotas individuales. El sistema se ajusta de modo que haya una baja probabilidad de que haya más de una célula en una gota. Justo antes de descomponerse la corriente en gotas, el flujo pasa a través de una estación de medición de fluorescencia donde se mide el carácter fluorescente de interés de cada célula. Se coloca un anillo de carga eléctrica justo en el punto donde la corriente se descompone en gotas. Se coloca una carga en el anillo basada en la medición de intensidad de fluorescencia inmediatamente anterior y la carga opuesta se atrapa en la gota que se descompone de la corriente. Las gotas cargadas entonces caen a través de un sistema de deflexión electrostático que desvía las gotas a recipientes basándose en su carga. En algunos sistemas, la carga se aplica directamente a la corriente y la gota que se descompone retiene la carga del mismo signo que la corriente. La corriente después se devuelve a neutralidad después de que la gota se haya descompuesto.

Los marcadores fluorescentes para la técnica FACS dependen de la lámpara o láser usado para excitar los fluorocromos y de los detectores disponibles. Los láseres más habitualmente disponibles en máquinas de un único láser son láseres de argón azul (488 nm). Los marcadores fluorescentes que funcionan para este tipo de láseres incluyen, aunque sin limitación, 1) para fluorescencia verde (habitualmente marcados FL1): FITC, Alexa Fluor 488, GFP, CFSE, CFDA-SE, y DyLight 488; 2) para fluorescencia naranja (habitualmente FL2): PE, y PI; 3) para fluorescencia roja (habitualmente FL3): PerCP, PE-Alexa Fluor 700, PE-Cy5 (TRI-COLOR), y PE-Cy5.5; y 4) para fluorescencia infrarroja (habitualmente FL4; en algunas máquinas FACS): PE-Alexa Fluor 750, y PE-Cy7. Otros láseres y sus marcadores fluorescentes correspondientes incluyen, aunque sin limitación, 1) láseres de diodos rojos (635 nm): Alociocianina (APC), APC-Cy7, Alexa Fluor 700, Cy5, y Draq-5; y 2) láseres violeta (405 nm): naranja Pacific, Amine Aqua, azul Pacific, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), y Alexa Fluor 405.

En una realización preferida, las células B se tiñen con anticuerpos anti-IgG y anti-IgM marcados y las células B de memoria que solamente se tiñen positivamente con los anticuerpos anti-IgG pero no con los anticuerpos anti-IgM se seleccionan con preferencia. La IgG generalmente tiene una mayor afinidad que IgM; las células B positivas que expresan IgG pero no IgM sobre su superficie (lo que es característico de células B de memoria) se seleccionan de ese modo. Para dicho propósito, preferiblemente se usa tinción con múltiples colores, donde los anticuerpos específicos para IgG e IgM se marcan de forma diferencial, por ejemplo, con APC y FITC, respectivamente. Preferiblemente, el antígeno diana y/o la célula diana que expresa el antígeno diana también se marcan. En una realización, el antígeno diana se tiñe indirectamente tiñendo la célula que expresa el antígeno diana con un colorante fluorescente intracelular.

La presente invención proporciona un método que usa FACS para cribar combinaciones de células B, en que las células B pueden adherirse a células que expresan antígenos diana, para identificar y aislar adicionalmente célula B que producen anticuerpos que se unen específicamente al antígeno diana de interés. Preferiblemente, las células B se marcan con un marcador fluorescente y las células que expresan el antígeno diana se marcan por separado con un marcador fluorescente diferente. Estos marcadores pueden ser intracelulares, extracelulares o estar integrados en la membrana plasmática. Después de la inmunización y producción de los anticuerpos, todas las células B se combinan juntas y se ejecutan a través de un sistema FACS. Solamente aquellas células B que producen anticuerpos específicos para el antígeno diana se adherirán a las células que expresan antígeno. Su adherencia acorta la distancia entre estas dos células en el flujo, en comparación con la gran separación entre otras células individuales, lo que conduce a un "evento bicolor" detectable durante su paso concurrente a través del haz láser de exploración. Por tanto, las células B que producen anticuerpos de interés pueden identificarse y después clasificarse en un tubo diferente de recogida de otras células B no específicas.

En otra realización preferida, si la interacción entre la célula B y la célula que expresa antígeno correspondiente conduce a cierta modificación de las características celulares, por ejemplo, despolarización, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), etc., pueden añadirse más marcadores fluorescentes a la célula con capacidad de dicha modificación. Por tanto, las células B y células que expresan antígeno en contacto darán un evento "tricolor" o un evento que contiene incluso más de tres colores al mismo tiempo.

Como alternativa, la identificación y clasificación de células B en adherencia no requiere la existencia de su marcador fluorescente. En una realización, la interacción célula-célula conduce a cambios funcionales en cualquier célula. En otra realización, estos cambios funcionales pueden usarse para identificar y separar adicionalmente las células B que producen anticuerpos que se unen específicamente al antígeno diana. Por ejemplo, la interacción célula-célula puede bloquear funcionalmente o activar la señalización del receptor en cualquier célula, lo que conduce a cambios celulares, por ejemplo, los cambios en el flujo saliente de  $Ca^{2+}$ , etc., detectables por el sistema FACS. Por tanto, controlando estos cambios funcionales detectables, también pueden identificarse y separarse las células B de interés. Una realización particular de bloqueo funcional o activación de la señalización del receptor incluye incubar células B con células que expresan de forma funcional un GPCR (receptor acoplado a proteína G). Puede añadirse un agonista que emite señales a través de un GPCR a la mezcla para inducir flujo saliente de  $Ca^{2+}$  mediado por GPCR desde el retículo endoplasmático. En el caso de que un anticuerpo presentado en una célula B bloquee funcionalmente la señalización del agonista, el flujo saliente de  $Ca^{2+}$  también estaría bloqueado en consecuencia por esta interacción célula-célula. El flujo saliente de  $Ca^{2+}$  puede medirse cuantitativamente, por ejemplo, por citometría de flujo. Por lo tanto, solamente se clasificarían los conglomerados de células B/células diana que muestran aumento o disminución en el flujo saliente de  $Ca^{2+}$ .

#### **Ensayos de afinidad para anticuerpos producidos por las células B aisladas**

En ciertas realizaciones, las células B se cultivan en condiciones adecuadas de modo que se secreten anticuerpos en el medio de cultivo. Los anticuerpos producidos son, por ejemplo, anticuerpos monoclonales. El cultivo puede implicar el uso de una línea celular auxiliar, tal como una línea celular auxiliar de timoma (por ejemplo, EL4-B5, véase Zubler *et al.*, 1985, J. Immunol., 134(6): 3662-3668).

Opcionalmente, pueden realizarse ensayos adicionales de afinidad antes del procesamiento adicional para evaluar la selectividad y la capacidad de competir con el ligando de los anticuerpos producidos por las células B aisladas. Estos ensayos incluyen, aunque sin limitación, ensayos basados en células (por ejemplo, ELISA de células (CELISA), que es un proceso ELISA modificado en que se usan células completas para el recubrimiento). Como se analiza en el documento CA2350078, CELISA puede realizarse como se describe a continuación en los ejemplos. La etapa de validación se realiza para ensayar los anticuerpos generados para la unión específica a la diana, por ejemplo, para excluir anticuerpos que están dirigidos contra una proteína que se expresa sobre la superficie celular diferente a la proteína diana.

Como alternativa, las células B de interés identificadas y aisladas pueden examinarse directamente por afinidad de anticuerpos y las células B pueden separarse de las células que expresan antígeno adheridas antes del procesamiento.

**Procesamiento adicional de células B aisladas para la producción de anticuerpos**

Las células B identificadas y aisladas, opcionalmente ensayadas por ensayo de afinidad (por ejemplo, CELISA), pueden procesarse adicionalmente para producir inmunoaglutinantes de interés. Puede usarse la técnica tradicional de hibridoma, por ejemplo. Esta puede implicar etapas tales como purificar los inmunoaglutinantes, dilucidar su

5 secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico.

Como alternativa, se realiza la caracterización de los aglutinantes en su formato scFv. Para este enfoque, se recuperarían las secuencias CDR de los aglutinantes expresados en células B clasificadas por RT-PCR de las células clasificadas cultivadas o de células individuales directamente. La combinación de dos combinaciones de oligonucleótidos parcialmente solapantes en que una combinación de oligonucleótidos codifica las CDR y una

10 segunda combinación codifica las regiones flanqueantes de una estructura scFv adecuada permitiría la generación de un scFv humanizado en un procedimiento de PCR de una etapa. Las secuenciación HT, la clonación y la producción permitirían realizar la selección de clones basándose en el rendimiento del scFv humanizado purificado, en lugar de caracterizar IgG secretada en el sobrenadante de cultivo celular. Una estructura scFv adecuada para aceptar las CDR de cualquier anticuerpo de conejo se ha identificado y caracterizado (FW humano "adaptado a conejo" o aceptor de conejo RabTor; véase el documento WO09/155726). Se ha mostrado la demostración conceptual para una diversidad de CDR que, en algunas casos, incluso contienen los enlaces disulfuro inter-CDR específicos de conejo.

15

A continuación, se describe una descripción general de la preparación de anticuerpos adaptados a conejo

**Injerto de inmunoaglutinantes**

20 Las regiones de unión a antígeno o CDR de los anticuerpos identificados usando los métodos de la invención pueden injertarse en regiones flanqueantes de anticuerpo aceptor. Dicho injerto puede reducir, por ejemplo, la inmunogenicidad del anticuerpo o mejorar sus propiedades funcionales, por ejemplo, mejorar la estabilidad termodinámica.

25 Los métodos generales para injertar CDR en regiones flanqueantes aceptoras humanas se han descrito por Winter en la patente de Estados Unidos n.º 5.225.539.

Se describen estrategias específicas para injertar CDR de anticuerpos monoclonales de conejo en las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/075.697, y 61/155.041. Estas estrategias están relacionadas con la de Winter pero divergen en que las regiones flanqueantes del anticuerpo aceptor son particularmente adecuadas como aceptor universal para todos los anticuerpos donantes humanos o no humanos. En particular, la región flanqueante de cadena sencilla humana FW1.4 (una combinación de la SEQ ID NO. 1 (denominada a43 en el documento WO03/097697) y la SEQ ID NO. 2 (denominada K127 en el documento WO03/097697)) ha demostrado ser altamente compatible con los sitios de unión a antígeno de anticuerpos de conejo. Por lo tanto, la FW1.4 representa una estructura adecuada para construir fragmentos de anticuerpo scFv humanizados estables derivados del injerto de bucles de conejo.

