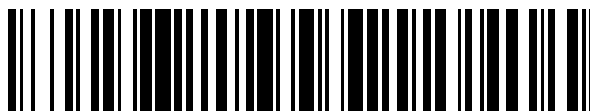


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 976**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
C40B 50/06 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2014** **PCT/EP2014/073713**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015** **WO15063331**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2014** **E 14798742 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 3066120**

54 Título: **Anticuerpo sintético de un solo dominio**

30 Prioridad:

04.11.2013 EP 13191444

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2019

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
INSTITUT CURIE (25.0%);
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (25.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS (25.0%)

72 Inventor/es:

OLICHON, AURÉLIEN;
MOUTEL, SANDRINE y
PEREZ, FRANCK

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 698 976 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

Anticuerpo sintético de un solo dominio

5 **Sector de la técnica**

La divulgación se refiere a la identificación de un armazón de anticuerpo sintético de un solo dominio altamente estable y su uso en la generación de la biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio. La divulgación también se refiere a proteínas de unión a antígeno que comprenden dicho armazón de anticuerpo de un solo dominio estable y sus usos, en particular como agentes terapéuticos.

Estado de la técnica

Durante la última década, los anticuerpos se impusieron como uno de los enfoques terapéuticos más prometedores, en particular en el campo de la oncología, así como una importante fuente de herramientas de investigación o diagnóstico.

La inmunoglobulina G (IgG) es la estructura básica de un anticuerpo típico, que comprende dos heterodímeros de cadenas pesadas y ligeras que se unen entre sí mediante un puente disulfuro. Sin embargo, se han descubierto anticuerpos naturales de una sola cadena en al menos dos grupos de animales: camélidos (Hamers-Casterman et al, 1993, Nature, 363, pág. 446-448) y tiburones (Greenberg et al, Nature. 1995, Mar 9; 374(6518):168-73). Estos anticuerpos de una sola cadena constituyen una clase adicional de IgG desprovista de cadena ligera. La parte de reconocimiento de estos anticuerpos naturales de una sola cadena incluye solamente el dominio variable de la cadena pesada llamado VHH. Los VHH contienen cuatro regiones marco (FR) que forman el armazón del dominio IgG y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que están involucradas en la unión al antígeno.

Se han indicado muchas ventajas del armazón de los VHH: sin puentes disulfuro entre cadenas, generalmente son más solubles y estables en un ambiente reductor (Wesolowski et al, 2009 Med Microbiol Immunol. Aug; 198(3):157-74). También se ha indicado que los VHH tienen mayor solubilidad, rendimiento de expresión y termoestabilidad debido a su pequeño tamaño (15 kDa) (Jobling SA et al, Nat Biotechnol. Enero de 2003; 21 (1): 77-80). Por otra parte, las regiones marco de los VHH muestran una alta homología de secuencia y estructural con los dominios VH humanos de la familia III (Muyldermans et al, 2001. J Biotechnol. Junio; 74 (4): 277-302) y los VHH tienen una inmunogenicidad comparable a los VH humanos y, por lo tanto, constituyen agentes muy interesantes para aplicaciones terapéuticas, algunos de ellos se encuentran actualmente en ensayos clínicos de fase II (Ablynx Nanobodies®). En diez aminoácidos que difieren de los humanos, se identificaron cuatro aminoácidos distintivos de los VHH en la región marco-2.

Las propiedades de los armazones de los VHH tienen muchas ventajas, para su uso en terapia: tienen una mejor penetración en los tejidos, una depuración más rápida en los riñones, una alta especificidad pero también una inmunogenicidad reducida.

Las bibliotecas de anticuerpos de camélidos se han descrito, por ejemplo, en el documento US2006/0246058 (National Research Council of Canada) o en Muyldermans, reviews in molecular biotechnology, elsevier, Amsterdam NL vol. 74, n.º4, 1 de junio de 2001, páginas 277-302. La biblioteca de presentación en fagos describe fragmentos de anticuerpos de llama, y especialmente fragmentos de un solo dominio de cadenas pesadas variables (VHH y VH). Las bibliotecas se realizaron utilizando genomas de linfocitos de animales no inmunizados (biblioteca sin tratamiento previo). La biblioteca de presentación en fagos resultante también contiene contaminantes de fragmentos de anticuerpos VH convencionales.

La patente de Estados Unidos US 7.371.849 (Institute For Antibodies Co., Ltd) también informa sobre métodos para hacer bibliotecas de VHH a partir de genes de VHH de camélidos. La diversidad de dicha biblioteca se obtuvo al mejorar el proceso convencional de aislamiento de las regiones variables de VHH del repertorio sin tratamiento previo.

Sin embargo, estas técnicas anteriores no abordan el problema de la inmunogenicidad de los anticuerpos derivados no humanos. Incluso si algunos de ellos se identifican para unirse a dianas específicas de interés, no pueden administrarse en pacientes para su uso como agentes terapéuticos sin el riesgo de activar el sistema inmunitario humano.

Un método para humanizar un anticuerpo de camélidos de un solo dominio se describe en Vincke et al., 2008, JBC Vol 284(5) pág. 3273-3284.

La patente de Estados Unidos US 8.367.586 divulga una colección de anticuerpos sintéticos o sus fragmentos. Estos anticuerpos comprenden pares de cadena pesada variable y cadena ligera variable y tienen, en su región marco, una parte de las secuencias genéticas óptimas de la línea germinal. Esta incorporación de secuencia humana permite disminuir el riesgo de inmunogenicidad para uso terapéutico.

Monegal et al (2012, Dev Comp Immunol. 36(1):150-6) indica que los anticuerpos de un solo dominio con distintivos

de VH se identifican de manera repetida durante el biopanning de las bibliotecas de llama sin tratamiento previo. De hecho, los distintivos de los VH se identifican con más frecuencia en los aglutinantes seleccionados de la biblioteca sin tratamiento previo de los VHH, que los distintivos de los VHH. Por ejemplo, Monegal et al han demostrado que el 5% de los VH (Monegal et al (2012, Dev Comp Immunol. 36(1):150-6) indica que los anticuerpos de un solo dominio con distintivos de VH se identifican de manera repetida durante el biopanning de las bibliotecas de llama sin tratamiento previo. De hecho, los distintivos de los VH se identifican con más frecuencia en los aglutinantes seleccionados de la biblioteca sin tratamiento previo de los VHH, que los distintivos de los VHH. Por ejemplo, Monegal et al han demostrado que el 5% de los distintivos de VH se encuentran en la biblioteca sin tratamiento previo, mientras que el 20% de estos distintivos de VH se encuentran entre los anticuerpos seleccionados después del biopanning contra antígenos.

Por lo tanto, a pesar de este conocimiento, todavía existe la necesidad de proporcionar bibliotecas de anticuerpos de un solo dominio, con alta diversidad, y capaces de generar anticuerpos de un solo dominio humanizados altamente estables con alta afinidad con una diana deseada.

En consecuencia, un aspecto de la divulgación es proporcionar una biblioteca de anticuerpos de un solo dominio recombinantes, no inmunitaria, de alta diversidad, capaz de generar una biblioteca de anticuerpos de un solo dominio altamente estable con alta afinidad para un antígeno específico. Otro aspecto es proporcionar una biblioteca enriquecida en anticuerpos de un solo dominio activos en el entorno intracelular. Otro aspecto más es proporcionar una biblioteca enriquecida en anticuerpos de un solo dominio con alta termoestabilidad.

Objeto de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Los propósitos de la divulgación se logran mediante un método para hacer una biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio, comprendiendo dicho método las etapas de:

i) introducir una diversidad de ácidos nucleicos que codifican CDR1, CDR2 y CDR3, entre las respectivas regiones codificantes marco de un anticuerpo sintético de un solo dominio (que en adelante se denomina "hs2dAb") para generar una diversidad de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos sintéticos de un solo dominio con la misma secuencia de aminoácidos de armazón sintético de un solo dominio;

en donde dicha secuencia de aminoácidos de armazón sintético de un solo dominio contiene al menos los siguientes restos de aminoácidos de los VHH de camélidos originales: F37, E44, R45, F47 y; al menos los siguientes restos de aminoácidos humanizados: P14, S49, S74, R83, A84, y opcionalmente comprenden además los restos de los VHH de camélidos originales Q5, Q108 y T89.

En una realización específica, el anticuerpo sintético de un solo dominio (hs2dAb) deriva de los VHH de especies de Lama y comprende los siguientes restos de aminoácidos humanizados: F11, P14, S49, S74, K75, V78, Y79, S82b, R83 y A84. En una realización específica relacionada, el anticuerpo sintético de un solo dominio puede comprender todos los siguientes restos de aminoácidos: Q5, A8, F11, P14, F37, K43, E44, R45, F47, S49, A50, S74, K75, V78, Y79, S82b, R83, A84, T89, Q108, en donde las posiciones de los restos de aminoácidos se indican de acuerdo con la nomenclatura de Kabat utilizada para la secuencia de aminoácidos de los VH y VHH.

En una realización específica, el anticuerpo sintético de un solo dominio comprende las siguientes regiones marco que consisten en FR1 de la SEQ ID NO: 1, FR2 de la SEQ ID NO:2, FR3 de la SEQ ID NO: 3 y FR4 de la SEQ ID NO:4, o regiones marco de variante funcional, por ejemplo con no más de 1, 2 o 3 sustituciones conservativas de aminoácidos dentro de cada región marco.

En una realización preferida, los restos de aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 sintéticas se determinan mediante las siguientes reglas:

en la posición 1 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A o D;

en la posición 2 de la CDR1: Y, S, T, F, G, T, o T;

en la posición 3 de la CDR1: Y, S, F o W;

en la posición 4 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K o N;

en la posición 5 de la CDR1: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q o L;

en la posición 6 de la CDR1: S, T, Y, D, o E;

en la posición 7 de la CDR1: S, T, G, A, D, E, N, I, o V;

en la posición 1 de la CDR2: R, S, F, G, A, W, D, E, o Y;

en la posición 2 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L o Y;

5 en la posición 3 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;

en la posición 4 de la CDR2: G, S, T, N, o D;

en la posición 5 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K o M;

10 en la posición 6 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, o K;

en la posición 7 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, o V;

15 En una realización relacionada que puede combinarse con la realización anterior, dicha secuencia de aminoácidos de CDR3 comprende entre 9 y 18 aminoácidos. En una realización relacionada que puede combinarse con la realización anterior, dicha secuencia de aminoácidos de CDR3 comprende restos de aminoácidos seleccionados entre uno o más de los siguientes aminoácidos: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K, M.

20 La divulgación también se refiere a una biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio obtenible mediante el método descrito anteriormente y que comprende al menos 3.10⁹ secuencias codificantes de anticuerpos de un solo dominio distintas.

25 La divulgación se refiere además al uso de dicha biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio, en un método de análisis, p. ej. la presentación en fago, para identificar un anticuerpo sintético de un solo dominio que se une a una diana de interés, por ejemplo, una proteína humana.

30 Por último, la divulgación trata sobre una proteína de unión a antígeno, que comprende un anticuerpo sintético de un solo dominio de la siguiente fórmula: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, en donde dichas regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 contienen al menos los siguientes restos de aminoácidos de los VHH de camélidos originales: F37, E44, R45, F47 y, al menos los siguientes restos de aminoácidos humanizados: P14, S49, S74, R83, A84. Dichas regiones marco pueden contener además al menos los siguientes restos de aminoácidos: Q5, Q108 y T89. En una realización preferida, la proteína de unión a antígeno comprende un anticuerpo sintético de un solo dominio con al menos la siguiente combinación específica de restos de aminoácidos: Q5, A8, F11, P14, F37, K43, E44, R45, F47, 35 S49, A50, S74, K75, V78, Y79, S82b, R83, A84, T89, Q108.

En una realización específica que puede combinarse con las realizaciones anteriores, la proteína de unión a antígeno comprende un anticuerpo sintético de un solo dominio que tiene una o más de las siguientes propiedades funcionales:

- 40 a) se puede expresar como un anticuerpo de un solo dominio soluble en el periplasma de *E. coli*,
b) puede expresarse como intracuerpos solubles en *E. coli*, levadura u otro citosol eucariota,
45 c) es estable en un ambiente reductor como se muestra en el ensayo de fusión de cloranfenicol acetil transferasa,
d) no se agrega cuando se expresa en células de mamíferos, incluso como proteínas de fusión (por ejemplo, fusión de proteínas fluorescentes).

50 En una realización preferida, las regiones marco de la proteína de unión a antígeno derivan de las regiones marco de los VHH FR1, FR2, FR3 y FR4 de las especies Lama que consisten en FR1 de la SEQ ID NO: 1, FR2 de la SEQ ID NO:2, FR3 de la SEQ ID NO: 3 y FR4 de la SEQ ID NO:4, o, sus variantes funcionales, por ejemplo, con no más de 0, 1, 2 o 3 sustituciones conservativas de aminoácidos en cada una de las FR1, FR2, FR3 y FR4.

55 En otra realización preferida, que puede combinarse con las realizaciones anteriores, los restos de aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 sintéticas se distribuyen de la siguiente manera:

en la posición 1 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A o D;

en la posición 2 de la CDR1: Y, S, T, F, G, T, o T;

60 en la posición 3 de la CDR1: Y, S, S, S, F o W;

en la posición 4 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K o N;

65 en la posición 5 de la CDR1: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q o L;

en la posición 6 de la CDR1: S, T, Y, D, o E;

en la posición 7 de la CDR1: S, T, G, A, D, E, N, I, o V;

5 en la posición 1 de la CDR2: R, S, F, G, A, W, D, E, o Y;

en la posición 2 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L o Y;

10 en la posición 3 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;

en la posición 4 de la CDR2: G, S, T, N, o D;

en la posición 5 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K o M;

15 en la posición 6 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, o K;

en la posición 7 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, o V;

20 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 comprende entre 9 y 18 aminoácidos seleccionados entre uno o más de los siguientes aminoácidos: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K, M.

Descripción detallada de la invención

25 En la presente descripción, las posiciones de los restos de aminoácidos en los anticuerpos sintéticos de un solo dominio o sus fragmentos se indican de acuerdo con la nomenclatura de numeración de Kabat como se muestra a continuación:

Tabla 1

FR o CDR	VL	VH
FR1	1-23	1-22
CDR1	24-34	31-35B
FR2	35-49	36-49
CDR2	50-56	50-65
FR3	57-88	66-91
CDR3	89-97	95-102
FR4	98-107	103-113

30 La presente divulgación proporciona un método para hacer una biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio, comprendiendo dicho método

35 i. introducir una diversidad de ácidos nucleicos sintéticos que codifican CDR1, CDR2 y CDR3, entre las respectivas regiones codificantes marco de un anticuerpo sintético de un solo dominio para generar ácidos nucleicos que codifican una diversidad de anticuerpos sintéticos de un solo dominio con la misma secuencia de aminoácidos de armazón de anticuerpo sintético de un solo dominio,

40 en donde dicha secuencia de aminoácidos de armazón sintético de un solo dominio contiene al menos los siguientes restos de aminoácidos de los VHH de camélidos originales: F37, E44, R45, F47 y; al menos los siguientes restos de aminoácidos humanizados: P14, S49, S74, R83, A84, y opcionalmente comprenden además los restos de los VHH de camélidos originales Q5, Q108 y T89.

