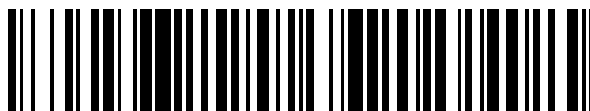


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 702**

51 Int. Cl.:

**C40B 50/06** (2006.01)

**C12N 5/078** (2010.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010 E 16162568 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3059337**

54 Título: **Perfilado de la inmunidad adaptativa y métodos para la generación de anticuerpos monoclonales**

30 Prioridad:

**15.01.2009 US 145039 P**

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

**08.10.2019**

73 Titular/es:

**ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES CORPORATION  
(100.0%)**

**1551 Eastlake Avenue East, Suite 200  
Seattle, Washington 98102, US**

72 Inventor/es:

**WILEY, STEVEN, R.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 726 702 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**

Perfilado de la inmunidad adaptativa y métodos para la generación de anticuerpos monoclonales

**5 Campo**

La invención se refiere al campo de la inmunología y, en particular al perfilado de la inmunidad adaptativa y a los métodos de producir anticuerpos monoclonales.

**10 Antecedentes**

Los métodos existentes para crear anticuerpos monoclonales terapéuticos son principalmente el hibridoma, la expresión en fagos, el aislamiento de linfocitos B, y el rescate de la secuencia del anticuerpo, seguido si es necesario por la humanización del anticuerpo. La etapa de humanización se puede eliminar utilizando animales transgénicos que son capaces por sí mismos de generar anticuerpos humanos.

El método del hibridoma implica aislar grandes cantidades de linfocitos B procedentes de un organismo inmunizado que se fusiona a continuación con células de un tumor de mieloma. Estas células se seleccionan a continuación para obtener células individuales productoras de anticuerpos con las propiedades deseadas. Una vez que se detecta un hibridoma concreto de interés, se aísla un ADNc que codifica el anticuerpo y se secuencia mediante técnicas de biología molecular normalizadas, seguido por un proceso de humanización. La humanización es el proceso de colocar la región variable del anticuerpo, usualmente de un ratón o conejo, en una estructura de anticuerpo humano de tal manera que la molécula resultante sea menos inmunógena cuando se usa como agente terapéutico en un hospedador humano. La tecnología del hibridoma está limitada por su baja eficacia; la necesidad de grandes cantidades de linfocitos B, que se obtienen generalmente sacrificando ratones y extrayendo sus linfocitos B esplénicos; y la relativa inestabilidad de los propios hibridomas.

La expresión en fagos es una tecnología que utiliza una biblioteca de fagos recombinantes que presentan sobre su superficie dominios variables emparejados aleatoriamente de cadena pesada y ligera de anticuerpos tomados de donantes humanos. Los fagos se criban frente al antígeno de interés y aquellos que se unen específicamente se amplifican y el proceso se repite. Después de múltiples ciclos de cribado, el ADN de los fagos representativos se aísla y secuencia. A continuación se transfieren los dominios variables a las estructuras de la región constante de la Ig. Esta tecnología requiere a menudo una maduración artificial por afinidad para generar anticuerpos de suficiente afinidad, lo que implica preparar una serie de mutaciones puntuales y volver a analizar la afinidad de los anticuerpos resultantes. Además, el proceso de cribado es bastante laborioso y a menudo se lleva a cabo utilizando equipos robóticos.

Las técnicas de aislamiento de linfocitos B y de rescate de la secuencia del anticuerpo implican el aislamiento de linfocitos B individuales o de pequeñas cantidades de linfocitos B y cultivarlos *in vitro* para crear pequeñas cantidades de sobrenadantes acondicionados que se pueden usar para seleccionar anticuerpos con las propiedades deseadas. El método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM) es un aspecto de esta tecnología. Una vez que se detecta un anticuerpo con las propiedades deseadas, las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se recuperan de la célula o células mediante técnicas moleculares normalizadas tales como PCR, y el anticuerpo resultante se humaniza a continuación de la misma manera que un anticuerpo derivado de hibridoma. El documento US2006/0233812 se refiere a métodos para identificar secuencias candidatas para un anticuerpo específico contra un antígeno producido por un microorganismo durante una infección o contra vacuna.