30

35 Además, se ha descubierto que FW1.4 podría optimizarse sustituyendo 5 o 6 posiciones de restos en la cadena pesada de FW1.4 y/o sustituyendo una posición en la cadena ligera de FW1.4. De ese modo, se descubrió sorprendentemente que la conformación de bucle de una gran diversidad de CDR de conejo en VH podría mantenerse completamente, en gran medida independiente de la secuencia de la región flanqueante donante. Dichos 5 o 6 restos en la cadena pesada, así como la 1 posición en la cadena ligera de FW1.4 están conservados en anticuerpos de conejo. El resto consenso para las 5 o 6 posiciones en la cadena pesada, así como la 1 posición en la cadena ligera, se dedujo del repertorio de conejo y se introdujo en la secuencia de la región flanqueante aceptoras humana. Como resultado, la región flanqueante modificada 1.4 (mencionada en ese sentido como rFW1.4) es compatible con casi cualquier CDR de conejo. Contrario a las cadenas individuales de tipo silvestre de conejo, rFW1.4 que contiene diferentes CDR de conejo se expresa bien y retiene casi completamente la afinidad de los anticuerpos de conejo donantes originales.

40

45

Por consiguiente, regiones flanqueantes aceptoras de inmunoaglutinante ejemplares comprenden

- (i) una región flanqueante de cadena pesada variable que tiene al menos un 70 % de identidad, preferiblemente al menos un 80 %, 85 %, 90 %, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad, con la SEQ ID NO. 1; y/o
  - (ii) una región flanqueante de cadena ligera variable que tiene al menos un 70 % de identidad, preferiblemente al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad, con la SEQ ID NO. 2.
- 50

En una realización preferida, la cadena ligera variable comprende treonina (T) en la posición 87 (numeración AHo)

En una realización preferida, dicha región flanqueante aceptoras de inmunoaglutinante comprende

- (i) una región flanqueante de cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 4 y SEQ ID NO. 6; y/o
- (ii) una región flanqueante de cadena ligera variable de la SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 9.

5 En una realización preferida, la región flanqueante de cadena pesada variable está unida a una región flanqueante de cadena ligera variable mediante un enlazador. El enlazador puede ser cualquier enlazador adecuado, por ejemplo, un enlazador que comprende de 1 a 4 repeticiones de la secuencia GGGGS (SEQ ID NO. 10), preferiblemente un péptido (GGGGS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO. 8), o un enlazador como se describe en Alfthan *et al.*, (1995) Protein Eng. 8:725-731.

10 En una realización más preferida, la región flanqueante aceptora de inmunoaglutinante es una secuencia que tienen al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad, con la SEQ ID NO. 3. Más preferiblemente, la región flanqueante aceptora de inmunoaglutinante comprende o es la SEQ ID NO. 3.

En otra realización preferida, la región flanqueante aceptora de inmunoaglutinante es una secuencia que tienen al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad, con la SEQ ID NO. 5. Más preferiblemente, la región flanqueante aceptora de inmunoaglutinante comprende o es la SEQ ID NO. 5.

15 En otra realización preferida, la región flanqueante aceptora de inmunoaglutinante es una secuencia que tienen al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad, con la SEQ ID NO. 7. Más preferiblemente, la región flanqueante aceptora de inmunoaglutinante comprende o es la SEQ ID NO. 7.

20 Además, puede emplearse una región flanqueante de cadena pesada variable ejemplar de la SEQ ID NO. 1, que comprende adicionalmente uno o más restos de aminoácido que generalmente dan soporte a la conformación de las CDR derivadas de un inmunoaglutinante de conejo. En particular, dichos restos están presentes en una o más posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en 24H, 25H, 56H, 82H, 84H, 89H y 108H (numeración AHO). Se demuestra que estas posiciones afectan a la conformación de las CDR y, por lo tanto, se contemplan para mutación para acomodar CDR donantes. Preferiblemente, dicho uno o más restos se seleccionan del grupo que consiste en: treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, glicina o alanina (G/A) en la posición 56, lisina (K) en la posición 82, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración AHO).

25 En una realización preferida, dicha región flanqueante de cadena pesada variable es o comprende la SEQ ID NO. 4 o SEQ ID NO. 6. Ambas regiones flanqueantes de cadena pesada variable pueden combinarse, por ejemplo, con cualquier región flanqueante de cadena ligera adecuada.

30 Las secuencias descritas anteriormente son las siguientes (los restos X son sitios de inserción de CDR):

**SEQ ID NO. 1:** región flanqueante de cadena pesada variable de FW1.4(a43)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)<sub>n=1-50</sub>      WVRQAPGKGLEWVS  
(X)<sub>n=1-50</sub>    RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK(X)<sub>n=1-50</sub>      WGQGTL  
VTVSS

**SEQ ID NO. 2:** región flanqueante de cadena ligera variable de FW1.4(KI27)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)<sub>n=1-50</sub>    WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=1-50</sub>  
GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC(X)<sub>n=1-50</sub>    FGQGTKLT VLG

35 **SEQ ID NO. 3:** región flanqueante de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)<sub>n=1-50</sub>    WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=1-50</sub>  
GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC(X)<sub>n=1-50</sub>      FGQGTKLT VLG  
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS    EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)<sub>n=1-50</sub>  
WVRQAPGKGLEWVS(X)<sub>n=1-50</sub>      RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA  
VYYCAK(X)<sub>n=1-50</sub>    WGQGTL VTVSS

**SEQ ID NO. 4:** región flanqueante de cadena pesada variable de rFW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)<sub>n=1-50</sub>  
WVRQAPGKGLEWVG(X)<sub>n=1-50</sub>  
RFTISRDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)<sub>n=1-50</sub> WGQGTLV TVSS

**SEQ ID NO. 5:** región flanqueante de rFW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)<sub>n=1-50</sub> WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=1-50</sub>  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYC(X)<sub>n=1-50</sub> FGQGTKLTVLG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)<sub>n=1-50</sub>  
WVRQAPGKGLEWVG(X)<sub>n=1-50</sub> RFTISRDTSKNTVY LQMNS  
LRAEDTAVYYCAR(X)<sub>n=1-50</sub> WGQGTLVTVSS

5 **SEQ ID NO. 6:** región flanqueante de cadena pesada variable de rFW1.4(V2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)<sub>n=1-50</sub> WVRQAPGKGLEWVG(X)<sub>n=1-50</sub>  
RFTISKDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)<sub>n=1-50</sub> WGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO. 7:** región flanqueante de rFW1.4(V2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)<sub>n=1-50</sub> WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=1-50</sub>  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYC(X)<sub>n=1-50</sub> FGQGTKLTVLG  
GGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)<sub>n=1-50</sub>  
WVRQAPGKGLEWVG(X)<sub>n=1-50</sub> RFTISKDTSKNTVY LQMNSLR  
AEDTAVYYCAR(X)<sub>n=1-50</sub> WGQGTLVTVSS

10 **SEQ ID NO. 8:** enlazador

GGGSGGGGSGGGGSGGGGS

**SEQ ID NO. 9:** región flanqueante de cadena ligera variable sustituida de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)<sub>n=1-50</sub> WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=1-50</sub>  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYC(X)<sub>n=1-50</sub> FGQGTKLTVLG

15 Por tanto, a diferencia del método general de Winter, la secuencia flanqueante usada para los métodos de humanización de la invención no es necesariamente la secuencia flanqueante que muestra la mayor similitud de secuencia con la secuencia del anticuerpo no humano (por ejemplo, de conejo) del que se obtienen las CDR donantes. Además, el resto flanqueante que se injerta desde la secuencia donante para dar soporte a la conformación de las CDR no es necesario.

20 Las regiones flanqueantes del anticuerpo aceptor también pueden comprender una o más de las mutaciones potenciadoras de estabilidad descritas en la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/075.692. Las sustituciones ejemplares que potencian la solubilidad en la región flanqueante de cadena pesada se encuentran en las posiciones 12, 103 y 144 (numeración (A)Ho). Más preferiblemente, la región flanqueante de cadena pesada comprende (a) serina (S) en la posición 12; (b) serina (S) o treonina (T) en la posición 103 y/o (c) serina (S) o



5 treonina (T) en la posición 144. Además, los aminoácidos que potencian la estabilidad pueden estar presentes en una o más posiciones 1, 3, 4, 10, 47, 57, 91 y 103 de la región flanqueante de cadena ligera variable (numeración AHo). Más preferiblemente, la región flanqueante de cadena ligera variable comprende ácido glutámico (E) en la posición 1, valina (V) en la posición 3, leucina (L) en la posición 4, serina (S) en la posición 10; arginina (R) en la posición 47, serina (S) en la posición 57, fenilalanina (F) en la posición 91 y/o valina (V) en la posición 103.

### Ejemplos

Durante todos los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos salvo que se indique otra cosa.

#### *Materiales y métodos*

10 En general, la práctica de la presente invención emplea, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas convencionales de preparación de polipéptidos. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

#### *ELISA de células (CELISA)*

El siguiente ejemplo describe el uso de CELISA para analizar células que expresan CXCR2:

20 Pueden sembrarse células CHO o que expresan CXCR2 a una densidad de 50.000 células por pocillo en placas de semiárea de 96 pocillos. Después de incubación durante una noche a 37 °C, las células pueden fijarse con formaldehído al 1 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las capas celulares pueden lavarse tres veces y pueden bloquearse los sitios de unión no específica con medio de cultivo celular durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, después de tres etapas de lavado, los sobrenadantes pueden diluirse 1:1 en medio de cultivo y añadirse a los pocillos. En tres pocillos de control, puede introducirse un anticuerpo de conejo comercial anti-CXCR2 en el sobrenadante. Los sobrenadantes después pueden incubarse sobre las capas celulares durante una hora y media a temperatura ambiente. Finalmente, se detectan IgG de conejo con un anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de conejo acoplado a HRP. Tras la adición de un sustrato de peroxidasa (sustrato azul POD de Roche), se desarrollaría una reacción colorimétrica que podría detenerse después de 25 minutos con HCl 1 M. La absorbancia puede medirse a 450 nm.

### 30 Ejemplo 1

#### **Sistema de cribado de células B usando antígenos solubles**

Aquí se ejemplifica un sistema de cribado basado en FACS (clasificación de células activada por fluorescencia) descrito en esta invención capaz de seleccionar células B que se unen a una diana de interés, específicamente, una proteína soluble, a través de sus receptores de células B (BCR). En este ejemplo, la diana fue el anticuerpo ESBA903 de cadena sencilla anti-VEGF con un colorante fluorescente (PE y PerCP). La suspensión de linfocitos se preparó a partir del bazo de conejos inmunizados con la diana recombinante. Las células después se incubaron con scFv marcado con PE y PerCP, así como con anticuerpos específicos para IgG (marcados con APC) o IgM (marcados con FITC). Las células B ESBA903 positivas que expresan IgG pero no IgM sobre su superficie se clasificaron y seleccionaron en placas de 96 pocillos (figura 2). Como se muestra en el panel A de la figura 2, los linfocitos se sincronizaron de acuerdo con la dispersión directa y lateral. Entre ellas, las células IgG+ IgM- (probablemente células B de memoria) se seleccionaron (panel B). Se esperaba que las células doblemente teñidas con scFv-PE y scFv-PerCP codificaran y IgG de alta afinidad contra scFv (panel C). Las células que muestran la fluorescencia más brillante se clasificaron en placas de 96 pocillos con la estadística de clasificación enumerada en el panel D. Mediante una línea celular auxiliar de timoma (EL4-B5: véase, Zubler *et al.*, 1985, *J. Immunol.* 134(6):3662-3668), se seleccionaron las células B que habían proliferado, se habían diferenciado en células plasmáticas y después habían secretado anticuerpos. La afinidad de estas moléculas IgG por la proteína diana se verificó por mediciones ELISA y Biacore. Los parámetros cinéticos se representan en la tabla 1 para siete clones seleccionados. Estos clones, de una combinación de ~200 células clasificadas, muestran altas afinidades de unión en el intervalo nanomolar bajo a picomolar. Finalmente, los ARNm para las moléculas IgG secretadas se aislaron de 6 clones de interés y se injertaron las CDR en la región flanqueante de cadena sencilla *RabTor* de ESBATech, también denominada región flanqueante rFW1.4.