El armazón del anticuerpo sintético de un solo dominio de la divulgación

45 La divulgación se refiere a la identificación de características únicas en regiones marco de anticuerpos de un solo dominio, para obtener un armazón de anticuerpo de un solo dominio altamente estable y su uso en la generación de la biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio, tales como biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos sintéticos de un solo dominio. El hs2dAb resultante con dicho armazón único es altamente estable y tiene bajo riesgo de inmunogenicidad.

50 Como material de partida para hacer la biblioteca, se puede proporcionar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de un solo dominio.

55 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo de un solo dominio" se refiere a un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de solo 12-15 kDa, que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico derivado de una cadena pesada. Dicho anticuerpo de un solo dominio puede derivar de fragmentos de

anticuerpos de origen natural que carecen de cadenas ligeras, como los llamados anticuerpos VHH derivados de anticuerpos de camélidos o los llamados fragmentos VNAR derivados de anticuerpos de especies de tiburones. Dicho anticuerpo de un solo dominio también puede derivar de anticuerpos humanos con las siguientes mutaciones específicas: F37, E44, R45 y F47. Por lo tanto, el anticuerpo de un solo dominio contiene al menos 4 regiones marco interespariadas por 3 regiones CDR hipervariables, lo que da como resultado la siguiente estructura de dominio variable de anticuerpo típica: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Dicho dominio único no interactúa con la región variable del anticuerpo de cadena ligera para formar un heterodímero convencional de la estructura de VH de unión al antígeno de las cadenas pesada y ligera.

Como se usa en el presente documento, el término "sintético" significa que dicho anticuerpo no se ha obtenido a partir de fragmentos de anticuerpos naturales, sino que se produce a partir de ácidos nucleicos recombinantes que comprenden secuencias codificantes artificiales.

En particular, las bibliotecas de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la divulgación se han generado mediante síntesis de marcos y secuencias codificantes de CDR artificiales. A diferencia de las bibliotecas obtenidas por amplificación de repertorio sin tratamiento previo de animales de llama no inmunizados, la biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la divulgación no contiene anticuerpo VH convencional.

Ventajosamente, en una realización preferida de la biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la presente divulgación, todos los clones de anticuerpos de un solo dominio contienen las mismas regiones marco, proporcionando de este modo un almacén único de anticuerpos sintéticos de un solo dominio.

Como se usa en el presente documento, el término "almacén" se refiere a las 4 regiones marco de los anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la biblioteca de la divulgación. Normalmente, todos los anticuerpos de un solo dominio de una biblioteca de la divulgación tienen las mismas secuencias de aminoácidos del almacén, mientras que sus CDR pueden ser diferentes (la diversidad de cada biblioteca está solo en las regiones CDR).

El almacén del anticuerpo sintético de un solo dominio de acuerdo con la presente divulgación contiene al menos los siguientes residuos de aminoácidos VHH de camélidos originales: F37, E44, R45, F47 y; al menos los siguientes restos de aminoácidos humanizados: P14, S49, S74, R83, A84. Dicho almacén sintético de un solo dominio de la presente divulgación puede comprender además opcionalmente los restos de VHH de camélidos originales Q5, Q108 y T89. Estas características únicas proporcionan un anticuerpo sintético de un solo dominio sintético altamente estable con bajo riesgo de inmunogenicidad.

En una realización específica, el almacén del anticuerpo sintético de un solo dominio se obtiene mutagenizando una secuencia codificante de VHH del anticuerpo de almacén de especies de Lama para obtener al menos los siguientes restos de aminoácidos humanizados en la secuencia de aminoácidos: P14, S49, S74, R83, A84, y preferentemente, los siguientes restos de aminoácidos humanizados: F11, P14, S49, S74, K75, V78, Y79, S82b, R83 y A84.

En una realización específica que puede combinarse con la realización anterior, el almacén del anticuerpo sintético de un solo dominio comprende

(i) una secuencia de aminoácidos de FR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de FR2 de Llama de la línea germinal;

(ii) una secuencia de aminoácidos de FR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de FR3 (VH3) humana de la línea germinal; y

(iii) una secuencia de aminoácidos de FR4 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de FR4 de Llama de la línea germinal.

En una realización específica que puede combinarse con las realizaciones anteriores, el almacén del anticuerpo sintético de un solo dominio comprende, por lo tanto, la siguiente combinación específica de restos de aminoácidos: Q5, A8, F11, P14, F37, K43, E44, R45, F47, S49, A50, S74, K75, V78, Y79, S82b, R83, A84, T89, Q108.

En otra realización específica, el almacén del anticuerpo sintético de un solo dominio comprende las siguientes regiones marco que consisten en FR1 de la SEQ ID NO: 1, FR2 de la SEQ ID NO:2, FR3 de la SEQ ID NO: 3 y FR4 de la SEQ ID NO:4, o regiones marco de variante funcional, por ejemplo con no más de 1, 2 o 3 sustituciones conservativas de aminoácidos dentro de cada región marco, más preferentemente, dentro de una sola región marco.

Un ejemplo de un almacén de un anticuerpo sintético de un solo dominio se muestra en la figura 1.

Sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas

laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, la serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

5 En otra realización, el almacén del anticuerpo sintético de un solo dominio comprende variantes funcionales de las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 que tienen al menos un 90%, preferentemente un 95% de identidad con las SEQ ID NO:1-4, respectivamente.

10 Como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas/ n° de posiciones totales x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que necesita introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. Puede realizarse una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático, como se describe más adelante.

15 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Myers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17, 1988) que se ha incorporado al programa ALIGN. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG. Otro programa más para determinar el porcentaje de identidad es CLUSTAL (M. Larkin et al., Bioinformatics 23:2947-2948, 2007; descrito primero por D. Higgins y P. Sharp, Gene 73: 237-244, 1988) que está disponible como un programa independiente o a través de servidores web (ver <http://www.clustal.org/>).

25 Las variantes funcionales pueden probarse para determinar su capacidad para retener las propiedades ventajosas de dicho almacén sintético de un solo dominio de la presente divulgación. En particular, se puede probar su capacidad para retener al menos una o más de las siguientes propiedades:

- 30 i. se puede expresar como un anticuerpo de un solo dominio soluble en el periplasma de *E. coli*,
- ii. se puede expresar como intracuerpos solubles en *E. coli*, levadura u otro citosol eucariota,
- iii. es estable en ambiente reductor en el ensayo de fusión de cloranfenicol acetil transferasa,
- 35 iv. no se agrega cuando se expresa en células de mamíferos, incluso como proteínas de fusión (por ejemplo, fusión de proteínas fluorescentes).

Los ensayos para probar las propiedades anteriores se describen en los ejemplos.

40 Por ejemplo, se construye una secuencia codificante del anticuerpo sintético de un solo dominio de referencia mediante el injerto de las secuencias codificantes de CDR de referencia (como las CDR del clon D10 de la SEQ ID NO: 9) en una secuencia codificante de almacén variante que se va a probar (con secuencias homólogas a las SEQ ID NO: 1-4). Esta secuencia codificante del anticuerpo sintético de un solo dominio de referencia permite producir un anticuerpo sintético de un solo dominio de referencia que puede analizarse para las propiedades anteriores.

45 **Introducción de diversidad de CDR en el almacén de anticuerpo de un solo dominio seleccionado**

50 Los métodos para generar diversidad de CDR para bibliotecas de anticuerpos, en particular mediante síntesis aleatoria o dirigida de secuencias codificantes de CDR y clonación en secuencias marco correspondientes se han descrito ampliamente en la técnica.

55 Las bibliotecas de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la presente divulgación se generan de manera similar mediante la introducción de una alta diversidad de CDR en la única secuencia de almacén seleccionada, por ejemplo, como se describe en Lindner, T., H. Kolmar, U. Haberkorn, and W. Mier. 2011. Molecules. 16:1625-1641.

En una realización preferida de la presente divulgación, la posición de cada secuencia de aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 sintéticas está diseñada racionalmente para imitar la diversidad natural de CDR en el repertorio humano.

60 Las cisteínas se evitan voluntariamente debido a sus grupos tiol que pueden interferir con la expresión y la funcionalidad intracelular. Además, la arginina y los restos hidrófobos también se pueden evitar debido a la agregación de alto riesgo del anticuerpo resultante. También se prefiere una baja tasa de prolina porque proporciona más flexibilidad en las CDR. Preferentemente, la serina, la treonina y la tirosina son los restos más frecuentes en las tres CDR, ya que están involucradas en los enlaces con el epítopo. El aspartato y el glutamato también pueden enriquecerse en algunas posiciones para aumentar la solubilidad. Para las secuencias CDR3, las longitudes pueden influir en el potencial de unión a diferentes formas de epítopos, en una cavidad concreta. Por lo tanto, se pueden introducir diferentes longitudes de secuencias CDR3 en las bibliotecas.

En una realización específica, el experto en la materia puede seleccionar los restos de aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 sintéticas de acuerdo con las siguientes reglas:

en la posición 1 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A o D;

en la posición 2 de la CDR1: Y, S, T, F, G, T, o T;

en la posición 3 de la CDR1: Y, S, F o W;

en la posición 4 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K o N;

en la posición 5 de la CDR1: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q o L;

en la posición 6 de la CDR1: S, T, Y, D, o E;

en la posición 7 de la CDR1: S, T, G, A, D, E, N, I, o V;

en la posición 1 de la CDR2: R, S, F, G, A, W, D, E, o Y;

en la posición 2 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L o Y;

en la posición 3 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;

en la posición 4 de la CDR2: G, S, T, N, o D;

en la posición 5 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K o M;

en la posición 6 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, o K;

en la posición 7 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, o V;

Además, en otra realización específica, la secuencia de aminoácidos de CDR3 comprende entre 9 y 18 aminoácidos seleccionados entre uno o más de los siguientes aminoácidos: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K, M.

Las reglas de aparición anteriores se utilizan como una guía para generar bibliotecas preferidas de la divulgación, sin embargo, otras bibliotecas con diferentes reglas de aparición también forman parte de la divulgación, siempre que contengan el armazón de anticuerpo sintético de un solo dominio ventajoso de la presente divulgación.

En realizaciones específicas, solo una proporción significativa de los clones de la biblioteca puede seguir estrictamente las reglas de aparición anteriores. Por ejemplo, estadísticamente, al menos el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80% o al menos el 90% de los clones de la biblioteca siguen las reglas anteriores de aparición de restos de aminoácidos en las posiciones de CDR1, CDR2 y CDR3.

Con el fin de respetar estas apariciones de las posiciones de aminoácidos, y para evitar la aparición de detenciones en el marco de lectura, o la aparición de cisteína o reducir el desplazamiento del marco de lectura, se utilizan preferentemente enfoques avanzados de síntesis de genes. Estos métodos abarcan, pero sin limitación, bloques de tripletes de ADN de doble cadena como se describe en Van den Brulle et al., 2008, *Biotechniques* 45(3): 340-3, síntesis de tri-nucleótidos, u otros enfoques de síntesis degenerada controlados por codón y, más generalmente, controlados por posición.

En realizaciones específicas, la preferencia codónica puede optimizarse adicionalmente, por ejemplo, para especies de células hospedadoras, por ejemplo, la expresión de células hospedadoras de mamíferos, usando métodos bien conocidos.

En una realización específica, la secuencia codificante se diseña de manera que no contenga sitios de restricción no deseados, por ejemplo, sitios de restricción que se usan para clonar la secuencia codificante en el vector de clonación o expresión apropiado.

Las diversas secuencias codificantes resultantes se introducen en vectores de expresión o clonación adecuados para bibliotecas de anticuerpos. En una realización específica, el vector de expresión es un plásmido. En otra realización preferida, el vector de expresión es adecuado para generar bibliotecas de presentación en fagos. Se pueden usar dos tipos diferentes de vectores para generar bibliotecas de presentación en fagos: vectores fagémidos y vectores de fagos.

Los fagémidos derivan de vectores de fagos filamentosos (derivados de fagos Ff), que contienen el origen de replicación de un plásmido. Los componentes básicos de un fagémido incluyen principalmente el origen de replicación

de un plásmido, el marcador selectivo, la región intergénica (la región IG, por lo general contiene la secuencia de empaquetamiento y el origen de replicación de cadenas menos y más), un gen de una proteína de recubrimiento de fago, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, un promotor y un segmento de ADN que codifica un péptido señal. Adicionalmente, se puede incluir una etiqueta molecular para facilitar el análisis de la biblioteca basada en fagémidos. Los fagémidos se pueden convertir en partículas de fago filamentosas con la misma morfología que el fago Ff por coinfección con los fagos auxiliares, tales como R408, M13KO7 y VCSM13 (Stratagene). Un ejemplo de vector de fago es fd-tet (Zacher et al, gene, 1980, 9, 127-140) que consiste en el genoma del fago fd y un segmento de Tn10 insertado cerca del origen de replicación del genoma del fago. Los ejemplos de promotores para su uso en vectores fagémidos incluyen, sin limitación, PlacZ o PT7, ejemplos de péptidos señal incluyen, sin limitación, líder pelB, gIII, líder CAT, SRP o péptido señal OmpA.

Otros métodos de presentación en fagos utilizan fagos líticos como T4 o T7. También se pueden usar vectores distintos a los fagos para generar bibliotecas de presentación, incluidos vectores para la presentación en células bacterianas (Daugherty et al., 1999 Protein Eng. Jul;12(7):613-21., Georgiou et al., 1997 Nat Biotechnol. 1997 Jan;15(1):29-34), presentación en células de levaduras (Boder and Wittrup, Nat Biotechnol. Junio de 1997; 15(6):553-7) o presentación en ribosomas (Zahnd C, Amstutz P, Plückthun A. Nat Methods. Marzo de 2007 Mar;4(3):269-79). También se han indicado la presentación de ADN (Watabe et al., Protein Engineering, Design & Selection vol. 22 no. 11 pp. 691-698, 2009) y la presentación en superficie en células de mamíferos (Rode HJ, et al. Biotechniques. octubre de 1996;21(4):650, 652-3, 655-6, 658). También se pueden usar métodos de no presentación como el sistema de dos híbridos en levadura para seleccionar los aglutinantes relevantes de la biblioteca (Visintin et al., 1999 Proc Natl Acad Sci U S A 96, 11723-11728).

En una realización preferida, para evitar la generación de vectores vacíos, se aplica la selección positiva de la secuencia codificante recombinante en los vectores de clonación que llevan un gen suicida (véase por ejemplo Philippe Bernard, 1996, BioTechniques, Vol 21, No 2 "Positive Selection of Recombinant DNA by CcdB").