Tabla 1: Valores cinéticos para 7 sobrenadantes de cultivo de células B

clon de célula B	ka [Ms <sup>-1</sup> ]	kd [s <sup>-1</sup> ]	K <sub>D</sub> [M]
SG2	2,91E+06	2,95E-04	1,01E-10
SE11	3,63E+05	3,81E-04	1,05E-09
2E-03	8,34E+05	3,53E-04	4,23E-10
9E-03	8,66E+05	6,47E-04	7,47E-10
7D-03	3,97E+05	3,04E-04	7,65E-10
12B-02	1,08E+06	1,10E-04	1,01E-10
11G-02	5,48E+05	1,52E-04	2,78E-10

Tabla 1a: Estadística de clasificación para la figura 2

Población	N.º de eventos	% precursor	% total
Todos los eventos	100.000	####	100,0
Linfocitos	86.585	86,6	86,6
Linfocitos individuales 1	86.013	99,3	86,0
Linfocitos individuales 2	85.523	99,4	85,5
¿Células B de memoria?	5.450	6,4	5,4
Células clasificadas	16	0,3	0,0
Células que se unen a 903	160	2,9	0,2

5 Bibliografía seleccionada:

Zuber *et al.*, Mutant EL-4 thymoma cells polyclonally activate murine and human B cells via direct cell interaction. *J Immunol.* 1985;134(6):3662-3668.

**Dianas transmembrana**

10 El sistema de cribado descrito anteriormente funciona de forma eficaz cuando la diana es soluble, y cuando está disponible la proteína recombinante. Sin embargo, algunas dianas de interés son proteínas transmembrana de múltiples dominios (por ejemplo, GPCR y canales de iones). La inmunización tradicional con proteína recombinante es, en estos casos, desaconsejable o imposible. Además, la selección por FACS de células B no puede realizarse basándose en la unión de proteínas purificadas y marcadas si el antígeno es una proteína integrada de membrana. Para abordar estas cuestiones se implementaron las siguientes mejoras del procedimiento mencionado anteriormente.

1) Inmunización con ADN en lugar de proteína recombinante:

20 La vacunación de ADN induce una rápida respuesta inmunitaria contra el antígeno nativo. Como no se necesita proteína recombinante, esta tecnología es por un lado muy rentable, por otro lado, y de forma más importante, este método permite la expresión nativa de complejos integrados de membrana y/o proteínas de membrana de múltiples dominios.

2) La selección por FACS de células B que se unen a células que expresan una proteína diana integrada de membrana:

25 La citometría de flujo normalmente mide la fluorescencia emitida por células individuales cuando cruzan un haz láser. Sin embargo, algunos investigadores ya han usado citómetros para investigar las interacciones célula-célula, por ejemplo, la adhesión mediada por cadherinas (Panorchan *et al.*, 2006, *J. Cell Science*, 119, 66-74; Leong et Hibma, 2005, *J. Immunol. Methods*, 302, 116-124) o integrinas (Gawaz *et al.*, 1991, *J. Clin. Invest.*, 88, 1128-1134). Sin embargo, dichos estudios no demostraron si dichas interacciones célula-célula

permanecían intactas durante la etapa física de clasificación celular. Además, nunca se ha demostrado que la unión de un receptor de células B a su diana que está presente sobre la superficie de otra célula sea suficientemente fuerte para permitir dicha clasificación física.

5 Para seleccionar células B que se unan a dianas transmembrana, las células (por ejemplo, células CHO o HEK293) pueden transfectarse de forma transitoria o preferentemente estable con la diana de elección, o pueden usarse células que expresan de forma natural la diana de elección. Dichas células diana se tiñen con un colorante fluorescente intracelular (por ejemplo, calceína) y se incuban con los linfocitos B de memoria de un conejo inmunizado. Los linfocitos B se tiñen con anticuerpos fluorescentes que se unen a marcadores específicos de superficie celular. Por tanto, puede conseguirse la selección de "eventos" bicolor que consisten en dos células que se adhieren entre sí a través de interacciones de BCR-diana (véase la figura 1).

15 El procesamiento adicional de estas células B se realiza como se describe anteriormente, lo que conduce a la producción de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, en el formato IgG o scFv. Para estimar la afinidad de estos anticuerpos por la diana, se está realizando CELISA (ELISA, donde la etapa de recubrimiento se realiza con células completas). Con este método, puede evaluarse la selectividad y la capacidad de los anticuerpos de competir con el ligando. Finalmente, las CDR de los clones de interés se clonarán en nuestra región flanqueante adaptada a conejo (RabTor) por síntesis génica con el método de extensión de oligo.

20 Una lectura para la clasificación de células B no está necesariamente limitada a la interacción célula-célula, pero también puede usarse para seleccionar la capacidad de esta interacción de bloquear funcionalmente/activar la señalización del receptor. Por ejemplo, pueden incubarse células B con células que expresan de forma funcional un GPCR. Puede añadirse un agonista que emite señales a través de un GPCR a la mezcla para inducir flujo saliente de Ca<sup>2+</sup> mediado por GPCR desde el retículo endoplasmático. En el caso de que un anticuerpo presentado en una célula B bloquee de forma funcional la señalización agonista, el flujo saliente de Ca<sup>2+</sup> también se bloquearía de forma consecuente por esta interacción célula-célula. El flujo saliente de Ca<sup>2+</sup> puede medirse cuantitativamente por citometría de flujo. Por lo tanto, solamente los conglomerados de células B/células diana que no muestran flujo saliente de Ca<sup>2+</sup> se clasificarían.

**Ejemplo 2**

**Detección de la interacción entre perlas recubiertas con anticuerpo anti-TNF $\alpha$  y células CHO que expresan TNF $\alpha$  unido a membrana**

30 Antes de iniciarse un cribado de células B frente a una proteína transmembrana, tiene que demostrarse que las interacciones célula-célula (y especialmente las interacciones entre BCR y la proteína transmembrana en la célula diana) pueden seleccionarse positivamente con FACS. Para determinar si la alta presión en la corriente de citometría de flujo rompe la unión no covalente entre dos células, se realizó el siguiente experimento.

35 Células CHO transfectadas de forma estable con TNF $\alpha$  unido a membrana (células B-220) (que contienen un TNF $\alpha$  unido a membrana mutante que contiene una mutación puntual en el sitio de escisión de TACE que previene la escisión y desprendimiento del ligando TNF $\alpha$ ; véase, por ejemplo, Scallon *et al.*, J Pharmacol Exp Ther 2002; 301:418-26) se incubaron con perlas recubiertas con un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  marcado con PE. En esta configuración, las perlas imitan las células B de memoria. Como controles negativos, se usaron células CHO no transfectadas, así como perlas recubiertas con un anticuerpo no relacionado marcado con APC (anti-CD19). Después de 2 horas de incubación a 4 °C con agitación, se analizó la suspensión de células-perlas por FACS (usando una boquilla de 130  $\mu$ m). La figura 3 muestra que una unión específica entre las perlas anti-TNF $\alpha$  y las células CHO transfectadas con TNF $\alpha$  era claramente detectable con FACS. De hecho, en esta muestra (panel superior) aproximadamente dos tercios de las perlas se unían a las células (585 unidas frente a 267 no unidas). En contraste, las muestras de control (paneles, central e inferior), casi ninguna perla se unió a las células CHO. Además, se mezclaron ambas poblaciones de perlas (anti-TNF $\alpha$ -PE y anti-CD19-APC) juntas con células CHO transfectadas con TNF $\alpha$ . La figura 4 muestra que aproximadamente la mitad de las perlas anti-TNF $\alpha$  se unían a células CHO, mientras que la inmensa mayoría de las perlas anti-CD19 permanecían no unidas. El porcentaje de perlas que se unen a la célula en cada muestra se detalla en la tabla 2. Por tanto, se hace la demostración de que la selección específica de células B individuales que se unen a una proteína diana integrada de membrana a través del receptor de células B era posible usando citometría de flujo.

50 Tabla 2: Porcentaje de perlas unidas a células CHO en cada muestra

	Células	mAb en perlas	% de perlas unidas
Muestra 1	CHO-TNF $\alpha$ D(B220)	anti-TNF $\alpha$	68,0
Muestra 2	CHO-TNF $\alpha$ D(B220)	anti-CD 19	0,9

	Células	mAb en perlas	% de perlas unidas
Muestra 3	CHO wt	anti-TNF $\alpha$	1,5
Muestra 4	CHO-TNF $\alpha$ D(B220)	anti-TNF $\alpha$	47,0
		anti-CD 19	0,4

**Tabla 2a:** Estadística de clasificación para el panel superior de la figura 3; unión de perlas recubiertas con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  a células CHO transfectadas con TNF $\alpha$

Población	N.º de eventos	% precursor	% total
Todos los eventos	10.000	####	100,0
P1	9.692	96,9	96,9
P3	585	6,0	5,9
P4	1	0,0	0,0
P2	267	2,7	2,7

5

**Tabla 2b:** Estadística de clasificación para el panel central de la figura 3; ausencia de unión de perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD19 a células CHO transfectadas con TNF $\alpha$

Población	N.º de eventos	% precursor	% total
Todos los eventos	10.000	####	100,0
P1	9.399	94,0	94,0
P3	3	0,0	0,0
P4	6	0,1	0,1
P2	558	5,6	5,6

**Tabla 2c:** Estadística de clasificación para el panel inferior de la figura 3; ausencia de unión de perlas recubiertas con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  a células CHO de tipo silvestre

Población	N.º de eventos	% precursor	% total
Todos los eventos	10.000	####	100,0
P1	9.001	90,0	90,0
P3	13	0,1	0,1
P4	7	0,1	0,1
P2	811	0,1	0,1

**Tabla 2d:** Estadística de clasificación para la figura 4

Población	N.º de eventos	% precursor	% total
Todos los eventos	10.000	####	100,0
P1	9.096	91,0	91,0
P3	401	4,4	4,0
P4	2	0,0	0,0
P2	856	8,6	8,6

**Ejemplo 3**

**Detección de la interacción entre células B aisladas de conejo inmunizado con anticuerpo anti-TNF $\alpha$  y células CHO que expresan TNF $\alpha$  unido a membrana que se saturaron con anticuerpo anti-TNF $\alpha$**