Preferentemente, la diversidad teórica calculada por todas las combinaciones posibles de restos de aminoácidos de CDR según se diseñó para generar la biblioteca de anticuerpos es de al menos 10^{11} o al menos 10^{12} secuencias únicas.

Biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la divulgación y su uso

Por consiguiente, de acuerdo con otro aspecto, la divulgación se refiere a una biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio obtenible u obtenida por el método anterior.

Como se usa en el presente documento, la expresión "biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio" abarca así bibliotecas de ácidos nucleicos que comprenden dichas secuencias codificantes de anticuerpos sintéticos de un solo dominio con gran diversidad, incluidas opcionalmente en un vector de clonación o vector de expresión. La expresión "biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio" incluye además cualquier célula u organismo hospedador transformado, con dichas bibliotecas de ácidos nucleicos, y más específicamente, bacterias, levaduras u hongos filamentosos, o células de mamíferos transformadas con dichas bibliotecas de ácidos nucleicos, o bacteriófagos o virus que contienen dichas bibliotecas de ácidos nucleicos. La expresión "biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio" incluye además la mezcla correspondiente de diversos anticuerpos codificados por dicha biblioteca de ácidos nucleicos. Como se usa en el presente documento, el término "clon" se referirá a cada individuo único de la biblioteca de anticuerpos, ya sea, ácidos nucleicos, células hospedadoras o anticuerpos de un solo dominio.

En una realización preferida de la divulgación, la biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la presente divulgación comprende al menos $3 \cdot 10^9$ clones diversos.

Esta biblioteca se puede utilizar en un método de análisis, para identificar un anticuerpo sintético de un solo dominio que se une específicamente a una diana de interés. Se puede usar cualquier método de análisis conocido para identificar aglutinantes con afinidad específica a una diana de interés con las bibliotecas de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la divulgación. Tales métodos incluyen, sin limitación, tecnologías de presentación en fagos, presentación en células bacterianas, presentación en células de levadura, presentación en células de mamíferos o presentación en ribosomas.

Preferentemente, el método de análisis es la presentación en fagos.

Preferentemente, la diana de interés es una diana terapéutica, y la biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio se utiliza para identificar el anticuerpo sintético de un solo dominio con unión específica a dicha diana terapéutica. En realizaciones específicas, la diana de interés comprende al menos un determinante antigénico. En realizaciones específicas, la diana es un sacárido o polisacárido, una proteína o glicoproteína, un lípido. En una realización específica, dicha diana de interés es de origen de células vegetales, levaduras, hongos, insectos, mamíferos u otras células eucariotas. En otra realización específica, dicha diana de interés es de origen bacteriano, protozooario o vírico.

En una realización específica, "un anticuerpo sintético de un solo dominio que se une específicamente a una diana de interés" se refiere a un anticuerpo de un solo dominio que se une a la diana de interés con una K_D de 1 mM o menos, 100 μ M o menos, 10 μ M o menos. Esto no excluye que dicho anticuerpo de un solo dominio también se una a otros antígenos.

El término " K_D ", como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar⁻¹ (M⁻¹). Los valores de K_d para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la K_d de un anticuerpo es mediante el uso de resonancia de plasmón de superficie, o mediante un sistema biosensor, tal como un sistema Biacore® o Proteon®.

Proteína de unión a antígeno de la divulgación

Teniendo en cuenta la gran diversidad de las bibliotecas de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la divulgación, el experto en la materia puede obtener un anticuerpo sintético de un solo dominio con alta afinidad y alta especificidad para una diana de interés, mediante métodos de análisis convencionales, tal como la presentación en fagos.

El anticuerpo sintético de un solo dominio resultante puede además modificarse posteriormente para generar la proteína de unión a antígeno apropiada. En particular, los restos de CDR pueden modificarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo con la diana de interés, mejorar su plegamiento o su producción, utilizando tecnologías conocidas en la técnica (mutagénesis, maduración de la afinidad).

En consecuencia, otro aspecto de la divulgación se refiere además a una proteína de unión a antígeno, que comprende un anticuerpo sintético de un solo dominio de la siguiente fórmula: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, en donde dichas regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 contienen al menos los siguientes restos de aminoácidos de los VHH de camélidos originales: F37, E44, R45, F47 y; al menos los siguientes restos de aminoácidos humanizados: P14, S49, S74, R83, A84.

En una realización, las regiones marco contienen además al menos los siguientes restos de aminoácidos: Q5, Q108 y T89. En otra realización, el anticuerpo sintético de un solo dominio comprende la combinación específica de al menos los siguientes restos de aminoácidos: Q5, A8, F11, P14, F37, K43, E44, R45, F47, S49, A50, S74, K75, V78, Y79, S82b, R83, A84, T89, Q108.

En una realización preferida, las regiones marco derivan de las regiones marco de los VHH FR1, FR2, FR3 y FR4 de las especies de Lama. En otra realización específica, el armazón del anticuerpo de un solo dominio comprende

(i) una secuencia de aminoácidos de FR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de FR2 de Llama de la línea germinal;

(ii) una secuencia de aminoácidos de FR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de FR3 (VH3) de la línea germinal; y

(iii) una secuencia de aminoácidos de FR4 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de FR4 de Llama de la línea germinal.

En una realización preferida, el anticuerpo sintético de un solo dominio comprende cualquiera de las siguientes características:

(i) regiones marco FR1 de la SEQ ID NO:1, FR2 de la SEQ ID NO:2, FR3 de la SEQ ID NO: 3 y FR4 de la SEQ ID NO:4,

(ii) regiones marco de variante funcional que no tienen más de 1, 2 o 3 sustituciones conservativas de aminoácidos y que conservan propiedades de dominio único sintético ventajosas,

(iii) variante funcional de las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 que tienen al menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1-4 respectivamente y que conservan propiedades de dominio único sintético ventajosas,

Normalmente, pueden reemplazarse uno o más restos de aminoácidos dentro de las regiones marco con otros restos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales, y la nueva variante polipeptídica puede probarse con respecto a las propiedades ventajosas retenidas usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

Tales propiedades ventajosas son una o más de las siguientes propiedades:

i. se puede expresar como un anticuerpo de un solo dominio soluble en el periplasma de *E. coli*. Generalmente, puede obtenerse preferentemente un rendimiento superior a 5 mg/l con un péptido líder pelB en cepas de *E. coli*.

ii. se puede expresar como intracuerpos solubles en el citosol de *E. coli*

Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) con un rendimiento superior a 50 mg/litro con un promotor T7.

iii. es estable en un ambiente reductor como se muestra en el ensayo de fusión de cloranfenicol acetil transferasa

Los ensayos funcionales para las propiedades anteriores se describen en los ejemplos. Las células bacterianas que expresan dicha proteína de unión a antígeno que contiene el anticuerpo sintético de un solo dominio de la divulgación en fusión con cloranfenicol acetil transferasa como una etiqueta C-terminal deben ser resistentes al cloranfenicol, en particular, a una concentración de cloranfenicol superior a 300 µg/ml en medio de cultivo.

iv. no se agrega cuando se expresa en líneas celulares de mamíferos como proteínas de fusión fluorescentes.

Preferentemente, no debe detectarse agregación cuando la proteína de unión a antígeno que contiene el anticuerpo sintético de un solo dominio se expresa como proteína de fusión fluorescente.

Preferentemente, los restos de aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 sintéticas pueden ser:

en la posición 1 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A o D;

en la posición 2 de la CDR1: Y, S, T, F, G, T, o T;

en la posición 3 de la CDR1: Y, S, S, S, F o W;

en la posición 4 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K o N;

en la posición 5 de la CDR1: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q o L;

en la posición 6 de la CDR1: S, T, Y, D, o E;

en la posición 7 de la CDR1: S, T, G, A, D, E, N, I, o V;

en la posición 1 de la CDR2: R, S, F, G, A, W, D, E, o Y;

en la posición 2 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L o Y;

en la posición 3 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;

en la posición 4 de la CDR2: G, S, T, N, o D;

en la posición 5 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K o M;

en la posición 6 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, o K;

en la posición 7 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, o V;

y la secuencia de aminoácidos de CDR3 comprende entre 9 y 18 aminoácidos seleccionados entre uno o más de los siguientes aminoácidos: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K, M.

En consecuencia, en una realización preferida, la proteína de unión a antígeno de la divulgación, consiste esencialmente en un anticuerpo sintético de un solo dominio de la fórmula general FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. En tal realización, más preferentemente, FR1 es la SEQ ID NO: 1, o una variante funcional de la SEQ ID NO: 1 con 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos; FR2 es la SEQ ID NO: 2, o una variante funcional de la SEQ ID NO: 2 con 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos; FR3 es la SEQ ID NO: 3, o una variante funcional de la SEQ ID NO: 3 con 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos; FR4 es la SEQ ID NO: 4, o una variante funcional de la SEQ ID NO: 4 con 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos; Las secuencias de aminoácidos de CDR1 y CDR2 tienen restos de aminoácidos de la siguiente manera:

en la posición 1 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A o D;

en la posición 2 de la CDR1: Y, S, T, F, G, T, o T;

en la posición 3 de la CDR1: Y, S, S, S, F o W;

en la posición 4 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K o N;

en la posición 5 de la CDR1: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q o L;

en la posición 6 de la CDR1: S, T, Y, D, o E;

5 en la posición 7 de la CDR1: S, T, G, A, D, E, N, I, o V;

en la posición 1 de la CDR2: R, S, F, G, A, W, D, E, o Y;

en la posición 2 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L o Y;

10 en la posición 3 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;

en la posición 4 de la CDR2: G, S, T, N, o D;

15 en la posición 5 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K o M;

en la posición 6 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, o K;

en la posición 7 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, o V;

20 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 comprende entre 9 y 18 aminoácidos seleccionados entre uno o más de los siguientes aminoácidos: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K, M.

25 Otro aspecto de la divulgación se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión a antígeno de la divulgación. La divulgación proporciona así un ácido nucleico aislado que codifica al menos dicha porción de anticuerpo de un solo dominio de la proteína de unión a antígeno.

30 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej. otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la divulgación puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas.

35 En una realización, el ácido nucleico es una molécula de ADN. El ácido nucleico puede estar presente en un vector tal como un vector de presentación en fagos, o en un vector de plásmido recombinante. En una realización específica, la divulgación proporciona, por lo tanto, un ácido nucleico aislado o un vector de clonación o de expresión que comprende 40 al menos una o más de las siguientes secuencias de ácidos nucleicos: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, que codifican respectivamente las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 de las SEQ ID NO: 1-4, o secuencias correspondientes variantes con al menos el 90% de identidad con dichas SEQ ID NO: 5-8, que codifican variantes funcionales de FR1, FR2, FR3 y FR4 de las SEQ ID NO: 1-4.

45 Los fragmentos de ADN que codifican las proteínas de unión a antígeno, como se describe anteriormente y en los Ejemplos, pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para incluir cualquier secuencia señal para la secreción apropiada en el sistema de expresión, cualquier etiqueta de purificación y etiqueta escindible para etapas de purificación adicionales. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN está unido operativamente a otra molécula de ADN, o a un fragmento que codifica otra proteína, como una 50 etiqueta de purificación/secreción o un enlazador flexible. El término "unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de manera funcional, por ejemplo, de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco, o de modo que la proteína se expresa bajo el control de un promotor deseado.

55 Las proteínas de unión a antígeno de la divulgación se pueden producir en un transfectoma de la célula hospedadora utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en la técnica. Para expresar y producir proteínas de unión a antígeno recombinantes de la divulgación en el transfectoma de célula hospedadora, la persona experta puede usar ventajosamente su propio conocimiento general relacionado con la expresión y producción recombinante de moléculas de anticuerpo o moléculas de 60 anticuerpo de un solo dominio.

La divulgación proporciona por lo tanto una célula hospedadora recombinante adecuada para la producción de dichas proteínas de unión al antígeno de la divulgación, que comprende los ácidos nucleicos y, opcionalmente, las señales de secreción. En un aspecto preferido, la célula hospedadora de la divulgación es una línea celular de mamífero. La 65 divulgación proporciona además un proceso para la producción de una proteína de unión a antígeno, como se describe previamente, que comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones apropiadas para la producción de la

proteína de unión a antígeno y aislar dicha proteína.

Las células hospedadoras de mamífero para secretar las proteínas de unión a antígeno de la divulgación, incluyen CHO, tales como las células dhfr-CHO, (descritas por Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220) utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159: 601-621, células de mieloma NSO, o el sistema de expresión pFuse de Invivogen, como se describe en Moutel, S., El Marjou, A., Vielemeyer, O., Nizak, C., Benaroch, P., Dubel, S., y Perez, F. (2009). A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. BMC Biotechnol 9, 14, Células COS y células SP2 o líneas celulares humanas (incluidas las líneas celulares PER-C6, Células Crucell o HEK293, Yves Durocher et al., 2002, Nucleic Acids Research vol. 30, No 2 p9). Cuando dichos ácidos nucleicos que codifican proteínas de unión a antígeno de la divulgación se introducen en células hospedadoras de mamífero, las proteínas de unión a antígeno se producen cultivando las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de los polipéptidos recombinantes en las células hospedadoras o la secreción de los polipéptidos recombinantes en el medio de cultivo en el que las células hospedadoras crecen y se repliegan adecuadamente para producir dichas proteínas de unión a antígeno.

Las proteínas de unión a antígeno pueden recuperarse a continuación del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

En una realización específica, la presente divulgación proporciona proteínas de unión a antígeno multivalentes de la divulgación, por ejemplo, en forma de un complejo, que comprende al menos dos secuencias de aminoácidos de anticuerpos sintéticos de un solo dominio idénticas o diferentes de la divulgación. En una realización, la proteína multivalente comprende al menos dos, tres o cuatro secuencias de aminoácidos de anticuerpos sintéticos de un solo dominio. Las secuencias de aminoácidos sintéticos de un solo dominio pueden unirse entre sí mediante fusión de proteínas o enlaces covalentes o no covalentes.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación, formuladas junto con uno o más vehículos o transportadores farmacéuticamente aceptables.

Las formulaciones farmacéuticas de la divulgación se pueden preparar para el almacenamiento mezclando las proteínas que tienen el grado de pureza deseado con transportadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición 2000), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización, citados anteriormente, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede llevar a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como, monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables o dispersiones estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la divulgación. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento.

A continuación, la divulgación se ilustrará mediante los siguientes ejemplos y figuras.