5 Para el experimento representado en la figura 5, los linfocitos se aislaron de un bazo de conejo inmunizado con anticuerpo anti-TNF $\alpha$  (ESBA105, producido en el propio laboratorio) o de un bazo de conejo no inmunizado. Se tiñeron con anticuerpo anti-IgG de conejo-APC y anti-IgM de conejo-FITC (AbD serotec) y posteriormente se preclasificaron para obtener poblaciones puras de células B de memoria (IgG+/IgM-). En paralelo, se cargaron células CHO que expresan TNF $\alpha$  (donadas por el Dr. P Scheurich, Univ. of Stuttgart) con 1 ug/ml de rojo de calceína (Invitrogen), un colorante citoplasmático que tiñe de forma fluorescente células vivas. Estas células después se lavaron una vez y se incubaron con (o sin, para el control negativo) 100 ug/ml de ESBA105, y finalmente se lavaron de nuevo 3x con PBS. Las células B de memoria se mezclaron finalmente a una relación de aproximadamente 1:10 con las células CHO y se incubaron durante 2 horas a 4 °C en una placa giratoria (concentración: 3\*10<sup>7</sup> células/ml). Se prepararon las siguientes muestras:

- 15 1) células CHO-TNF $\alpha$  + ESBA105 + células B de memoria de conejo inmunizado con ESBA105  
 2) células CHO-TNF $\alpha$  + ESBA105 + células B de memoria de conejo no inmunizado  
 3) células CHO-TNF $\alpha$  + células B de memoria de conejo inmunizado con ESBA105

20 Después de 2 horas de incubación, se midieron las 3 muestras por FACS, usando la boquilla de 70 um. De acuerdo con la jerarquía de la población mostrada en la tabla 3a, el 5 % de las células inmunizadas con ESBA105 se unen a células CHO transgénicas para TNF $\alpha$  "recubiertas con ESBA105". En comparación, solamente el 0,5 % de las células B no inmunizadas se unen a estas células CHO transgénicas para TNF $\alpha$  "recubiertas con ESBA105" (tabla 3b), y el 0,6 % de las células B inmunizadas se unen en ausencia de ESBA105 en la superficie de las células CHO (tabla 3c). Estos resultados dan indicios de que puede detectarse una interacción específica entre un BCR (receptor de células B) y una diana transmembrana por FACS.

Tabla 3a: Estadística de clasificación para el panel superior de la figura 5b

Población	N.º de eventos	% precursor	% total
Todos los eventos	50.000	####	100,0
Células vivas	43.828	87,7	87,7
Células B	5.162	11,8	10,3
Células B que se adhieren a CHO	78	<b>1,5</b>	0,2

25

Tabla 3b: Estadística de clasificación para el panel central de la figura 5b

Población	N.º de eventos	% precursor	% total
Todos los eventos	50.000	####	100,0
Células vivas	43.834	87,7	87,7
Células B	4.290	9,8	8,6
Células B que se adhieren a CHO	23	<b>0,5</b>	0,0

Tabla 3c: Estadística de clasificación para el panel inferior de la figura 5b

Población	N.º de eventos	% precursor	% total
Todos los eventos	50.000	####	100,0
Células vivas	42.982	86,0	86,0
Células B	10.150	23,6	20,3
Células B que se adhieren a CHO	65	<b>0,6</b>	0,1

**Ejemplo 4****Detección de la interacción entre células B aisladas de un conejo inmunizado con ESBA105 y células CHO que expresan TNF $\alpha$  unido a membrana que se saturaron con ESBA105**

- 5 En un experimento adicional, no se hizo preclasificación de las células B de memoria. Se incubó la población completa de linfocitos con las células CHO-TNF $\alpha$ -ESBA105 teñidas. Las células CHO transgénicas se prepararon como se describe anteriormente. Sin embargo, para prevenir su proliferación en medio de cultivo de células B después de la clasificación en placas de 96 pocillos, las células se detuvieron en el ciclo celular por un tratamiento con mitomicina C (M4287-2MG) antes de la tinción con calceína. Los linfocitos de un conejo inmunizado con ESBA105 se mezclaron a una relación de 3:1 con las células CHO teñidas (concentración de la suspensión celular: 10  $\approx 3 \cdot 10^7$  células/ml), y se incubaron durante 2 horas a 4 °C centígrados en una placa giratoria. Después de esto, la suspensión celular se analizó por FACS y se clasificaron las células B de memoria que se unen a CHO-TNF $\alpha$ -ESBA105 de acuerdo con el portal representado en la figura 6, con 1, 10 o 100 células/pocillo como se muestra en la tabla 3. Las células clasificadas representaban el 5,5 % de la población de células B de memoria, respectivamente el 0,2 % de los eventos totales.
- 15 Las células clasificadas se recogieron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 13 días a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de eso, los sobrenadantes de cultivo se recogieron y ensayaron en ELISA directo para comprobar la presencia de IgG que se unen a ESBA105. Los resultados de ELISA (tabla 3) muestran que podían detectarse anticuerpos específicos de ESBA105 en muchos pocillos, y también en pocillos donde se clasificaban células B individuales. El análisis Biacore (GE Healthcare) (tabla 4) de estos sobrenadantes confirmó que estos anticuerpos, 20 de hecho, se unían a la diana ESBA105.

**Tabla 3:** Análisis ELISA de muestras de sobrenadante de cultivo celular tomadas 13 días después de la clasificación. No se clasificaron células B en los pocillos de la fila A sin procesar para verificar la especificidad de las señales de DO450. En los pocillos A11 y A12, se introdujo un anticuerpo policlonal de conejo anti-ESBA105 (AK3A; 2 ug/ml) en el sobrenadante como control positivo. Los pocillos donde la DO450 es significativamente mayor que el fondo están resaltados en negrita.

Día 13	0 células B/pocillo												Control positivo	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	11	12
A	0,0690	0,0680	0,0600	0,0470	0,0540	0,0700	0,0660	0,0750	0,0490	0,0690	<b>2,7270</b>	<b>2,7020</b>	<b>2,7270</b>	<b>2,7020</b>
B	0,0660	0,0630	<b>2,7190</b>	0,0460	0,0500	0,0640	0,0630	0,0770	<b>2,7920</b>	0,0580	<b>2,8670</b>	<b>2,8880</b>	<b>2,8670</b>	<b>2,8880</b>
C	0,0700	<b>2,8380</b>	0,0520	0,0470	0,0540	0,0690	<b>2,9260</b>	<b>2,7160</b>	0,0570	0,0690	<b>2,9500</b>	<b>2,7730</b>	<b>2,9500</b>	<b>2,7730</b>
D	0,0680	0,0630	0,0560	0,0490	0,0520	0,0640	0,0650	<b>0,7840</b>	<b>0,4480</b>	0,0620	<b>3,0010</b>	<b>2,9250</b>	<b>3,0010</b>	<b>2,9250</b>
E	0,0750	0,0730	0,0630	0,0550	0,0630	0,0670	<b>2,8550</b>	0,0830	0,0580	<b>1,9820</b>	<b>2,1250</b>	<b>2,8090</b>	<b>2,1250</b>	<b>2,8090</b>
F	0,0680	0,0640	<b>2,7090</b>	0,0530	0,0580	0,0680	0,0750	<b>2,5610</b>	0,0610	<b>0,3820</b>	<b>2,8150</b>	<b>2,8180</b>	<b>2,8150</b>	<b>2,8180</b>
G	0,0820	0,0740	0,0660	<b>1,7530</b>	0,0700	0,0780	<b>0,3980</b>	0,0740	<b>2,8920</b>	<b>1,8240</b>	<b>2,7910</b>	<b>2,7510</b>	<b>2,7910</b>	<b>2,7510</b>
H	0,0730	0,0680	0,0620	0,0570	0,0610	0,0720	<b>0,1710</b>	<b>1,9590</b>	0,0610	<b>2,7830</b>	<b>0,1800</b>	<b>2,8510</b>	<b>0,1800</b>	<b>2,8510</b>
	1 célula B/pocillo						10 células B/pocillo						100 células B/pocillo	

Tabla 4: Valore cinéticos y concentraciones determinadas por Biacore para los sobrenadantes de cultivo de células B. Se midieron solamente los sobrenadantes donde se clasificó una célula por pocillo. BLQ: límite inferior de cuantificación

Proteína	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	% SE (ka)	% SE (kd)	KD (M)	Rmáx ajustado (RU)	Chi2(% de Rmáx)	Nivel de captura de medio de células B con IgG	Nivel de captura de medio de células B	Nivel de captura neto aproximado	Concentración (ug/ml)
19-01-B3	1,54E+06	2,83E-03	0,29	0,20	1,8E-09	64,0566	0,30	772,65	554,36	218,30	0,273
19-01-C2	2,30E+09	3,23E+01	0,04	0,04	1,4E-08	99,0582	10,46	1069,06	546,00	523,06	1,576
19-01-F3	1,46E+06	2,31E-03	0,30	0,20	1,6E-09	77,848	0,37	803,86	537,13	266,72	0,347
19-01-G4	3,40E+06	4,45E-03	2,86	2,29	1,3E-09	4,43221	1,43	578,01	548,58	29,43	BLQ
19-02-B4	8,18E+05	3,18E-03	0,22	0,15	3,9E-09	80,3549	0,22	822,67	539,30	283,37	0,397
19-02-D3	1,01E+06	2,95E-03	0,54	0,36	2,9E-09	23,7639	0,41	652,51	547,28	105,23	0,066
19-02-F2	2,61E+06	6,61E-04	1,53	0,59	2,5E-10	12,533	0,64	5214,04	514,43	9,61	BLQ



**Ejemplo 5**

**Cribado de linfocitos de conejos inmunizados con CXCR2 (clasificaciones 27/29)**

Se inmunizaron tres conejos con un vector de expresión de CXCR2. Después de varias aplicaciones intradérmicas del ADNc de CXCR2, se tomó suero y se ensayó en células transfectadas con CXCR2 para la presencia de anticuerpos específicos. Después se retiraron las células de los ganglios linfáticos, se congelaron en cinco alícuotas con  $1,6 \times 10^7$  células cada una y se clasificaron en un tanque de nitrógeno líquido.

Se descongeló una alícuota y se tiñó con anticuerpos específicos para IgG (marcados con APC) o IgM (marcados con FITC). En paralelo, se trataron células CHO que expresaban CXCR2 con mitomicina C, para prevenir el crecimiento adicional sin eliminar las células, y se cargaron con 1 ug/ml de rojo de calceína. Ambas preparaciones celulares después se mezclaron con una concentración celular final de  $10^7$  células/ml, siendo los linfocitos dos veces tan abundantes como las células CHO transfectadas con CXCR2. Después de 2 horas de incubación con agitación suave a 4 °C, la suspensión celular se filtró a través de un filtro de 50 um y se cargó en el FACS. La sincronización se realizó como se describe en la figura 6. Se clasificó un "evento" (células B de memoria unidas a una célula CHO transfectada con CXCR2) por pocillo en un total de 10 x placas de 96 pocillos (900 eventos en total). Los eventos clasificados representaban el 3,1 % de la población de células B de memoria, respectivamente el 0,035 % de la cantidad de células totales en la muestra.

Los linfocitos seleccionados se cultivaron durante 21 días en una incubadora de 37 °C. Cada 2-3 días, se recogieron 100 ul de sobrenadante de cultivo de los pocillos y se reemplazaron por medio nuevo. Durante este tiempo de cultivo, las células B proliferaron, se diferenciaron en células plasmáticas y secretaron anticuerpos. Para visualizar los sobrenadantes que contenían anticuerpos específicos de CXCR2, se realizó un CELISA. Para esto, las células CHO que expresan CXCR2 se sembraron a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas de semiárea de 96 pocillos. Después de incubación durante una noche a 37 °C, las células se fijaron con formaldehído al 1 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las capas de células después se lavaron tres veces y se bloquearon los sitios de unión no específica con medio de cultivo celular durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, después de las tres etapas de lavado, los sobrenadantes se diluyeron 1:1 en medio de cultivo y se añadieron a los pocillos. En tres pocillos de control, se introdujo un anticuerpo de conejo comercial anti-CXCR2 en el sobrenadante. Los sobrenadantes se incubaron sobre las capas celulares durante una hora y media a temperatura ambiente. Finalmente, se detectaron las IgG de conejo con un anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de conejo acoplado a HRP. Tras la adición de un sustrato de peroxidasa (sustrato azul POD de Roche), se desarrolló una reacción colorimétrica que se detuvo después de 25 minutos con HCl 1 M. La absorbancia se midió a 450 nm.

Este CELISA produjo un 1,8 % de pocillos (16/900) que presentaban señales positivas. Todos los positivos se confirmaron en una segundo CELISA. Los sobrenadantes también se ensayaron frente a otras líneas celulares: CHO-K1 (tipo silvestre) que reveló clones de unión no específica probables, CHO-CXCR1 humano y CHO-CXCR2 de ratón que demuestran reactividad cruzada contra un receptor muy relacionado o equivalente de especie. Finalmente, los sobrenadantes se ensayaron en un ELISA directo para la unión a un péptido que consiste en los 48 aminoácidos N-terminales de CXCR2. Los resultados se presentan en la tabla 5. Todos los sobrenadantes seleccionados produjeron fuertes señales de  $DO_{450}$  contra CXCR2 humano en CELISA. Algunos de ellos también fueron ligeramente positivos en el experimento de control con las células CHO de tipo silvestre, lo que significa que podrían unirse de un modo no específico. Ninguno de los clones tuvo reactividad cruzada con CXCR1 humano o CXCR2 de ratón. Finalmente, algunos clones, pero no todos ellos, se unieron al péptido N-terminal de CXCR2, lo que indica un probable sitio de unión alternativo entre CXCR2. Dada la imposibilidad de inmovilizar células completas en un chip Biacore, actualmente es imposible medir cuantitativamente la afinidad de anticuerpos seleccionados por el receptor CXCR2. Sin embargo, los datos reunidos convergen en indicar que los anticuerpos específicos para CXCR2 humanos se seleccionaron usando el sistema de clasificación de interacción célula-célula, descrito anteriormente.

**Tabla 5:** Sumario de los resultados de CELISA de clones anti-CXCR2 aislados durante la clasificación 27 y 29

Número de clon	CELISA directo contra CXCR2			cuantificación de IgG de conejo en ELISA (ng/ml)	CELISA CXCR1 (DO <sub>450</sub> )	CELISA mCXCR2 (DO <sub>450</sub> )	ELISA N-term (DO <sub>450</sub> )
	1. DO <sub>450</sub> del ensayo	2. DO <sub>450</sub> del ensayo	DO <sub>450</sub> de CHO wt.				
27-01-E3	3,3576	3,384	0,199	13501,9	0,1111	0,2210	2,3224
27-01-D9	3,1769	3,652	0,084	431,6	0,1100	0,1081	2,1632
27-01-H9	3,2068	3,707	0,366	6439,8	0,3410	0,3180	0,0552
27-02-D3	2,1209	2,971	0,090	370,2	0,1190	0,1169	0,0507
27-03-H4	3,4092	3,490	0,373	904,3	0,4470	0,2562	2,7145

ES 2 618 181 T3

Número de clon	CELISA directo contra CXCR2			cuantificación de IgG de conejo en ELISA (ng/ml)	CELISA CXCR1 (DO <sub>450</sub> )	CELISA mCXCR2 (DO <sub>450</sub> )	ELISA N-term (DO <sub>450</sub> )
	1. DO <sub>450</sub> del ensayo	2. DO <sub>450</sub> del ensayo	DO <sub>450</sub> de CHO wt.				
27-04-B3	2,7205	3,284	0,410	2896,1	0,4810	0,2724	0,0602
27-06-B5	0,4456	0,457	0,091	< 5 ng/ml	0,1050	0,0980	0,05
27-06-A6	3,2461	3,507	0,423	1259	0,3640	0,2119	2,1627
27-07-B2	3,2434	3,390	0,140	455,9	0,1210	0,1216	2,4233
27-08-D5	3,1386	3,302	0,090	178,4	0,1060	0,0910	2,2873
27-08-G9	3,3705	3,302	0,100	427,6	0,1160	0,0881	2,4506
27-08-G11	3,2857	3,380	0,125	2755	0,1660	0,1389	0,2955
27-09-A1	0,9547	1,926	0,103	261,1	0,1180	0,0996	0,0383
27-09-D1	3,2530	3,503	0,094	1576,5	0,1210	0,1238	0,0504
27-09-A5	3,2953	3,501	0,482	4502	0,4970	0,2491	2,5863
27-10-C3	0,6464	1,522	0,092	35,5	0,1030	0,1080	0,0513
29-01-H10	3,3345	3,3405	0,1558	5238,5	0,1810	0,1644	2,5374
29-02-C4	3,1456	3,3931	0,1219	2406,9	0,1490	0,1513	2,5126
29-02-H8	3,4441	3,3891	0,1178	4645,7	0,1260	0,1287	2,4003
29-02-C10	3,1259	3,4947	0,1128	861,3	0,1220	0,1074	1,9841
29-03-G11	2,5987	3,0270	0,1181	420,1	0,1110	0,0828	0,0501
29-04-F11	3,0250	3,1871	0,2768	16071,6	0,3160	0,1999	2,6047
29-05-E11	3,5481	3,4769	0,1531	2857,3	0,1950	0,1081	2,2094
29-06-H3	3,4308	3,4005	0,1254	8741,7	0,1530	0,1489	2,6543
29-06-D10	3,3152	3,4020	0,1316	1522,1	0,1210	0,1101	2,4598
29-07-H4	3,3693	3,4622	0,8502	16580,3	1,5030	0,7195	2,4458
29-08-E1	3,7283	3,4990	1,0667	10562,2	1,4780	0,5225	2,3015
29-08-G10	2,8429	2,5070	0,1107	40,4	0,1110	0,0955	1,8621
29-09-C4	1,1362	0,8767	0,1054	< 5 ng/ml	0,1090	0,0900	0,3539

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT
- <120> MÉTODOS PARA IDENTIFICAR INMUNOAGLUTINANTES DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE CELULAR
- 10 <130> P105635PC00
- <150> CH00832/09
- <151> 02-06-2009
- 15 <150> US61/155.105
- <151> 24-02-2009
- <150> US61/155.041
- <151> 24-02-2009
- 20 <150> PCT/CH2009/000222
- <151> 25-06-2009
- <160> 10
- 25 <170> PatentIn versión 3.5

# ES 2 618 181 T3

- <210> 1
  - <211> 232
  - <212> PRT
  - <213> Secuencia Artificial
- 5
- <220>
  - <223> región flanqueante de cadena pesada variable de FW1.4 (a43)
- 10
- <220>
  - <221> CDR
  - <222> (26)..(75)
  - <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 15
- <220>
  - <221> CDR
  - <222> (90)..(139)
  - <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 20
- <220>
  - <221> CDR
  - <222> (172)..(221)
  - <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 25
- <400> 1

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20           25           30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35           40           45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50           55           60
    