Descripción de las figuras

Figura 1. (A). La fusión del terminal carboxi de la cloranfenicol acetil transferasa es un indicador de plegamiento que permite la selección del VHH amino terminal soluble. Esquema del constructo expresado a partir del vector

pAO-VHH-CATHa **(B)** Crecimiento relativo de colonias de VHH seleccionado en medio de selección de cloranfenicol (Cam). **(C)** Alineamiento de secuencias de aminoácidos del armazón de lama lsdAb con el armazón sintético humanizado de la biblioteca hs2dAb. Las posiciones (numeración de IMGT) se resaltaron de acuerdo con los aminoácidos conservados del armazón del intracuerpo D10 para las propiedades de solubilidad intrínsecas de los VHH (negro) y los residuos humanizados conservados con VH3 convencional humano (Gris).

Figura 2 (A) Los fagos que presentan ambos armazones se produjeron en *E. coli* y el sobrenadante se detectó en transferencia Western con un anticuerpo anti-pIII (Biolabs). Dos bandas son visibles, una para pIII y otra para la fusión con dominios únicos. **(B)** Producción de ambos armazones en *E. coli* o en células CHO analizadas por transferencia puntual. Las diluciones en serie del sobrenadante se revelaron con un anticuerpo de etiqueta anti-His (Sigma). **(C)** Inmunofluorescencia de células HeLa con Ab recombinante de ambos armazones que marcan la estructura del anillo nuclear característico de la lámina nuclear. **(D)** Se transfectaron transitoriamente células HeLa con los plásmidos de expresión de anticuerpos anti-Lámina fusionados con GFP y se tomaron imágenes de las células vivas después de 24 h. Esto demostró que ambos armazones de anticuerpos sintéticos no permiten el reconocimiento de la diana de la lámina intracelular.

Figura 3 (A) microtúbulos teñidos de s2dAb D5 por inmunofluorescencia en células HeLa. Las células se fijaron y se tiñeron con un VHH revelado por una etiqueta anti-His (Sigma) y un anticuerpo secundario anti-Cy3 de ratón (Jackson). D5 también detecta tubulina en el experimento de transferencia Western con extractos de células HeLa revelados con anticuerpo secundario HRP (Jackson). **(B)** ELISA de fagos del clon D10 anti-Her2 en Her2 fusionado con un Fc de conejo frente a la unión en Fc de conejo a una concentración equimolar. Análisis FACS de HD10 anti-Her2 en células positivas para SKBR3 Her2 frente a células negativas para MCF10A Her2. **(C)** H12 es un anticuerpo conformacional que se une solo al estado activado de GTPasa de RhoA unido a GTP. Un H12 etiquetado con CBD se extrae del extracto celular HeLa cargado con GTP gamma S (GTP) 100 μ M o con un GDP 1 mM como entradas. El experimento de transferencia Western revela RhoA a un nivel similar en el 5% de ambas entradas, pero solo en el extracto cargado de GTP en el CBD-H12 extraído. La anti-tubulina D5 es un control negativo y el GST-RBD convencional (dominio de unión a Rho de Rhotekin) se muestra como un control positivo del Rho activo extraído.

Figura 4 Expresión intracelular de hs2dAb. **(A)** Las células HeLa se cotransfectaron con plásmidos anti-GFP de Rab6 etiquetados con GFP y hs2dAb etiquetados con mCherry. El hs2dAb-mCherry anti-GFP interactuó con su diana *in vivo* y la señal de mCherry se colocó perfectamente con la de GFP-Rab6. **(B)** Las células HeLa se cotransfectaron con Myr-palm-mCherry y un plásmido anti-mCherry hs2dAb -GFP. El anti-mCherry hs2dAb-GFP interactuó con su diana *in vivo* y se colocó perfectamente con el mCherry localizado en la membrana plasmática. **(C)** Se transfectaron células Hela (p53 +/+) y células U2OS (p53 -/-) con un anticuerpo hs2dAb-mCherry anti-p53 o con un anticuerpo hs2dAb-mCherry anti-Lámina. Mientras que el cuerpo intracuerpo de anti-Lámina marcaba ambos tipos de células, el intracuerpo de anti-p53 solo marcaba los núcleos de células positivas para p53.

Figura 5 Sensogramas para la unión de hs2dAb anti-GFP, anti-p53 y anti-Her2 en antígenos inmovilizados. Se cargaron diferentes concentraciones de hs2dAb a 25°C y se ajustaron con un modelo de interacción 1:1 de langmuir.

Ejemplos

Ensayos funcionales

Expresión soluble en periplasma de E. coli

Los fragmentos de anticuerpos de un solo dominio se subclonaron en un vector de expresión de periplasma bacteriano derivado de pHEN6 y se expresaron cadena abajo de la secuencia de secreción de pelB. Las colonias recién transformadas se hicieron crecer en medio Terrific Broth suplementado con glucosa al 1% y 30 μ g/ml de antibiótico kanamicina hasta que se alcanzó A600 = 0,6-0,8. La expresión del fragmento de anticuerpo marcado con 6 His se indujo a continuación con isopropil β -D-tiogalactopiranosido 500 μ M durante 16h a 28°C y se extendió a continuación. Tras la centrifugación, los sedimentos celulares se incubaron en tampón de choque osmótico Tris-EDTA-sacarosa y se centrifugaron nuevamente. Los lisados celulares se eliminaron y se cargaron en una columna de afinidad de resina IMAC para la etiqueta de poli histidina. La fracción eluida se dializó y la pureza de la proteína se analizó mediante SDS-PAGE.

Expresión soluble de intracuerpos en citosol de E. coli

Los fragmentos de anticuerpos de un solo dominio se subclonaron en un vector de expresión bacteriano bajo el control de un promotor T7. Los constructos de plásmidos se transformaron en células *E. coli* BL21 (DE3). Las colonias individuales se hicieron crecer en medio LB suplementado con glucosa al 1% y 30 μ g/ml de antibiótico kanamicina hasta que se alcanzó A600 = 0,6-0,8. La expresión del fragmento de anticuerpos se indujo a continuación con isopropil β -D-tiogalactopiranosido 500 μ M durante 6h a 8h a 28°C y se extendió a continuación. Tras la centrifugación, los sedimentos celulares se lisaron y se centrifugaron nuevamente. Los lisados celulares se eliminaron y se cargaron en una columna de afinidad de resina IMAC para la etiqueta de poli histidina. La fracción eluida se dializó y la pureza de la proteína se analizó mediante SDS-PAGE.

Ensayo de fusión de cloranfenicol acetil transferasa

Los fragmentos de anticuerpos de un solo dominio se subclonaron en el vector de expresión de periplasma bacteriano pAOCAT. El ensayo de resistencia al cloranfenicol se realizó utilizando células BL21 (DE3) transformadas con los constructos de fusión pAOCAT-VHH. Las bacterias se usaron para inocular 500 µl de LB que contenía kanamicina (35 µg/ml) y glucosa (0.2%), y se cultivaron a 37 ° C hasta que la OD600 fue de 0,8. La expresión citoplásmica de las proteínas de fusión VHH-CAT se indujo durante 2 horas mediante la adición de IPTG 0,2 mM. Al final del periodo de inducción, se sembraron alícuotas de bacterias de 4 µl en placas de LB-agar que contenían IPTG (0,1 mM) y se aumentaron las concentraciones de cloranfenicol en un rango de 0 a 500 µg/ml. Las bacterias se incubaron a 30°C durante 20 horas antes de la cuantificación de la formación de la colonia. El nivel de resistencia se evaluó de acuerdo con la tasa de crecimiento de la colonia a las diferentes concentraciones de cloranfenicol. Varios VHH que dieron colonias de hasta 500 µg/ml se compararon con los intracuerpos previamente caracterizados producidos contra GFP (nb GFP4) o Lámina (Lam), así como con un VHH Re3 termoestable y un C8 no intracuerpo. El cultivo líquido inducido como se explica anteriormente durante 2 horas se diluyó por dilución en serie y se aplicaron 10 µl en placas de agar que contenían 250 µg/ml de cloranfenicol (Cam) y se incubaron a 30 ° C durante 20 horas. Las colonias se cuantificaron para cada dilución y se normalizaron a la mayor cantidad encontrada siempre con el clon D10.

Ensayos de agregación en sistemas de expresión de células de mamíferos**Expresión funcional como anticuerpos intracelulares en células eucariotas**

Los fragmentos de anticuerpos de un solo dominio se subclonaron en un vector de expresión de mamífero para expresarlo como una fusión con una proteína fluorescente y bajo el control de un promotor de CMV. Las líneas celulares de mamífero se transfectaron y se observó fluorescencia en las células 24h o 48h después de la transfección. En comparación con GFP o mCherry no fusionados, la distribución de fluorescencia de VHH fusionado con una de estas proteínas fluorescentes se extendió de manera homogénea en las células transfectadas, sin mostrar agregados obvios después de 48h de expresión constitutiva.

Secreción funcional como Fcfusion

Los plásmidos se basan en la serie pFUSE-Fc2 (IL2ss)TM de Invivogen (San Diego, EE. UU.) que contiene la secuencia señal de interleucina-2 (IL2) y permite la secreción de proteínas Fc-Fusion por células de mamíferos. Debido a que los hs2dAbs se fusionaron con el dominio de bisagra de las IgG, los dominios Fc forman puentes di-sulfuro y los hs2dAb-Fc se expresan como dímeros. Se pueden seleccionar utilizando ZeocinTM (Zeo) tanto en células procariontas como en eucariotas. Estos plásmidos se modificaron por mutagénesis dirigida al sitio e inserción del adaptador (Moutel S, et al. BMC Biotechnol. 26 de Feb de 2009;9:14. doi: 10.1186/1472-6750-9-14) para permitir la fácil clonación en casete de un paso de anticuerpos recombinantes extraídos de una gran colección de plásmidos de expresión y selección de anticuerpos recombinantes comunes (por ejemplo, pHEN, pSEX, pHAL, pCANTAB, pHOG, pOPE, pSTE). Se construyeron cuatro plásmidos que permiten la fusión de s2dAb en su extremo C con cualquiera de los dominios Fc de IgG2 humana (andlgG1) (h), IgG2a (m) de ratón o IgG (r) de conejo (las regiones Fc comprenden los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG y la región bisagra).

Cuatro días después de la transfección transitoria de células CHO o HEK con estos plásmidos de expresión, los anticuerpos secretados podrían estar disponibles utilizando anticuerpos anti-IgG dirigidos contra las especies Fc respectivas. Esto permite una gran diversidad de multiplexación.

Expresión funcional en sistema de dos híbridos en levadura

La secuencia codificante del antígeno se clonó en dos plásmidos de cebo híbridos de levadura lexA (Vojtek y Hollenberg (1995). Methods Enzymol. 255:331-42). o gal4 (Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P. (1997). Nat. Genet. 16: 277-282). La población SDAB del dominio de unión al ADN a analizar se transfirió a dos plásmidos de presa híbridos de levadura pGADGH (Bartel, P.L., et al (1993) in Cellular interactions in development: A practical approach. ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp. 153-179.) por PCR y reparación de huecos (Orr-Weaver, T. L. and Szostak, J. W. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4417-4421): Se preparó la preparación de ADN del conjunto de plásmidos pHEN2-3myc (de 1 clon único a 3.10⁹). La ADN miniprep se amplificó por PCR con el oligonucleótido 5p 8328 CCCACCAAACCCAAAAAGAGATCCTAGAACTAGCTATGGCCGGACGGGCCAT GGCGGAAGTGCAGCTGCAGGCTTC (SEQ ID NO: 11) y el oligonucleótido 3p 8329 ACCGGGCCTCTAGACACTAGCTACTCGAGGGGCCCCAGTGGCCCTATCTATGCGG CCGCGCTACTCACAGTTAC (SEQ ID NO: 12) usando polimerasa Pfu (NEB) usando 10 ng de ADN como matriz. El número de tubos depende de la necesidad en cantidad de ADN y está relacionado con el número de transformantes necesarios. Normalmente, para obtener 1 millón de transformantes de levadura, se llevan a cabo 8 PCR de 50 µl.

Programa de PCR

45 segundos	94°C	}	x 25 ciclos
45 segundos	94°C		

45 segundos 57 °C

3 minutos 72 °C

10 minutos 72 °C

∞ 4 °C

Las PCR se verifican en un gel de agarosa y se concentran 20 veces utilizando precipitación con acetato de amonio y se resuspenden en agua.

5 Se transforman 8 µg de plásmido presa pGADGH digerido por NcoI y XhoI y 2 µl de PCR concentrada en levadura por transformación clásica LiAc/PEG. Los clones se propagan hasta la eliminación selectiva de medios menos triptófano, leucina e histidina. Los clones específicos de los cebos, identificados de esta manera, son intracuerpos de la biblioteca que son funcionales en las células de levadura.

10 **Generación de biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio y caracterización de aglutinantes obtenidos de dicha biblioteca**

15 Seleccionamos una familia de armazones altamente funcionales, optimizados para la expresión intracelular y con alta termoestabilidad. Esta selección se realizó utilizando proteínas de fusión entre un gen de resistencia a los antibióticos y una colección de VHH.

20 Solo las bacterias que expresan una fusión funcional de VHH (no agregada, no degradada) podrían crecer. Se evaluaron adicionalmente el rendimiento de la expresión, la solubilidad como la fusión de GFP en el citoplasma de las células de mamíferos [y se compararon con los cromocuerpos seleccionados] para seleccionar un conjunto de anticuerpos adecuados. Se alinearon las secuencias de estos anticuerpos y se definió una secuencia consenso por la secuencia marco de consenso sdAb del clon D10 (véase la SEQ ID NO: 9). Además de esta sdAb (lsdAb) de llama, se alteró la secuencia para que fuera más similar a VH humano, por lo que se definió un consenso evolucionado como un sdAb sintético (en adelante denominado "hs2dAb", véase la SEQ ID NO:10). Se mantuvieron los distintivos

25 específicos de VHH en cuatro posiciones FR2 (37, 44, 45, 47) que se conservan en el VH convencional para formar la interfaz hidrofóbica con VL y que parecían ser cruciales para las propiedades de solubilidad intrínseca de sdAb (Kastelic D, et al. 2009 J Immunol Methods. Oct 31; 350(1-2):54-62) (Figura 1a). A continuación, se confirmó que el armazón era resistente y se comportaba como se esperaba al injertar las CDR de un anticuerpo conocido en los marcos de lsdAb y s2dAb. Estos experimentos demostraron que tanto lsdAb como hs2dAb permitían una presentación

30 eficaz, una producción eficaz en bacterias y células CHO, y que permitían mantener la reactividad adecuada de las CDR injertadas cuando se expresaban tanto en condiciones oxidativas como reductoras. Así que se decidió seleccionar el hs2dAb como armazón para construir nuestra biblioteca.