```

ES 2 618 181 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala  
 65 70 75 80

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser  
 130 135 140

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 145 150 155 160

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln  
 210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 225 230

- 5 <210> 2
- <211> 231
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> región flanqueante de cadena ligera variable de FW1.4 (KI27)
- 15 <220>
- <221> CDR
- <222> (24)..(73)
- <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 20 <220>
- <221> CDR
- <222> (89)..(138)
- <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 25 <220>
- <221> CDR
- <222> (171)..(220)
- <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier

ES 2 618 181 T3

aminoácido de origen natural.

<400> 2

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40 45  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 50 55 60  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 115 120 125  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 130 135 140  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 165 170 175  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 180 185 190  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 195 200 205  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly  
 210 215 220  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225 230

5

<210> 3

<211> 483

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

ES 2 618 181 T3

<220>  
 <223> región flanqueante de FW1.4

5 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (24)..(73)  
 <223> CDR; de al menos uno y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

10 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (89)..(138)  
 <223> CDR; de al menos uno y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

15 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (171)..(220)  
 <223> CDR; de al menos uno y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

20 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (277)..(326)  
 <223> CDR; de al menos uno y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

25 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (341)..(390)  
 <223> CDR; de al menos uno y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

30 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (423)..(472)  
 <223> CDR; de al menos uno y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

35 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (423)..(472)  
 <223> CDR; de al menos uno y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

40 <400> 3

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Thr	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		35					40					45			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		50				55					60				
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
65					70					75					80
Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				85					90					95	

ES 2 618 181 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 115 120 125  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 130 135 140  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 165 170 175  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 180 185 190  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 195 200 205  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly  
 210 215 220  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val  
 245 250 255  
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser  
 260 265 270  
 Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 275 280 285  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 290 295 300  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 305 310 315 320  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 325 330 335  
 Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 340 345 350  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 355 360 365

ES 2 618 181 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
 385 390 395 400

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 465 470 475 480

Val Ser ser

- <210> 4
- <211> 232
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> región flanqueante de cadena pesada variable de rFW1.4
- <220>
- <221> CDR
- <222> (26)..(75)
- <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- <220>
- <221> CDR
- <222> (90)..(139)
- <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- <220>
- <221> CDR
- <222> (172)..(221)
- <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- <400> 4



ES 2 618 181 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40 45  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 50 55 60  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 115 120 125  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser  
 130 135 140  
 Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 165 170 175  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 180 185 190  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 195 200 205  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln  
 210 215 220  
 Gly Thr Leu Val Thr Val ser ser  
 225 230

<210> 5  
 <211> 483  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> región flanqueante de rFW1.4

5

10

- 5 <220>  
<221> CDR  
<222> (24)..(73)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 10 <220>  
<221> CDR  
<222> (89)..(138)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 15 <220>  
<221> CDR  
<222> (171)..(220)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 20 <220>  
<221> CDR  
<222> (277)..(326)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 25 <220>  
<221> CDR  
<222> (341)..(390)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 30 <220>  
<221> CDR  
<222> (423)..(472)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 35 <400> 5

ES 2 618 181 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40 45  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 50 55 60  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 115 120 125  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 130 135 140

ES 2 618 181 T3

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly  
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
225 230 235 240

ser Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val  
245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser  
260 265 270

Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys  
385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
405 410 415

ES 2 618 181 T3

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 465 470 475 480

Val Ser Ser

- 5 <210> 6  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>  
 <223> región flanqueante de cadena pesada variable de rFW1.4(v2)
- 15 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (26)..(75)  
 <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 20 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (90)..(138)  
 <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 25 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (171)..(220)  
 <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 30 <400> 6

ES 2 618 181 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40 45  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 50 55 60  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 115 120 125  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys  
 130 135 140  
 Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 145 150 155 160  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 165 170 175  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 180 185 190  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 195 200 205  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly  
 210 215 220  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 225 230

<210> 7  
 <211> 483  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> región flanqueante de rFW1.4(v2)

5

10

## ES 2 618 181 T3

- 5 <220>  
<221> CDR  
<222> (24)..(73)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 10 <220>  
<221> CDR  
<222> (89)..(138)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 15 <220>  
<221> CDR  
<222> (171)..(220)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 20 <220>  
<221> CDR  
<222> (277)..(326)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 25 <220>  
<221> CDR  
<222> (341)..(390)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 30 <220>  
<221> CDR  
<222> (423)..(472)  
<223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.
- 35 <400> 7

ES 2 618 181 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40 45  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 50 55 60  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 115 120 125  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 130 135 140  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 165 170 175  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 180 185 190



ES 2 618 181 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly  
 210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val  
 245 250 255

Glu ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser  
 260 265 270

Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys  
 385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 450 455 460

ES 2 618 181 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 465 470 475 480

Val ser ser

5 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> enlazador  
 <400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser  
 20

15 <210> 9  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> región flanqueante de cadena ligera variable sustituida de FW1.4

25 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (24)..(73)  
 <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

30 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (89)..(138)  
 <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

35 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (171)..(220)  
 <223> CDR; de al menos 1 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes. Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

40 <400> 9

ES 2 618 181 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40 45  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 50 55 60  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 85 90 95  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 115 120 125  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 130 135 140  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 165 170 175  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 180 185 190  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 195 200 205  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly  
 210 215 220  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 225 230

<210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> enlazador

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar una célula que expresa anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de interés, que comprende:
  - 5 (a) proporcionar una pluralidad de células B que expresan anticuerpo originadas en un animal que se ha inmunizado con un antígeno diana o con ADN que codifica un antígeno de superficie celular, unido de forma funcional a un primer marcador clasificable;
  - (b) proporcionar una pluralidad de células que expresan antígeno unidas de forma funcional a un segundo marcador clasificable, en el que el antígeno de interés se presenta en la superficie de la célula que expresa antígeno;
  - 10 (c) poner en contacto las células que expresan antígeno con las células que expresan anticuerpo; y
  - (d) separar de la pluralidad de células que expresan anticuerpo, una o más células que expresan anticuerpo que pueden unirse específicamente a las células que expresan antígeno usando un clasificador celular, en el que la presencia del primero y segundo marcador clasificable en un complejo celular individual es indicativa de la unión de una célula que expresa anticuerpo a una célula que expresa antígeno, identificando de ese modo una célula que expresa un anticuerpo que se une a un antígeno de interés.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente aislar de forma clonal las células que expresan anticuerpo obtenidas en la etapa (d), opcionalmente seguido por expansión clonal de las células aisladas de forma clonal.
3. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente obtener la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de las células aisladas que expresan anticuerpo.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica anticuerpo se obtiene por PCR.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la PCR es PCR de células individuales.
6. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente someter las células aisladas que expresan anticuerpo a un ensayo basado en células para caracterizar funcionalmente el anticuerpo.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en el que el ensayo basado en células es un CELISA.
8. El método de la reivindicación 1, en el que entre un antígeno y un receptor de células B se forma un complejo celular