35 A continuación se introdujo una diversidad sintética en las tres CDR sin afectar la funcionalidad de los clones. Basándose en la alineación de cientos de secuencias sdAb de llama, se diseñó racionalmente para cada posición de la CDR1 y la CDR2 un conjunto de aminoácidos que todavía imitan la diversidad natural. Se evitaron voluntariamente los residuos de cisteína porque los grupos tiol podrían interferir más adelante con la expresión y funcionalidad intracelular adecuadas. Se pensó que reducir la frecuencia de los restos hidrófobos o la arginina evitaría la agregación (De Marco A. 2011, Microb Cell Fact. Jun 9;10:44 Revisión) y que reducir también la frecuencia de prolina mantendría

40 la mayor flexibilidad en los bucles. Como la serina, la treonina y la tirosina son los restos más frecuentes en los bucles de CDR implicados en los enlaces con el epítipo, se han propuesto el aspartato y el glutamato para aumentar la

solubilidad (Lodish H, et al. Molecular Cell Biology. 4ª edición. Nueva York: W. H. Freeman, 2000). Voluntariamente se enriquecieron estos cinco restos en algunas posiciones. En contraste, se aleatorizaron completamente algunas posiciones de CDR2, así como cada posición de CDR3, introduciendo todos los aminoácidos excepto cisteína. Sin embargo, también se introdujo una diversidad de longitud en las secuencias de CDR3 para enriquecer el potencial de unión a diferentes formas de epítomos, ya que se ha demostrado que los nanocuerpos se unen tanto a la superficie plana como a la cavidad (De Genst, E., et al. Proc Natl Acad Sci, (2006) Mar 21;103(12):4586-91), o incluso a los haptenos (Harmsen MM, et al 2007, Appl Microbiol Biotechnol., Nov;77(1):13-22. Revisión). Con el fin de respetar estas estadísticas, para reducir la aparición de restos demasiado hidrófobos o aminoácidos que promuevan la agregación, y en contraste para enriquecer en aminoácidos polares, y para evitar adicionalmente la aparición de detenciones en el marco de lectura, o la aparición de cisteínas o reducir el desplazamiento del marco de lectura, la síntesis de la diversidad de bibliotecas se logró mediante una tecnología de síntesis de genes única que utiliza bloques de tripletes de ADN de doble cadena correspondientes a cada codón (Van den Brulle J, et al. 2008. Biotechniques. Sep;45(3):340-3). Todos los codones se optimizaron para la expresión en células de mamíferos, se agregó un sitio de restricción SnaI en FR3 para un injerto o ingeniería de bucle CDR3 adicional, mientras que se evitó cualquier otro sitio de restricción no deseado en el almacén.

Para generar una gran complejidad y reducir el número de plásmidos vacíos, se construyó un nuevo vector de clonación que contiene un gen suicida (ccdB) entre sitios de clonación no compatibles. Solo los plásmidos en los que el gen tóxico se perdió permitieron el crecimiento de bacterias, por lo tanto, solo se obtuvo el plásmido que contenía un inserto SDAB. Se utiliza el gen CcdB como un marcador de selección positiva. La mayor parte de las pruebas realizadas para detectar actividades de unión, se realizan utilizando un anticuerpo monovalente seleccionado, los medios de detección se basan en inmunotinción anti-etiqueta. Pero las etiquetas monovalentes en los anticuerpos monovalentes no permiten una detección fuerte, por lo que se decidió agregar una etiqueta triple al nuevo fagémido que se contruyó para aumentar el poder de detección.

Para garantizar la diversidad completa de los hs2dAbs clonados, el número de diversidad teórica según el diseño racional fue muy superior al de las moléculas sintetizadas, que fue nuevamente 4 log por encima del número de colonias transformadas. Lo más crucial fue la gran diversidad molecular de hs2dAb sintetizados que alcanzó más de 10^{12} secuencias con una probabilidad total de ser únicas, ya que aún estaba por encima de la diversidad teórica impuesta por el diseño. La biblioteca completa de hs2dAb-L1 sintéticos se clonó en el vector pHEN2-3myc y se transformaron hasta $3 \cdot 10^9$ colonias.

La calidad y la funcionalidad de la biblioteca de hs2dAb-L1 se evaluó primero mediante la secuenciación de 10^5 clones aleatorios. A continuación se realizó un cribado dirigido a varios tipos de Ag con varios procedimientos de selección. Para las diferentes dianas probadas, obtuvimos aglutinantes con buenas afinidades para EGFP, β -Tubulina, actina, Rho conformacional, p53 y Her2. Se describe la caracterización de la especificidad, la afinidad y la productividad de los aglutinantes hs2dAb seleccionados.

Materiales y procedimientos

Plásmidos y clonación

Se insertó un gen sintético (Mister Gene) compuesto por una etiqueta 6His y una etiqueta triple c-myc en el vector fagémido pHEN2 (biblioteca Griffin 1.) entre los sitios NotI y BamHI. El gen ccdB del vector pENTR™4 (Invitrogen) se insertó en el vector pHEN2 entre los sitios NcoI y NotI. Para vectores de expresión de mamíferos, se digirieron VHH o hs2dAbs con NcoI y NotI y se ligaron en los vectores pAOINT o pmCherry (Clontech).

Filtro de ensayo de Cat

El pAO-CAT es un vector de expresión citoplasmático que permite fusionar una cloranfenicol acetil transferasa (CAT) etiquetada con Ha carboxiterminal a las secuencias de VHH.

Se ha construido clonando una secuencia VHH-CAT en el vector pAOD-Tub1-mGFP (Olichon A, et al. 2007). J Biol Chem. Dec 14;282(50):36314-20) digerido con XbaI y KpnI para eliminar el DsbC-Tub1-mGFP. La secuencia VHH-CAT se ha obtenido mediante una estrategia de PCR de varias etapas. El VHH se amplificó utilizando 5'CCTTGATTCTAGAAATAATTTTGTCTTAAGGAGATATACCATGCTG ATGTCCAGCTGCAGGCGT3' (Dir, SEQ ID NO: 13)

y 5'CCACCGCTACCGCGCTGCGG CCGCGTGAGGAGACGGTGACCTGG G3' (Inv, SEQ ID NO:14). Se amplificaron dos secuencias de CAT independientemente utilizando el plásmido pRill como molde para eliminar un sitio NcoI interno. Para el N-terminal, se utilizaron los siguientes cebadores: 5' GCGGCCGCGAGCGCGGTAGCGGTGGCGAGAAAAAATCACTGGATATACC 3' (Dir, SEQ ID NO:15) y 5' GCCCATCGTGAAAACGGGGGCG 3' (Inv SEQ ID NO:16). El C-terminal se amplificó utilizando: 5' CGCCCCGTTTTACGATGGGC 3' (Dir, SEQ ID NO:17) y 5'AGAATAGGTACCAGCGTAATCTGGGACATCATAAGGGTAGCCACCGCCCCGC CCTGCACTCATCG 3' (Inv SEQ ID NO:18). Las tres secuencias se ensamblaron con una PCR final y el producto se digirió con XbaI y KpnI antes de ligarse en el vector. Los VHH seleccionados previamente de una biblioteca sin tratamiento previo se subclonaron

en pAOCAT utilizando los sitios de restricción NcoI y NotI. El ensayo de resistencia al cloranfenicol se realizó utilizando células BL21 (DE3) transformadas con los constructos de fusión pAOCAT-VHH. Las bacterias se usaron para inocular 500 µl de LB que contenía kanamicina (35 µg/ml) y glucosa (0.2%), y se cultivaron a 37°C hasta que la OD₆₀₀ fue de 0,8. La expresión citoplásmica de las proteínas de fusión VHH-CAT se indujo durante 2 horas mediante la adición de IPTG 0,2 mM. Al final del periodo de inducción, se sembraron alícuotas de bacterias de 4 µl en placas de LB-agar que contenían IPTG (0,1 mM) y se aumentaron las concentraciones de cloranfenicol en un rango de 0 a 500 µg/ml. Las bacterias se incubaron a 30°C durante 20 horas antes de la cuantificación de la formación de la colonia. El nivel de resistencia se evaluó de acuerdo con la tasa de crecimiento de la colonia a las diferentes concentraciones de cloranfenicol. Varios VHH que dieron colonias de hasta 500 µg/ml se compararon con los intracuerpos previamente caracterizados producidos contra GFP (nb GFP4) o Lámina (Lam), así como con un VHH Re3 termoestable y un C8 no intracuerpo. El cultivo líquido inducido como se explica anteriormente durante 2 horas se diluyó por dilución en serie y se aplicaron a 10 µl en placas de agar que contenían 250 µg/ml de cloranfenicol (Cam) y se incubaron a 30°C durante 20 horas. Las colonias se cuantificaron para cada dilución y se normalizaron a la mayor cantidad encontrada siempre con el clon D10.

El clon D10 se subclonó adicionalmente en el vector de expresión pHEN6, dando lugar a una expresión periplasmática superior a 5 mg/l de cultivo en la cepa Xllblue de *E. coli*.

Se subclonó en el pAint-GFP y se transfectó en células MRC5, HEK293 o HeLa S3. La expresión transitoria de D10-GFP bajo el control de un promotor de CMV conduce a una alta fluorescencia de GFP y no se detecta agregación en comparación con Lam1-GFP o Re3-GFP a las 24h y 48h.

Construcción de la biblioteca

Las colecciones de genes correspondientes al diseño de FR y CDR se han sintetizado in vitro (Sloning, GeneArt). Se amplificaron por PCR 1 µl (10 ng) de las diversas síntesis (que corresponde a $1 \cdot 10^{10}$ moléculas, por lo tanto, 10 veces la diversidad de bibliotecas diana) en un volumen total de 50 µl usando 1 µl de ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs) con una mezcla equimolar de los siguientes cebadores:

5'-AACATGCCATCACTCAGATTCTCG-3' (SEQ ID NO: 19)

5'-GTTAGTCCATATTCAGTATTATCG-3' (SEQ ID NO:20)

El protocolo de PCR consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 98°C durante 45 segundos, seguido de 20 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 55 ° C durante 30 segundos y 72 ° C durante 30 segundos, y una extensión de la etapa final a 72 ° C durante 10 minutos. Se purificaron 7X150 µl de PCR en 7 columnas de un kit de limpieza de PCR (Macherey-Nagel). Se digirieron 55 µg del fragmento purificado resultante de PCR y 80 µg del fagémido pHEN2-ccdB-3myc durante 2H a 37 ° C con NcoI y NotI (NEB) en un volumen total de 500 µl. Se añadió una etapa de desfosforilación para el fagémido con una fosfatasa alcalina intestinal de ternera (Sigma) 30 min a 37 ° C. Las digestiones se purificaron en gel con 4 y 6 columnas respectivamente de un kit de extracción de gel (Macherey-Nagel) en un volumen final de 80 y 120 µl. A continuación, el fragmento de PCR purificado se ligó en pHEN2-ccdB-3myc, entre la señal líder de PelB y el gen pIII. Se ligaron 50 µg de fagémido y 19,2 µg de inserto durante la noche a 16 °C con 10 µl de ADN ligasa T4 (NEB) de alta concentración en un volumen total de 400 µl. El ligado se purificó en 6 columnas (Macherey-Nagel) con un volumen total de 150 µl. El material de ADN ligado se utilizó para transformar células TG1 de *E. coli* electrocompetentes (Lucigen). Se realizaron 20 electroporaciones con 1 µl de ligado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (1800 V; 10 µF; 600 Ω). Cada electroporación se resuspendió con 1 ml de 2XYT caliente, medio de glucosa al 1% y se incubó con agitación por vibración durante 1 h a 37°C. Se agregaron 380 ml de 2XYT, glucosa al 1% a la suspensión y se sembraron en 430 placas de agar 2xYT-ampicilina (140 mm) durante la noche a 37°C. El tamaño de la biblioteca se calculó sembrando en placa las alícuotas de dilución en serie. Las colonias se rasparon de las placas con 2xTY líquido y la biblioteca se almacenó en presencia de glicerol al 30% a -80 ° C con alícuotas de 1 ml a OD = 38,4. Se obtuvieron $3 \cdot 10^9$ clones recombinantes individuales.

Secuenciación de la biblioteca:

La heterogeneidad de los clones individuales de las bibliotecas se verificó mediante la secuenciación de $6 \cdot 10^5$ insertos en chips ion Torrent (Invitrogen).

La biblioteca de secuenciación IonTorrent se preparó con el kit de biblioteca de fragmentos Ion Plus para el sistema AB Library Builder (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante y se controló en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) con el kit de ADN de alta sensibilidad (Agilent Technologies). La plantilla de secuenciación se preparó mediante PCR en emulsión con el sistema Ion OneTouch 2 y el kit Ion PGM Template OT2 400 (Life Technologies). La secuenciación se realizó en una máquina de genoma personal IonTorrent utilizando el kit 400 de secuenciación Ion PGM y un chip Ion 314v2 (Life Technologies).

Antígenos

La β Actina humana se adquirió de Sigma. La GTPasa de RhoA fusionada a un dominio de unión a quitina amino terminal o a un péptido de unión a estreptactina se produjeron en células HEK293. Se produjo GFP en fusión con un péptido de unión a la estreptavidina (SBP) a través del sistema de traducción *in vitro* (Roche) y se usó directamente para el análisis sin necesidad de purificación (Moutel S, et al. 2009. Biotechnol J. Jan;4(1):38-43). La tubulina biotinilada se adquirió de Cytoskeleton. Para p53, los 72 primeros aminoácidos de la isoforma NP_000537.3 se produjeron en bacterias con una etiqueta SNAP y se biotinilaron *in vitro*. Para Her2, el receptor natural se usó como diana de proteína de membrana en células SKBR3.

Selecciones de presentación de fagos

El análisis de β actina, histona H1 o FITC se realizó mediante selección en inmunotubos como se describe en Marks JD et al., 1991 J Mol Biol. Dec 5;222(3):581-97. El análisis de GFP, tubulina y p53 se realizó en condiciones naturales como se describe en Nizak et al. 2003 Science. May 9;300(5621):984-7. La El análisis en Rho se realizó en condiciones naturales en una etiqueta mutante constitutivamente activa de RhoA expresada en células HEK293. EL análisis de Her2 se realizó en células de superficie como se describe en Even-Desrumeaux K, Chames P. 2012 Methods Mol Biol.; 907:225-35.

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Los clones individuales se seleccionaron como se describe en otro lugar por ELISA de fagos monoclonales (Lee et al.; 2007, Nat Protoc. 2(11): 3001-8.

Transferencia Western

Después de hervir en el tampón de carga SDS-PAGE, las muestras se separaron en una SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman GmbH). Las membranas se bloquearon en PBS con un 3% de leche desgrasada con Tween 20 al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 ° C. SDAB se usó a 1/100 y se añadió a las membranas con un anticuerpo con etiqueta anti-his a 1/3000 (Sigma) durante 90 min. Luego se lavaron las transferencias y se incubaron 1 h con anticuerpos secundarios marcados con HRP anti-ratón (diluidos a 1/10000 en PBS al 0,1% de Tween 20) (Jakson ImmunoResearch Laboratories). Después de 5 lavados con PBS al 0,1% Tween 20, los anticuerpos secundarios se revelaron utilizando el reactivo quimioluminiscente SuperSignal (Pierce) y el ECL de Hyperfilm (GE HealthCare).

Immunofluorescencia

Las pruebas de inmunofluorescencia se realizaron en células HeLa como se describió anteriormente (Nizak et al. 2003. Science. May 9;300(5621):984-7).

Transfección transitoria

Las células Hela cultivadas en cubreobjetos se transfectaron de acuerdo con el procedimiento de CaPO₄ con 1 μ g de ADN por pocillo (placa de 24 pocillos) o 10 μ g de ADN (placa de 10 cm² de diámetro). Las células pueden observarse a partir de las 12 h posteriores a la transfección.

Citometría de flujo

La tinción de la superficie celular se realizó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con SFV al 1%. Se incubaron 100 μ l de sobrenadante (80 μ l de fagos + 20 μ l de PBS/leche 1%) en 1.10⁵ células durante 1 h en hielo. La unión del fago se detectó mediante una dilución 1:300 de anti-M13 Ab (GE healthcare) durante 1 h en hielo, seguido de una dilución 1:1000 de anti-ratón Ab conjugado con PE (BD Pharmingen.) durante 45 min. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un FACSCalibur utilizando el software CellQuest Pro (BD Biosciences, San José, CA).

Medición de afinidad

La afinidad de unión de los anticuerpos hs2dAb seleccionados de la biblioteca y específicos para GFP y ErBB2 se realizaron a 25°C utilizando un ProteOn XPR36 (BioRad) y un Biacore T200 (GE Healthcare), respectivamente, y se ajustaron con un modelo de interacción de Langmuir 1:1. El ligando GFP (24 kDa) se diluyó a 1,6 μ M en tampón de acetato de sodio (pH 5,0) y se inmovilizó mediante acoplamiento de amina en un chip GLC (BioRad) a 730 UR. Se utilizaron 100 μ l de anticuerpos de un solo dominio monovalentes (14 kDa) como analito y se inyectaron a 100 μ l/min en concentraciones entre 1000 y 3 μ M (60 segundos de inyección, 600 segundos de disociación). El conjunto cinético completo se recopiló en un solo proceso (una sola etapa) y, por lo tanto, no hubo necesidad de regeneración de la superficie. El ectodominio Fc de ErBB2 (96 kDa) se diluyó a 400 μ g/ml en tampón de acetato de sodio (pH 5,0) y se inmovilizó mediante acoplamiento de amina en un chip CM5 (GE Healthcare) a 991 RU. Los anticuerpos de un solo

dominio monovalentes (14 kDa) se diluyeron en tampón HBS-EP+ y se inyectaron como analitos a 30 µl/min en concentraciones entre 300 y 3 µM utilizando la modalidad de ciclo único (inyección de 120 segundos, disociación intermedia de 120 segundos, disociación final de 600 segundos). Las cinéticas se recogieron en una secuencia única de inyecciones y la regeneración de la superficie (glicina HCl 10 mM, pH 2,5, durante 30 s a 30 µl/min) se realizó solo entre dos series sucesivas.

Resultados

Diseño de biblioteca

En vista de hacer una gran biblioteca de anticuerpos de un solo dominio enriquecida en fragmentos de anticuerpos altamente estables y funcionales, nuestro objetivo fue identificar un armazón de VHH único. Anteriormente se seleccionaron varios cientos de clones de bibliotecas inmunitarias o sin tratamiento previo de VHH de llama (Monegal A, et al. 2012 Dev Comp Immunol. Jan;36(1):150-6). Se examinó un conjunto de clones altamente expresados utilizando un ensayo de filtro de cloranfenicol que discrimina los clones altamente estables de los propensos a la agregación o despliegue en el citoplasma de bacterias (Olichon). Se usó el vector de expresión citoplasmático pAO-CAT que permite fusionar una cloranfenicol acetil transferasa (CAT) con etiquetada Ha carboxiterminal a las secuencias de VHH. En comparación con el VHH termoestable publicado (Olichon A, et al BMC Biotechnol. 26 de enero de 2007;7:7) o intracuerpos (Rothbauer U, et al Nat Methods. Nov de 2006;3(11):887-9), un armazón, el clon D10, mostraba una mayor resistencia al cloranfenicol (Figura 1a). El VHH D10 se ajustó aún más a todos nuestros criterios de solubilidad, termoestabilidad y ausencia de agregación, mientras que se expresó como un intracuerpo en células de mamíferos, en ausencia de cualquier reconocimiento de antígeno conocido. A continuación, se evaluó si la humanización parcial (Vincke C, et al. J Biol Chem. 30 de enero de 2009; 284 (5): 3273-84) del armazón afectaría a sus propiedades intrínsecas al identificar siete residuos que se encuentran en el VH3 humano. Los cuatro distintivos de los aminoácidos específicos de VHH en la región marco-2 (posiciones 42, 49, 50 y 52) que parecían ser cruciales para las propiedades de solubilidad intrínseca (Figura 1c) se mantuvieron intactos.

Para probar si este armazón puede ser adecuado para la unión al antígeno y puede usarse como un armazón general para la construcción de la biblioteca, se injertaron bucles de la proteína VHH lam1 específica de la proteína laminB (Rothbauer U, et al. Nat Methods. Noviembre de 2006;3(11):887-9). La Figura 2a muestra que ambos armazones (IsdAbB y hs2dAb) no perturban la presentación del anticuerpo recombinante en fagos, aquí etiquetados con un anticuerpo anti-pIII. El rendimiento de producción a partir de sobrenadantes de cultivo de *E. coli* o de células CHO de mamíferos (Moutel S, et al BMC Biotechnol. 26 de Feb de 2009;9:14. doi: 10.1186/1472-6750-9-14) también fue alto y comparable para ambos armazones, (véase la Figura 2b). Los anticuerpos sintéticos injertados se usaron a continuación para teñir células HeLa por inmunofluorescencia indirecta. Ambos anticuerpos de un solo dominio injertados produjeron la tinción esperada, lo que indica que tiñeron de manera eficiente la Lamin B endógena (Figura 2c). Los dos anticuerpos sintéticos se fusionaron con EGFP y se utilizaron como intracuerpos. Después de la transfección transitoria de células HeLa, ambos anticuerpos fluorescentes fueron solubles y marcaron su diana intracelular (Figura 2d), como se observó cuando se usó el anticuerpo VHH lam1 original (Rothbauer U, et al 2006). Ambos armazones, D10 de Lama y Humanizado, injertados con bucles de CDR lam1 retuvieron la propiedad de unión del VHH parental. <

En conjunto, estos experimentos indicaron que el armazón sintético de D10 humanizado (denominado en el presente documento anticuerpo sintético de un solo dominio o hs2dAb) es un marco eficaz y resistente para presentar los bucles de CDR.

Construcción de la biblioteca

Se introdujo una diversidad sintética en las tres CDR al diseñar racionalmente un conjunto de aminoácidos que todavía imitan la diversidad natural para cada posición de la CDR1 y la CDR2 (basado en el análisis estadístico de las CDR encontradas en los aglutinantes de VHH publicados). Los restos de aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 sintéticas se determinan mediante las siguientes reglas:

en la posición 1 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A o D;
 en la posición 2 de la CDR1: Y, S, T, F, G, T, o T;
 en la posición 3 de la CDR1: Y, S, S, S F o W;
 en la posición 4 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K o N;
 en la posición 5 de la CDR1: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q o L;
 en la posición 6 de la CDR1: S, T, Y, D, o E;
 en la posición 7 de la CDR1: S, T, G, A, D, E, N, I, o V;
 en la posición 1 de la CDR2: R, S, F, G, A, W, D, E, o Y;
 en la posición 2 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L o Y;
 en la posición 3 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;
 en la posición 4 de la CDR2: G, S, T, N, o D;
 en la posición 5 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K o M;
 en la posición 6 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, o K;

en la posición 7 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, o V;

La secuencia de aminoácidos de CDR3 comprende 9, 12, 15 o/y 18 aminoácidos seleccionados entre uno o más de los siguientes aminoácidos: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K, M.

El ADN sintético se amplificó utilizando un número bajo de ciclos de PCR para evitar la adición de mutaciones basadas en PCR. Se comenzó la construcción con $2 \cdot 10^{11}$ moléculas diferentes. Se clonó la biblioteca sintética en el vector fagémido pHEN2 modificado agregando 2 etiquetas myc complementarias con un gen sintético (Proteogenix) entre el Ab recombinante y el gen pIII. Estas etiquetas myc adicionales permiten una mejor manifestación del Ab monovalente (datos no mostrados). Para la clonación, también se agregó un gen suicida (ccdB) entre NcoI y NotI que permite una selección positiva de clones que han insertado la biblioteca. Se usó una gran cantidad de fagémido e inserto para obtener una gran cantidad de material para electroporar células de *E. coli* TG1. Se realizaron 20 electroporaciones para producir la biblioteca de hs2dAb-L1. Las bacterias transformadas se sembraron en 430 placas de agar grandes (140 mm). El tamaño de la biblioteca se calculó sembrando alícuotas de dilución en serie y se estimó que era de $3 \cdot 10^9$ clones individuales.

Secuenciación de la biblioteca:

Primero se evaluó la diversidad funcional mediante la secuenciación de 315 clones aleatorios con la secuenciación de Sanger. Se encontraron 9 secuencias con el codón de parada o con la ausencia de una base, una secuencia perdió toda la CDR1, otra perdió la CDR1, la FR1 y la CDR2, y las dos últimas secuencias se encontraron vacías. Por lo tanto, solo se obtuvo un número muy bajo (4,1%) de clones defectuosos. Lo que sugiere que la gran mayoría de los $3 \cdot 10^9$ clones expresarán un hs2dAb recombinante.

La heterogeneidad de los clones individuales de las bibliotecas se verificó adicionalmente mediante la secuenciación de $5,6 \cdot 10^5$ insertos en chips Ion Torrent (Invitrogen). La distribución de las secuencias de longitud para los 4 tamaños de CDR3 fue homogénea. La diversidad y la frecuencia de los aminoácidos de posición coincidieron con nuestro diseño para todas las CDR (datos no mostrados). Se encontraron 3 clones redundantes, pero esta observación puede estar vinculada a la amplificación por PCR realizada durante el procedimiento de secuenciación de próxima generación.

Análisis de la biblioteca

La biblioteca de hs2dAb-L1 se examinó mediante presentación en fagos utilizando métodos convencionales (Hoogenboom HR, et al. Jun de 1998; 4 (1): 1 -20) frente a un conjunto de diferentes antígenos indicados en la Tabla 1. Para validar el uso de hs2dAb-L1 en varios métodos de análisis, se realizó la selección en cuentas (que ofrece una gran capacidad de presentación de antígenos y mantiene la conformación del antígeno más cerca de la proteína natural), o bien la selección en inmunotubos (referenciado como método convencional) o en el antígeno natural presentado de manera natural en la superficie de las células de mamíferos (como se hace a menudo cuando se aplica la selección *in vitro* a preguntas terapéuticas).

Se realizó una primera detección en condiciones naturales (Nizak, 2005, véase más arriba) utilizando tubulina biotinilada (citoesqueleto) como diana. Después de dos rondas de selección, se analizaron 40 clones al azar mediante inmunofluorescencia en células HeLa fijadas con metanol. 3 recombinantes Ab tiñeron la tubulina endógena (Figura 3A). Estos 3 clones también fueron utilizables en transferencia Western de muestras de proteínas humanas (Figura 3A). Se realizó un segundo análisis contra el receptor de Her2 endógeno expresado en la superficie de las células SKBR3. Se realizó una pre-adsorción de los fagos en cada una de las 3 rondas en células MC10A negativas a Her2 para contrarrestar la selección de anticuerpos no específicos para SKBR3. Usando un ensayo FACS, se encontraron 17 aglutinantes anti-SKBR3 específicos de los 84 analizados que podrían agruparse en 17 secuencias no redundantes. El análisis mediante ELISA, utilizando el ectodominio-Fc de Her2 (96 kDa) como diana, mostró que 12 de ellos estaban dirigidos contra HER2 (Figura 3B). La inmunofluorescencia confirmó que los anticuerpos decoraban la membrana plasmática de SKBR3 (datos no mostrados). Se realizó un tercer análisis dirigido contra la proteína p53 supresora de tumores. Los 72 primeros aminoácidos de la isoforma NP_000537.3 se produjeron en bacterias fusionadas a una etiqueta SNAP, se biotinilaron *in vitro* y se usaron como diana en cuentas. Después de 3 rondas de selección, se encontraron 12 clones de 80 positivos en ELISA de fagos (datos no mostrados), 6 p53 endógenas claramente marcadas en inmunofluorescencia en células A431 (datos no mostrados) mientras que 2 se pudieron usar como intracuerpos en células HeLa (ver Figura 4). Como cabía esperar, no se observó tinción en células U2OS que son p53 - -. Se realizó un cuarto análisis para obtener el aglutinante conformacional de la proteína Rho-GTP. Después de cuatro rondas de selección competitiva (véase materiales y métodos), se analizaron 80 clones únicos en ELISA utilizando proteínas GST-RhoA recombinantes cargadas con GDP del análogo no hidrolizable GTPγS. 24 anticuerpos dieron una señal más fuerte contra GTPγS-RhoA que contra GDP-Rho, lo que indica una unión conformacional. Uno de los anticuerpos, el clon H12, dominó el análisis y fue el único clon obtenido en una quinta ronda adicional de selección. Se probaron estos aglutinantes conformacionales en inmunofluorescencia en células HeLa que expresan la fusión SF-GFP (superfolder GFP) del mutante N19 negativo de RhoA (unido a GDP) o el mutante constitutivamente activo L63 (unido a GTP). Ninguno de los clones tiñó células que expresan el mutante N19 negativo, mientras que 8 de ellos tiñeron eficazmente células que sobreexpresan la forma activa de RhoA. Además, se caracterizó el clon H12 y se probó su capacidad para extraer RhoA endógeno de extractos de células HeLa incubadas con GTPγS o GDP. Se

demostró que el anticuerpo H12 purificado era un biosensor conformacional eficaz de la actividad de Rho que se puede utilizar en los experimentos ELISA, de inmunofluorescencia y de extracción *in vitro*. Además, se observó que fue más eficaz que el ensayo de actividad RBD convencional en el que el dominio de unión a Rho de una proteína efectora se utiliza como biosensor. (Figura 3C, IF y datos ELISA no mostrados). Se realizó un quinto análisis en condiciones naturales utilizando la proteína GFP como diana. Treinta y siete clones no redundantes de los 80 analizados fueron positivos en ELISA de fagos (datos no mostrados). Diez de ellos detectaron GFP-myr-palm, por inmunofluorescencia (datos no mostrados). De manera importante, se observó que 4 de estos anticuerpos eran utilizables como intracuerpos contra GFP recombinante expresado en células Hela (Figura 4). Se realizó un último análisis utilizando inmunotubos recubiertos con bActina comercial natural (Sigma). Este último análisis permitió la selección de 16/80 aglutinantes únicos según lo observado por ELISA de fagos (datos no mostrados), siete de ellos decoraron claramente las fibras de estrés de actina endógenas en células HeLa (datos no mostrados) y 4 fueron utilizables para experimentos de transferencia Western (datos no mostrados).