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de ratón, de conejo, de pollo, de camélido, de ser humano, humanizados y quiméricos.
- 30 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en inmunoglobulina de longitud completa, Fab, Dab y nanocuerpo.
- 11 El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un scFv.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno de interés se expresa a partir de un gen exógeno.
- 35 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno de interés es un antígeno modificado por ingeniería genética.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno de interés es una proteína integrada de membrana.
- 40 15. El método de la reivindicación 14, en el que la proteína integrada de membrana es un GPCR.
16. El método de la reivindicación 14, en el que la proteína integrada de membrana se selecciona del grupo que consiste en CXCR2, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CFTR, CIC-1, CIC-2, CIC-4, CIC-5, CIC-7, CIC-Ka, CIC-Kb, bestrofinas, TMEM16A, receptor de GABA, receptor de glicina, transportadores ABC, NAV1.1, NAV1.2, NAV1.3, NAV1.4, NAV1.5, NAV1.6, NAV1.7, NAV1.8, NAV1.9, receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P1R) y canal de NMDA.
- 45

17. El método de la reivindicación 14, en el que la proteína integrada de membrana es un canal iónico.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primero o segundo marcador clasificable es un marcador fluorescente.
- 5 19. El método de la reivindicación 18, en el que el marcador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en una proteína fluorescente, un conjugado de anticuerpo/fluor y un marcador celular fluorescente.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el clasificador celular es un clasificador de células activadas por fluorescencia.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células que expresan antígeno son células de levadura, esferoblastos de levadura o células de mamífero.
- 10 22. El método de la reivindicación 21, en el que las células que expresan antígeno son células humanas.
23. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células que expresan antígeno expresan un antígeno exógeno.
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células que expresan antígeno se transfectan con un vector de expresión.
- 15 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células que expresan anticuerpo son células de levadura o de mamífero.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células que expresan anticuerpo son células B.
27. El método de la reivindicación 26, en el que las células B son células B de conejo.
- 20 28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, en el que las células B se aíslan de un animal no humano inmunizado.
29. El método de la reivindicación 28, en el que el animal no humano se inmuniza por vacunación de ADN.
30. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células que expresan anticuerpo comprenden un anticuerpo expresado a partir de un vector de expresión.
- 25 31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-29, en el que las células B se tiñen con anticuerpos anti-IgG y anti-IgM marcados.
32. El método de la reivindicación 31, en el que se seleccionan aquellas células B que expresan IgG, pero no IgM en su superficie.
- 30 33. El método de la reivindicación 31 y 32, en el que el anticuerpo anti-IgG se marca con alofocianina (APC) y el anticuerpo anti-IgM se marca con isotiocianato de fluoresceína (FITC).
34. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de identificar las CDR de dicho anticuerpo e injertar las CDR en regiones flanqueantes del anticuerpo aceptor.
35. El método de la reivindicación 34, en el que las regiones flanqueantes del anticuerpo aceptor comprenden
- 35 (i) una región flanqueante de cadena pesada variable que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO. 1; y/o
- (ii) una región flanqueante de cadena ligera variable que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO. 2.
36. El método de la reivindicación 34 o 35, en el que las regiones flanqueantes del anticuerpo aceptor comprenden
- 40 (i) una región flanqueante de cadena pesada variable seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 1; SEQ ID NO. 4 y SEQ ID NO. 6; y/o
- (ii) una región flanqueante de cadena ligera variable de la SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 9.

37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34-36, que comprende adicionalmente la etapa de introducir

- (a) serina (S) en la posición 12 de la cadena pesada (numeración AHo)
- (b) serina (S) o treonina (T) en la posición 103 de la cadena pesada (numeración AHo); y/o
- (c) serina (S) o treonina (T) en la posición 144 de la cadena pesada (numeración AHo).

5 38. Un método para identificar un clon de célula B que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de interés, que comprende:

- (a) inmunizar un animal no humano con ADN que codifica un antígeno de superficie celular
- (b) aislar células B del animal inmunizado
- (c) marcar las células B con un primer marcador clasificable;
- 10 (d) proporcionar una pluralidad de células que expresan antígeno unidas de forma funcional a un segundo marcador clasificable en el que el antígeno de interés se presenta en la superficie de la célula que expresa antígeno;
- (e) poner en contacto las células que expresan antígeno con las células B;
- 15 (f) separar de la pluralidad de células B, una o más células B que pueden unirse específicamente a las células que expresan antígeno usando un clasificador celular, en el que la presencia del primero y segundo marcador clasificable en un complejo celular individual es indicativa de la unión de una célula B a una célula que expresa antígeno, identificando de ese modo un clon de célula B que se une a un antígeno de interés.

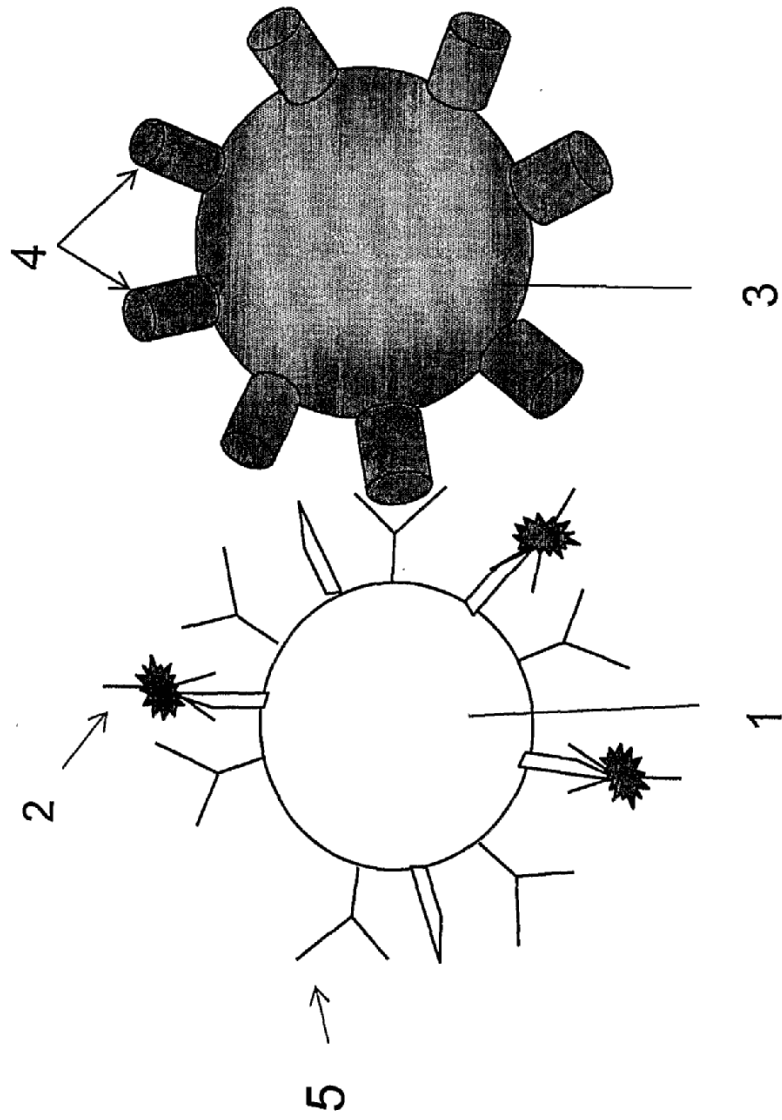


Figura 1

Figura 2A

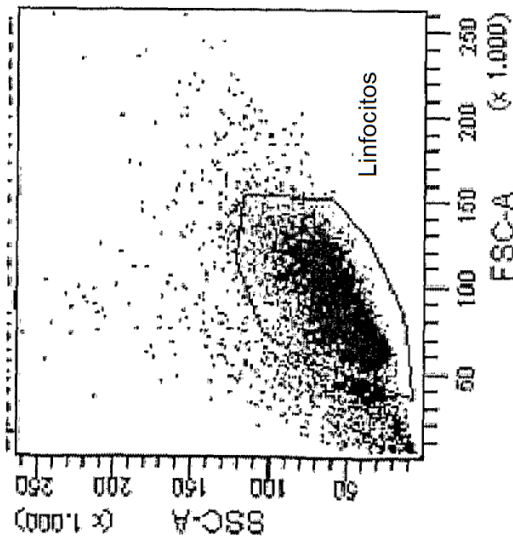


Figura 2B

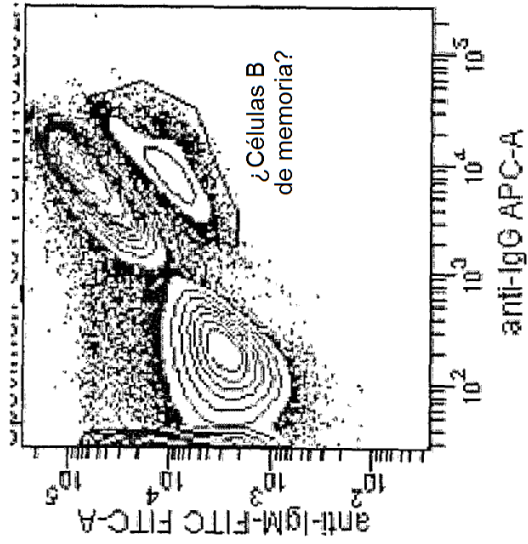


Figura 2C

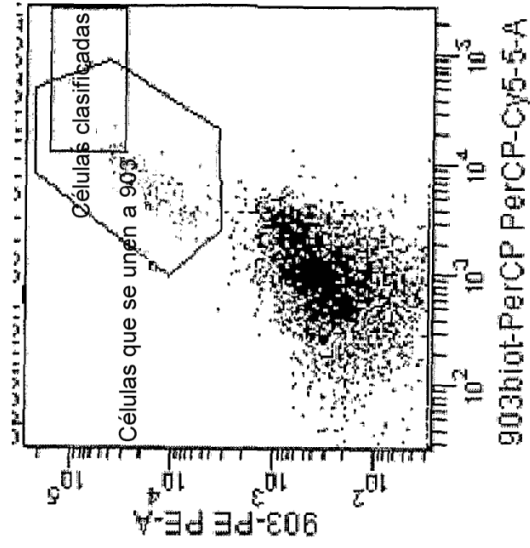




Figura 3

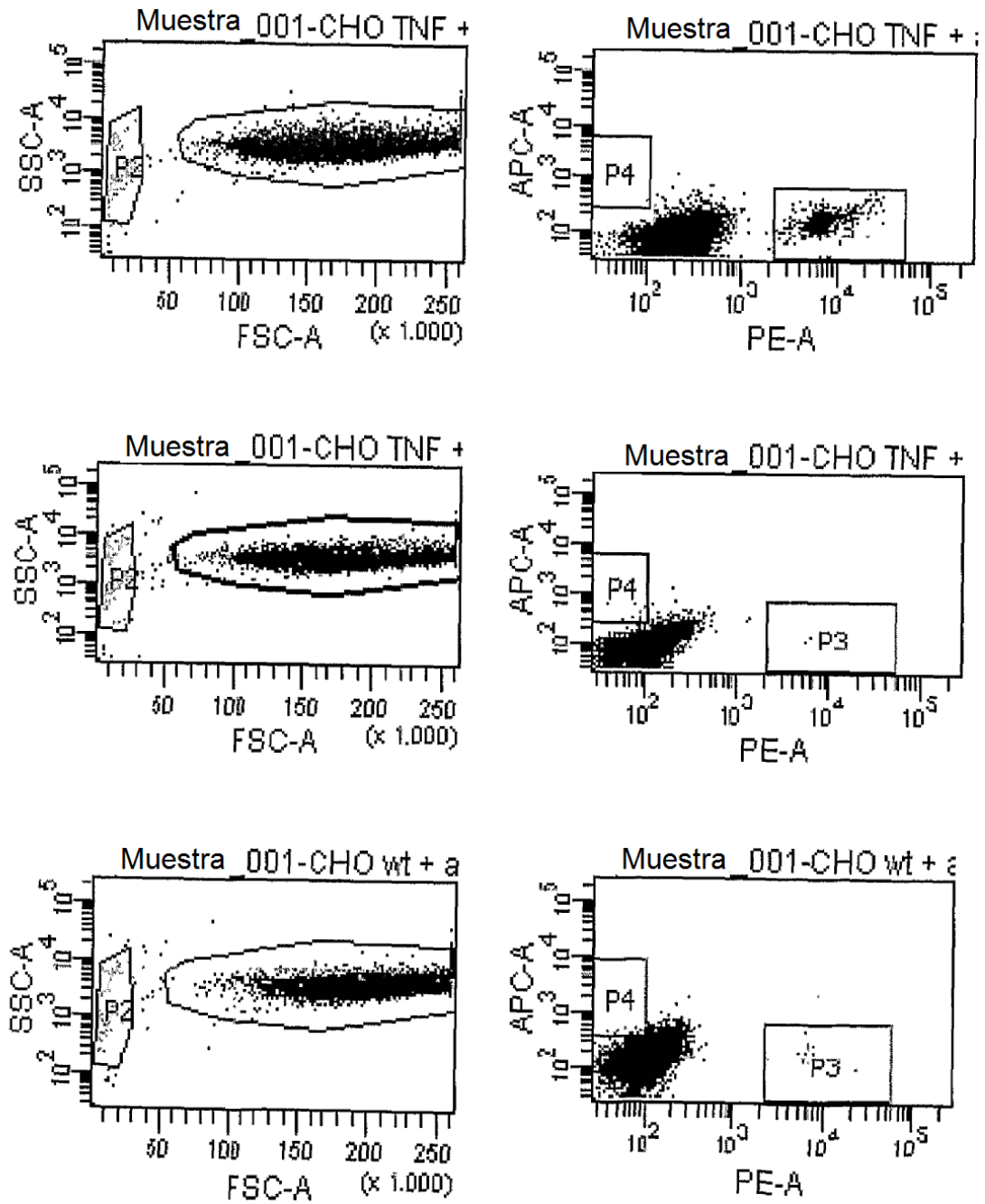


Figura 4

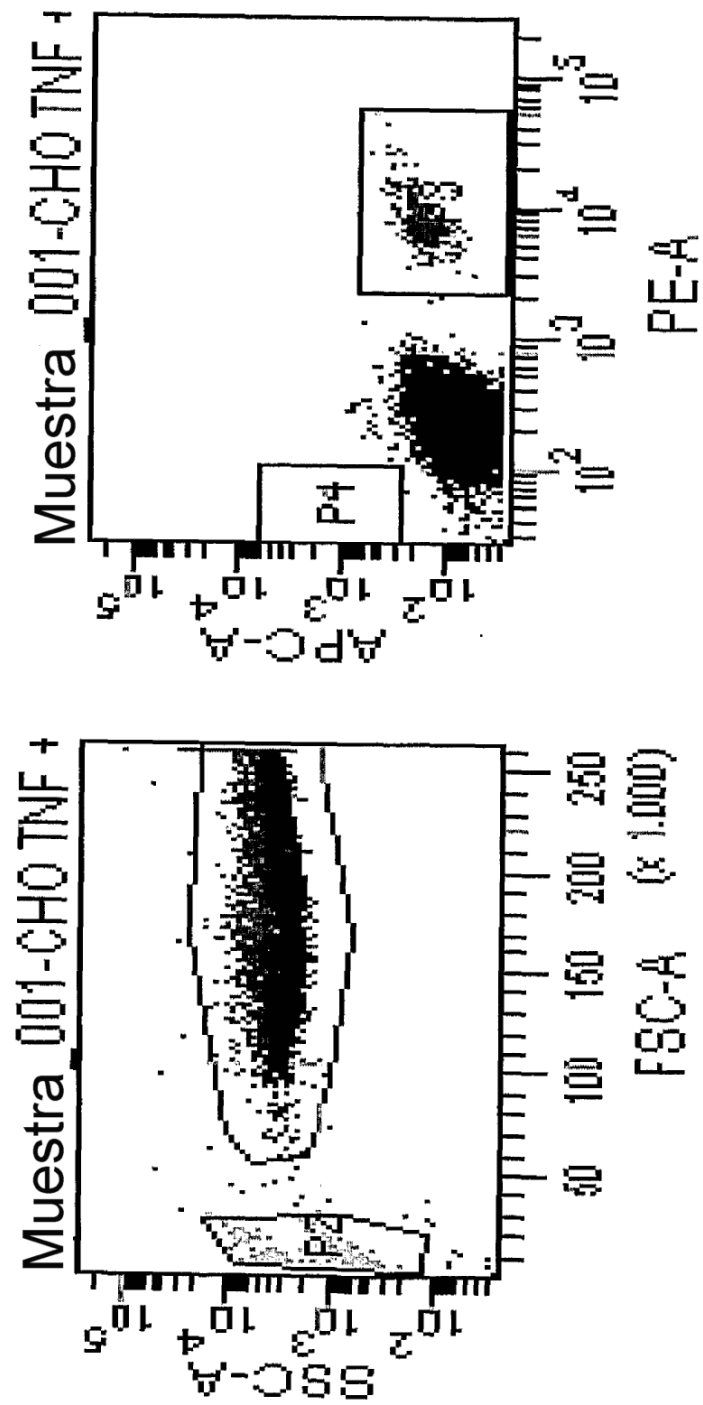


Figura 5a

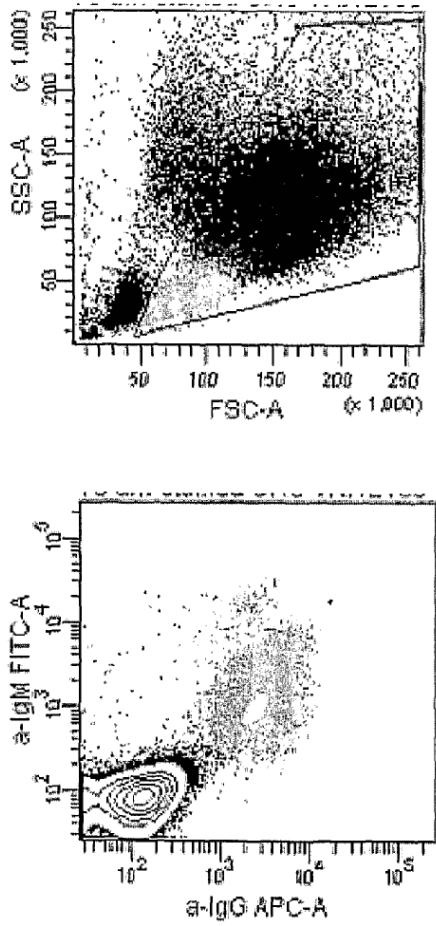


Figura 5b

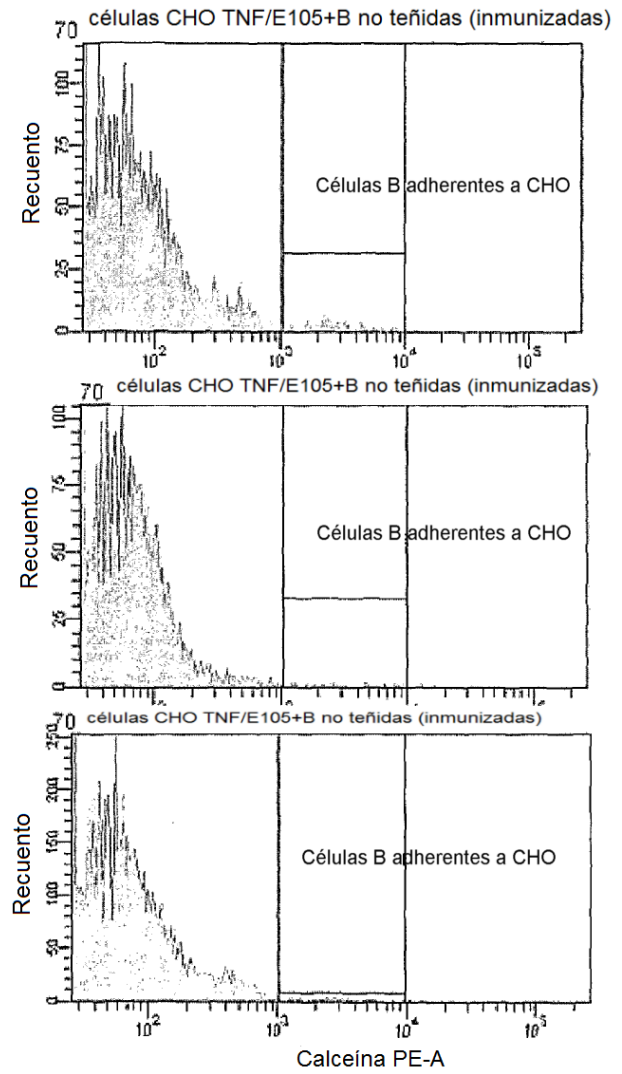


Figura 6a

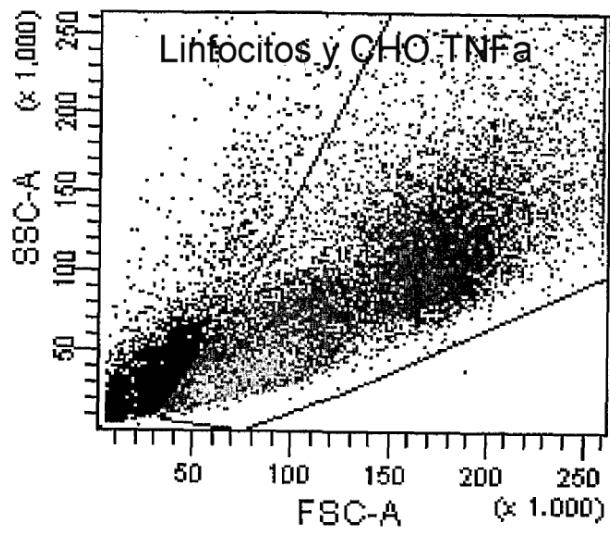


Figura 6b

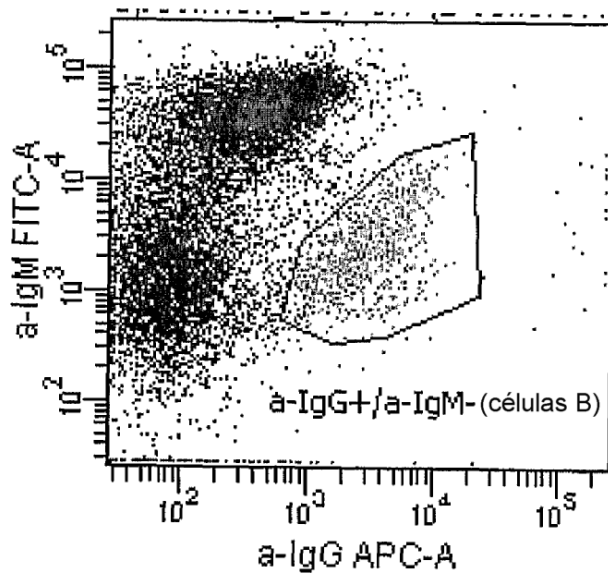


Figura 6c

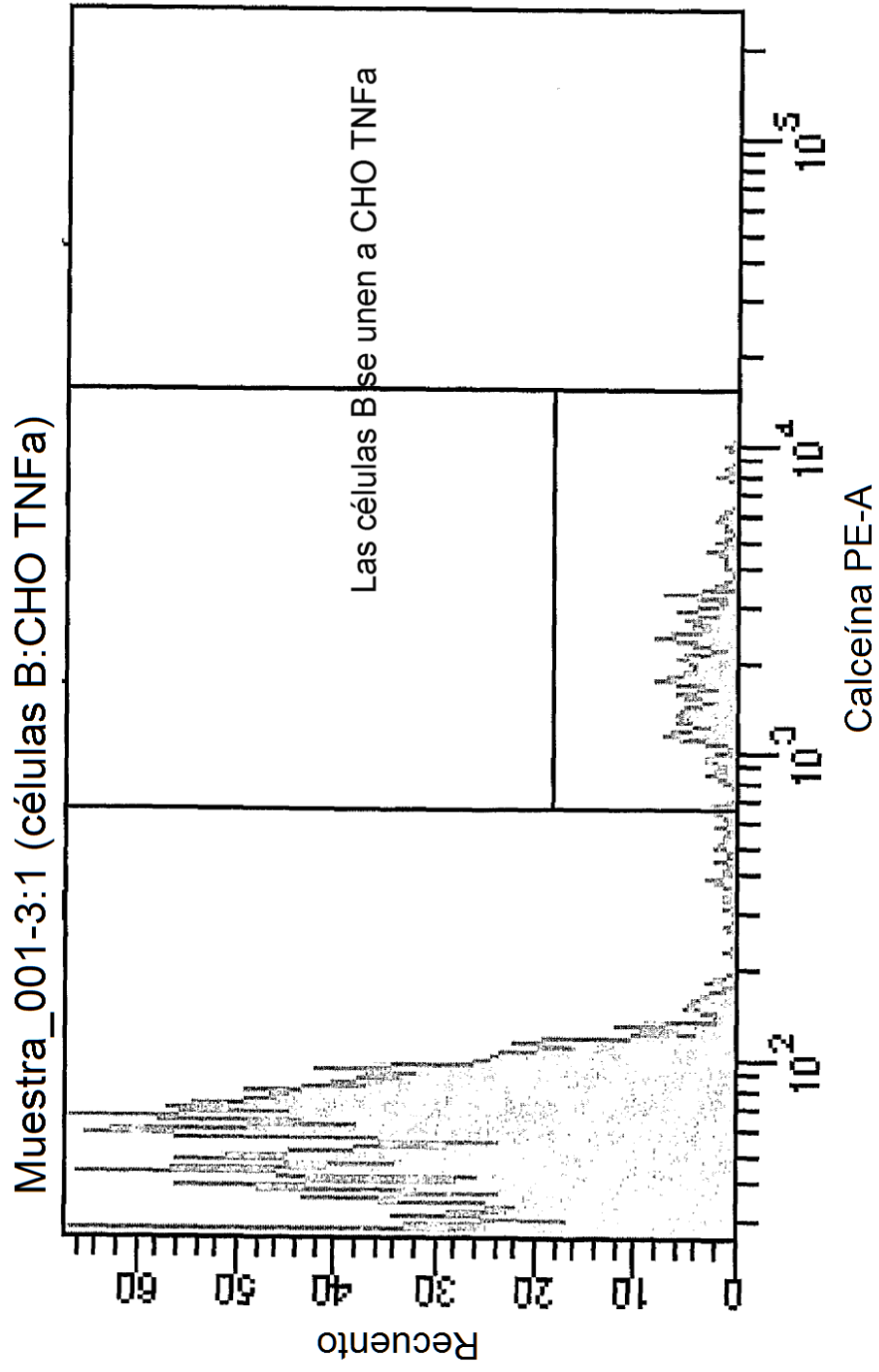


Figura 7

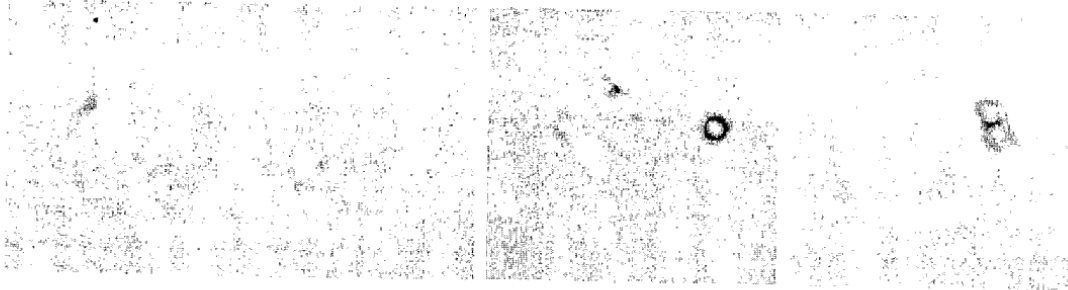


Figura 8a

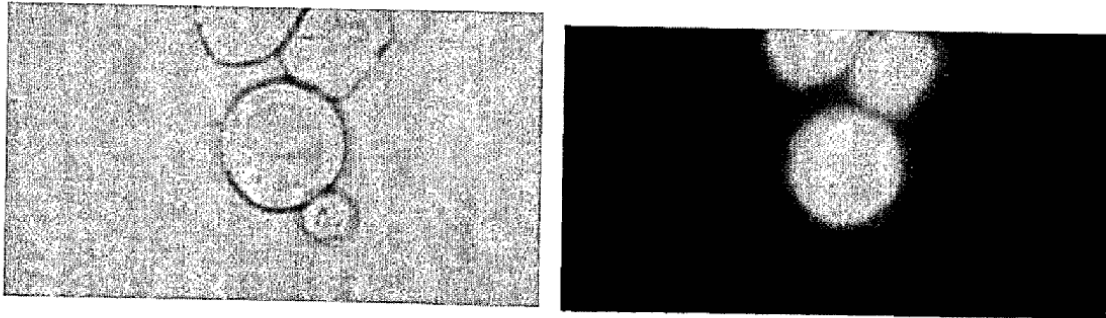


Figura 8b