Clones Positivos				
Antígeno	ELISA de fagos	IF/FACS	Intracuerpo	Rondas de selección
GFP	37	10/	4/10	2
mCherry	ND	6/	2/6	3
Tubulina	ND	3/	0/3	2
Actina	11	9/	1/7	3
p53	12	6/	2/6	2
RhoA-GTP	24	8/	3/8	4
Her2	15	5/10	ND	3

Tabla 1: Sumario del análisis

Medición de afinidad

La afinidad de los anticuerpos de un solo dominio contra GFP, Her2 y p53 se midió utilizando un ProteOn XPR36 (BioRad) o un Biacore T200 (GE Healthcare). Se estimó que las afinidades estaban en el rango nanomolar: $3.06 \cdot 10^{-8}$ M para anti-GFP, $1.94 \cdot 10^{-8}$ M para anti-Her2 y $3.25 \cdot 10^{-8}$ M para anti-p53, lo que demuestra que se podrían obtener aglutinantes de alta afinidad de nuestra biblioteca hs2dAb-L1 de un solo dominio Ab, sintético, no inmunitario (Figura 5).

Intracuerpos inhibidores

La identificación de anticuerpos bloqueadores es una tarea desafiante. Sin embargo, es posible funcionalizar intracuerpos no bloqueadores para inhibir su función de diana. Un enfoque se basa en la ubiquitinilación y degradación de la diana reconocida según lo descrito por Caussinus et al. 2011 (Caussinus et al. 2011, Nat. Struct. Mol. Biol. 19, 117-121). Este enfoque se basa en la fusión de intracuerpos con un dominio F-box que permite la interacción con Skip1, un miembro del complejo SCF, una ubiquitina ligasa E3 de la maquinaria de ubiquitinilación de complejo E1/

E2/E3, que dirige las proteínas a la degradación celular dependiente del proteasoma. Este enfoque se desarrolló inicialmente para dirigirse a varias proteínas de fusión GFP en *Drosophila* utilizando un solo intracuerpo anti GFP, llamado GFP4, que es un intracuerpo de llama GFP de alta afinidad aislado originalmente de una biblioteca inmunitaria (Rothbauer, U. et al. Nat. Methods 3, 887-889). Para obtener información sobre la funcionalidad relativa de hs2dAb para un enfoque de reducción de proteínas de este tipo, se fusionaron varios de nuestros hs2dAb anti GFP en su extremo amino con el dominio Fbox y se comparó su eficacia con la eficacia del anticuerpo Fbox-GFP4. Para detectar células que expresan proteínas de fusión de intracuerpo Fbox (F-lb), se construyó un vector bicistrónico que impulsa la coexpresión de F-lb junto con un mCherry (Mito-mCherry) dirigida por mitocondrias. Se expresaron los anticuerpos F-lb en un clon HeLa que expresaba establemente GFP fusionado a la histona H2B (Silljé, H. H. W., Nagel, S., Körner, R. & Nigg, E. A., 2006, Curr. Biol. CB 16, 731-742) y se buscó el agotamiento de GFP-H2B. Como cabía esperar, F-GFP4, también conocido como degradFP, indujo una fuerte reducción de la expresión de H2B-GFP según lo analizado por transferencia western (datos no mostrados). En consecuencia, se observó una fuerte reducción en la intensidad de fluorescencia nuclear en las células que expresaban F-GFP4. No se observó ningún efecto al expresar GFP4 solo o un GFP4 fusionado a un dominio de Fbox truncado, no funcional. Cuando se probaron los clones anti-GFP seleccionados de nuestra biblioteca novedosa, se observó que varios hs2dAb que se encontraron eficaces cuando se utilizaron como intracuerpos fluorescentes no pudieron degradar H2B-GFP cuando se expresaron como F-lb. Esto resalta el hecho de que no todos los intracuerpos se pueden funcionalizar de manera eficaz con la F-box. Sin embargo, un hs2dAb anti-GFP indujo una desaparición completa de la señal de H2B-GFP nuclear cuando se expresó como F-lb. El análisis FACS mostró que la intensidad de fluorescencia disminuyó hasta en un 70%. Como cabía esperar, este efecto se revirtió en presencia de tratamiento con inhibidores del proteosoma.

En conjunto, estos experimentos muestran que el almacén hs2dAb permite la selección frecuente de anticuerpos que pueden expresarse en el citoplasma de células de mamíferos para ser utilizados como intracuerpos fluorescentes o intracuerpos inhibitorios.

Secuencias útiles para practicar la invención

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	FR1 del anticuerpo de un solo dominio	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASG
2	FR2 del anticuerpo de un solo dominio	MGWFRQAPGKEREFSAIS
3	FR3 del anticuerpo de un solo dominio	YYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATY YCA
4	FR4 del anticuerpo de un solo dominio	YWGGGTQVTVSS
5	secuencia codificante de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1	ATGGCGGAAGTGCAGCTGCAGGCGAGCGGCGGCG GCTTTGTGC AGCCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCG CGGCGAGCGGC
6	secuencia codificante de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2	ATGGGCTGGTTTCGTCAGGCGCCGGGCAAAGAACG TGAATTTG TGAGCGCGATTAGC
7	secuencia codificante de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3	TATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATT AGCCGTGATAACAGCAAAAA CACCGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCGG AAGATACCGCTACGTATTATTGCGCG
8	secuencia codificante de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4	TATTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTGAGCAG CGCGGCCGCA
9	Secuencia no humanizada del clon D10	VQLQESGG GFVQAGGSLR LSCAASGFTF SSYAMGWFRQ APGKEREFA AISDSSGNHAYYADSVKG RFTISRDN AK NTVY LQMNSL KP EDTATY YC ARSDAAGNPS GYWGGTQVTVSS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
10	Secuencia humanizada del clon D10	VQLQASGG GFVQPGGSLR LSCAASGFTF SSYAMGWFRQ APGKEREVVS AISDSSGNHAYYADSVKG RFTISRDN SK NTVYLQMNSL RAEDTATYYC ARSDAAGNPS GYWGQGTQVTVSS
11	oligonucleótido 5p 8328	CCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCCTAGAACTA GCTATGGCCGACGGGCCATGGCGGAAGTGCAGCT GCAGGCTTC
12	oligonucleótido 3p 8329	ACCGGGCCTCTAGACACTAGCTACTCGAGGGGCCC CAGTGGCCCTATCTATGCGGCCGCGCTACTCACAG TTAC
13	Cebador Dir de VHH	CCTTGATTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA A GGAGATATACCATGCTGATGTCCAGCTGCAGGCGT
14	Cebador Inv de VHH	CCACCGCTACCGCCGCTGCGG CCGCGTGAGGAGAC GGTGACCTGG G
15	Dir N-term	GCGGCCGCAGCGGCGGTAGCGGTGGCGAGAAAAA AATCACTGGATATACC
16	Inv N-term	GCCCATCGTGAAAACGGGGGCG
17	Dir C-term	CGCCCCCGTTTTACGATGGGC
18	Inv C-term	AGAATAGGTACCAGCGTAATCTGGGACATC ATAAGGGTAGCCACCCGCCCCGCCCTGCACTCATC G
19	Biblioteca de cebadores	AACATGCCATCACTCAGATTCTCG
20	Biblioteca de cebadores	GTTAGTCCATATTCAGTATTATCG

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> INSERTM
- < 120> anticuerpo sintético de un solo dominio
- <130> EB13063 EP OLICHON
- 10 <160> 23
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- < 223> dominio único sintético
- <400> 1

ES 2 698 976 T3

	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Phe	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser
	1				5					10					15	
	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly							
				20					25							
5	<210> 2 <211> 19 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
10	<220> < 223> dominio único sintético <400> 2															
	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ser
	1				5					10					15	
	Ala	Ile	Ser													
15	<210> 3 <211> 39 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
20	<220> < 223> dominio único sintético <400> 3															
	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn
	1				5					10					15	
	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
					20					25					30	
25	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala									
				35												
30	<210> 4 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
	<220> < 223> dominio único sintético															
35	<400> 4															
	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
	1				5					10						
40	<210> 5 <211> 84 <212> ADN <213> Secuencia artificial															
	<220>															

ES 2 698 976 T3

	< 223> dominio único sintético	
	<400> 5	
	atggcggaag tgcagctgca ggcgagcggc ggcggctttg tgcagccggg cggcagcctg	60
5	cgtctgagct gcgcggcgag cggc	84
	<210> 6	
	<211> 57	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> dominio único sintético	
15	<400> 6	
	atgggctggt ttcgtcaggc gccgggcaaa gaacgtgaat ttgtgagcgc gattagc	57
	<210> 7	
	<211> 117	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	< 223> dominio único sintético	
25	<400> 7	
	tattatgcgg atagcgtgaa aggccgtttt accattagcc gtgataacag caaaaacacc	60
	gtgtatctgc agatgaacag cctgcgtgcg gaagataccg ctacgtatta ttgcgcg	117
30	<210> 8	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	< 223> dominio único sintético	
	<400> 8	
40	tattggggcc agggcaccca ggtgaccgtg agcagcgcg cgcga	45
	<210> 9	
	<211> 119	
	<212> PRT	
	<213> Lama glama	
45	<400> 9	

ES 2 698 976 T3

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala Gly Gly Ser
1 5 10 15

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

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
35 40 45

Ala Ile Ser Asp Ser Ser Gly Asn His Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Ala Ala Gly Asn Pro Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 < 223> dominio único sintético

<400> 10

Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

ES 2 698 976 T3

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

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser
35 40 45

Ala Ile Ser Asp Ser Ser Gly Asn His Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Ala Ala Gly Asn Pro Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 78

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 11

cccaccaaac ccaaaaaaag agatcctaga actagctatg gccggacggg ccatggcgga 60

agtgcagctg caggcttc 78

15 <210> 12

<211> 74

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

< 223> dominio único sintético

<400> 12

accgggcctc tagacactag ctactcgagg ggccccagtg gccctatcta tgcggccgcg 60

25 ctactcacag ttac 74

<210> 13

<211> 72

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

< 223> dominio único sintético

ES 2 698 976 T3

	<400> 13	
	ccttgattct agaaataatt ttgtttaact ttaagaagga gatataccat gctgatgtcc	60
	agctgcaggc gt	72
5	<210> 14 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 14 ccaccgtac cgccgctgcg gccgctgag gagacggtga cctggg	46
15	<210> 15 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 15 gcggcgcgag cgccggtagc ggtggcgaga aaaaaatcac tggatatacc	50
30	<210> 16 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 16 gcccacgtg aaaacggggg cg	22
40	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 17 cgccccggtt ttacgatgg gc	22
50	<210> 18 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador	
	<400> 18 agaataggtg ccagcgtaat ctgggacatc ataagggtag ccacccgccc cgccctgcac	60
60	tcacgcg	66
	<210> 19	

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador

<400> 19
 aacatgccat cactcagatt ctcg 24

10 <210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

<400> 20
 gttagtccat attcagtatt atcg 24

25 <210> 21
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 21
 Met Ala Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

30 <210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Lama glama

35 <400> 22
 Glu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Ile Ser

40 <210> 23
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Lama glama

45 <400> 23
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 35

REIVINDICACIONES

1. Un método para hacer una biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio, comprendiendo dicho método

5 i. introducir una diversidad de ácidos nucleicos que codifican CDR1, CDR2 y CDR3, entre las respectivas regiones codificantes marco de un anticuerpo sintético de un solo dominio para generar ácidos nucleicos que codifican una diversidad de anticuerpos sintéticos de un solo dominio con la misma secuencia de aminoácidos de armazón de anticuerpo sintético de un solo dominio,

10 en donde dicho armazón del anticuerpo sintético de un solo dominio comprende las siguientes regiones marco que consisten en FR1 de la SEQ ID NO: 1, FR2 de la SEQ ID NO:2, FR3 de la SEQ ID NO: 3 y FR4 de la SEQ ID NO:4.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los restos de aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 sintéticas de al menos el 70%, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los clones de la biblioteca, se determinan por las
15 siguientes reglas:

en la posición 1 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A o D;
en la posición 2 de la CDR1: Y, S, T, F, G, T, o T;
en la posición 3 de la CDR1: Y, S, F o W;
20 en la posición 4 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K o N;
en la posición 5 de la CDR1: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q o L;
en la posición 6 de la CDR1: S, T, Y, D, o E;
en la posición 7 de la CDR1: S, T, G, A, D, E, N, I, o V;
en la posición 1 de la CDR2: R, S, F, G, A, W, D, E, o Y;
25 en la posición 2 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L o Y;
en la posición 3 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;
en la posición 4 de la CDR2: G, S, T, N, o D;
en la posición 5 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K o M;
en la posición 6 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, o K;
30 en la posición 7 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, o V;
y en donde la secuencia de aminoácidos de CDR3 comprende entre 9 y 18 aminoácidos seleccionados aleatoriamente entre los siguientes aminoácidos: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K, M.

3. Una proteína de unión a antígeno, que comprende un anticuerpo sintético de un solo dominio de la siguiente fórmula:
35 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, en donde dichas regiones marco consisten en la FR1 de la SEQ ID NO:1, FR2 de la SEQ ID NO:2, FR3 de la SEQ ID NO: 3 y FR4 de la SEQ ID NO:4.

4. La proteína de unión a antígeno de la reivindicación 3, en donde los restos de aminoácidos de la CDR1 y la CDR2 sintéticas son:

40 en la posición 1 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A o D;
en la posición 2 de la CDR1: Y, S, T, F, G, T, o T;
en la posición 3 de la CDR1: Y, S, F o W;
en la posición 4 de la CDR1: Y, R, S, T, F, G, A, W, D, E, K o N;
45 en la posición 5 de la CDR1: S, T, F, G, A, W, D, E, N, I, H, R, Q o L;
en la posición 6 de la CDR1: S, T, Y, D, o E;
en la posición 7 de la CDR1: S, T, G, A, D, E, N, I, o V;
en la posición 1 de la CDR2: R, S, F, G, A, W, D, E, o Y;
en la posición 2 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, R, Q, L o Y;
50 en la posición 3 de la CDR2: S, T, F, G, A, W, D, E, N, H, Q, P;
en la posición 4 de la CDR2: G, S, T, N, o D;
en la posición 5 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K o M;
en la posición 6 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, o K;
en la posición 7 de la CDR2: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, o V;
55 y en donde la secuencia de aminoácidos de CDR3 comprende entre 9 y 18 aminoácidos seleccionados entre los siguientes aminoácidos: S, T, F, G, A, Y, D, E, N, I, H, R, Q, L, P, V, W, K, M.

5. La proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, que comprende además un dominio F-box para dirigir una proteína al proteosoma.

60 6. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5.

7. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 6, que comprende las siguientes secuencias de ácidos nucleicos: SEQ
65 ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, que codifican respectivamente las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 de las SEQ ID NO: 1-4.

8. Una célula hospedadora recombinante para la producción de una proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7.

5 9. Un proceso para la producción de una proteína de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 8 en condiciones apropiadas para la producción de la proteína de unión a antígeno, y aislar dicha proteína.

10 10. Una biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio que comprende una mezcla de diversos anticuerpos de un solo dominio de la siguiente fórmula: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, en donde dichas regiones marco consisten en la FR1 de la SEQ ID NO:1, FR2 de la SEQ ID NO:2, FR3 de la SEQ ID NO: 3 y FR4 de la SEQ ID NO:4.

11. El armazón del anticuerpo sintético de un solo dominio de la reivindicación 10, que comprende al menos $3 \cdot 10^9$ anticuerpos de un solo dominio distintos.

15 12. Uso de la biblioteca de anticuerpos sintéticos de un solo dominio de la reivindicación 10 u 11, en un método de análisis para identificar un anticuerpo sintético de un solo dominio que se une a una diana de interés.

13. El uso de la reivindicación 12, en donde dicho método de análisis es presentación en fagos.

20

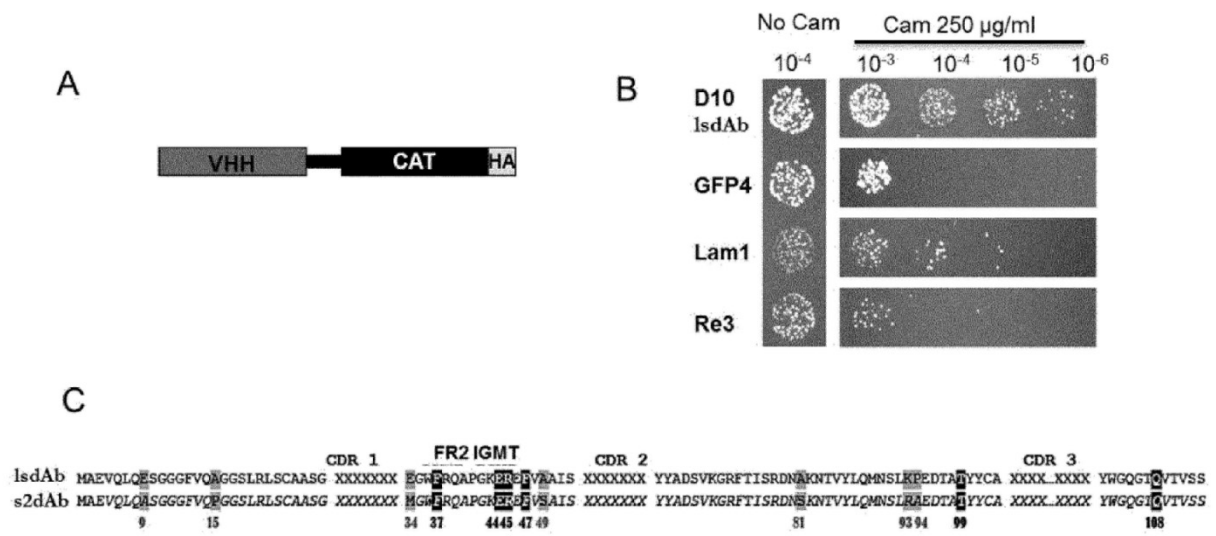


FIG. 1

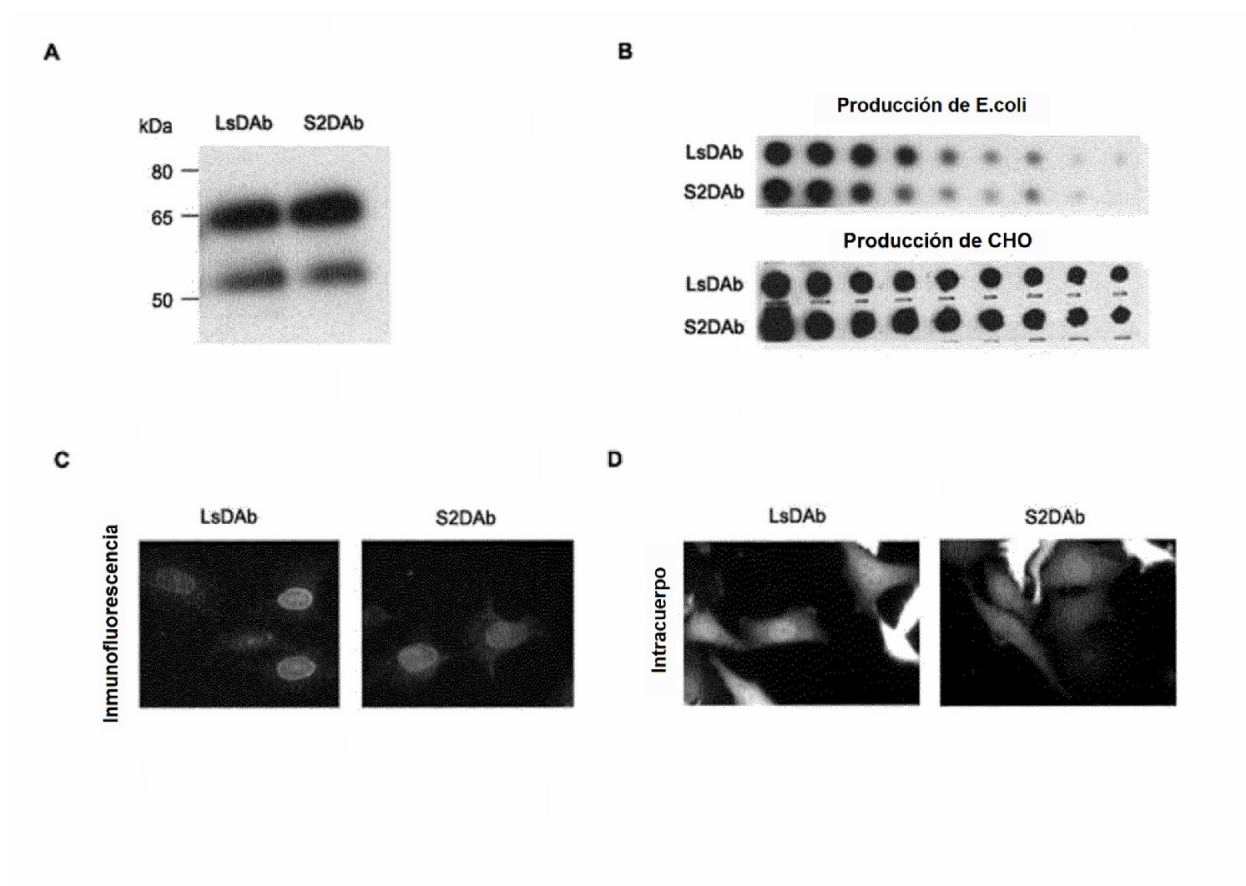


FIG. 2

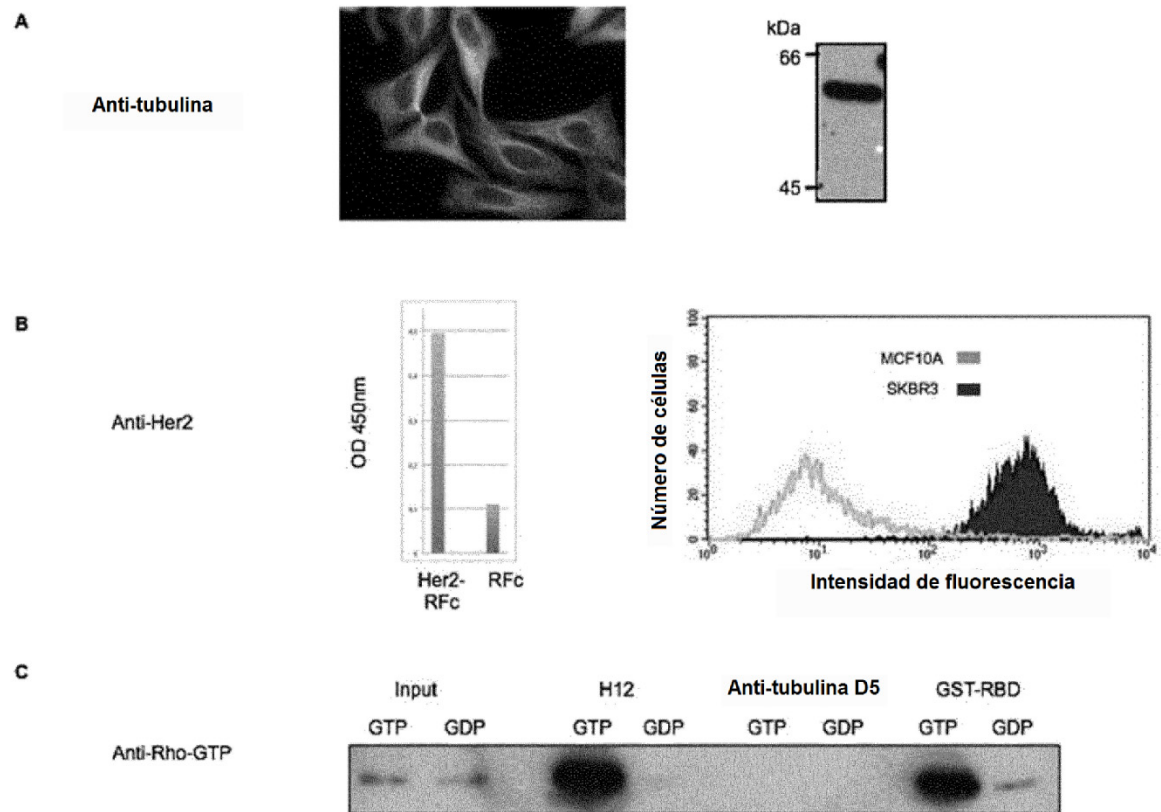
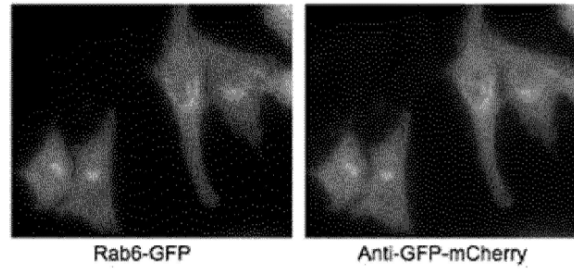
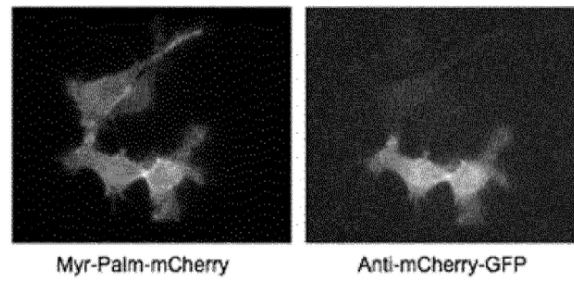


FIG. 3

A



B



C

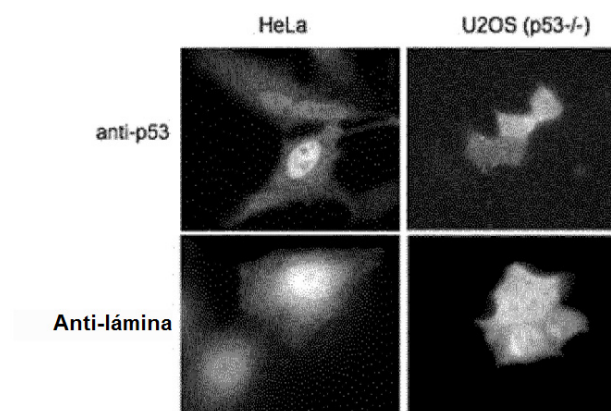


FIG. 4

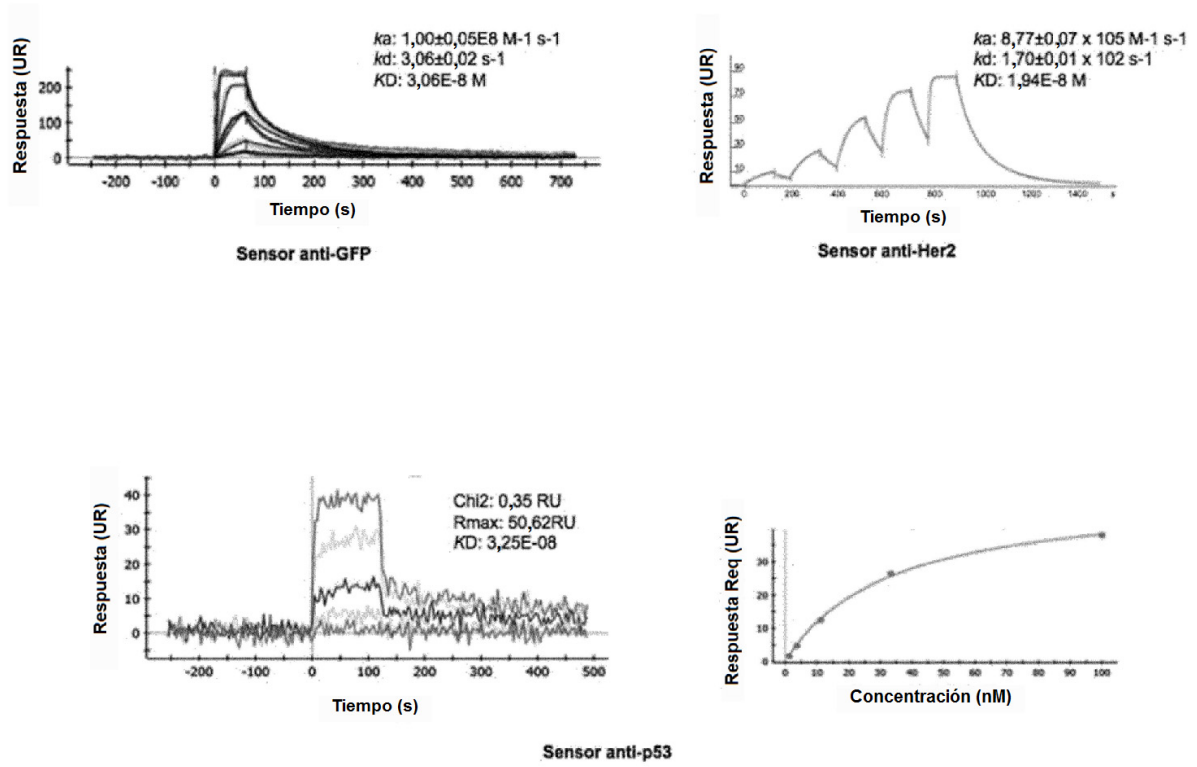


FIG. 5