Los métodos actualmente disponibles para la generación de anticuerpos monoclonales son laboriosos, necesitan mucho tiempo, y están sujetos a imprecisiones. De esta manera, sigue existiendo una necesidad en la técnica de un método eficaz, fácil, y preciso para generar anticuerpos monoclonales.

**Sumario**

La presente divulgación resuelve necesidades largo tiempo sentidas en el campo de la inmunología proporcionando un método novedoso, eficaz y preciso para producir anticuerpos monoclonales de alta afinidad. Los métodos de la presente divulgación son más rápidos y menos laboriosos que cualquier tecnología existente para generar anticuerpos monoclonales. Usando este método se pueden generar datos de secuencias en algunos días, en comparación con las semanas o meses requeridos por los otros métodos. Además, como solamente se necesitan pequeñas cantidades de ADN de acuerdo con los presentes métodos, se pueden generar datos mediante medios no invasivos y no letales que permiten un muestreo repetido del organismo inmunizado y que permiten también que la técnica se aplique directamente a pacientes humanos.

El sistema inmune adaptativo responde a cambios en la exposición de un organismo a diferentes patógenos y patologías creando células inmunes que se diferencian para responder a antígenos concretos. Esto se produce mediante la redistribución genómica en determinados loci que, a su vez, genera una amplia variedad de proteínas no codificadas directamente en el ADN genómico de la línea germinal. Dichas regiones sujetas a este tipo de

redistribución incluyen los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de la Ig, y las regiones de los dominios variables de los receptores alfa y beta de los linfocitos T. Una vez expuestas a los antígenos que inducen estos cambios, las células que reaccionan con estos existirán en el organismo durante años, y pueden proliferar rápidamente en respuesta a la reexposición al antígeno. De esta manera, se mantiene un registro de exposición al antígeno en el hospedador. La presente divulgación describe un método para extraer esta información a fin de crear anticuerpos monoclonales terapéuticamente útiles.

La presente divulgación proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales aplicando nuevas tecnologías moleculares y proteómicas con un novedoso método de análisis de datos.

Las muestras de sangre de organismos inmunizados se usan para generar genes de perfilado para bibliotecas MPSS que están sujetos a redistribución por el sistema inmune adaptativo incluyendo, pero no de forma limitativa, la región variable de la cadena pesada de Ig.

De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales, comprendiendo el método las etapas de: (a) inmunizar a un sujeto hospedador con un antígeno; (b) crear una biblioteca de secuencias de ADNc, comprendiendo la creación las etapas de: (i) aislar linfocitos procedentes del sujeto hospedador; (ii) aislar ARNm de los linfocitos, (iii) transcribir de manera inversa el ARNm a ADNc; (iv) amplificar las secuencias de ADNc del anticuerpo diana; y (v) secuenciar las secuencias de ADNc del anticuerpo diana; y (c) analizar la frecuencia de las secuencias de ADNc del anticuerpo diana, en donde se identifican secuencias de ADNc de anticuerpo diana que tienen una frecuencia relativamente alta como secuencias del anticuerpo candidato.

Según determinados aspectos, los linfocitos comprenden linfocitos B y linfocitos T. Según aspectos adicionales, los linfocitos comprenden linfocitos B aislados. En algunos aspectos, se proporcionan métodos en donde las frecuencias relativas de las secuencias de ADNc del anticuerpo diana se comparan antes y después de la exposición al antígeno, donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana que tienen una frecuencia significativamente mayor después de la exposición al antígeno se identifican como secuencias del anticuerpo candidato.

En aspectos adicionales, un sujeto hospedador se vuelve a inmunizar con el antígeno, se crea una biblioteca de secuencias de ADNc tras la reinmunización, y las frecuencias relativas de las secuencias del anticuerpo diana se comparan antes y después de la reinmunización, donde las secuencias de anticuerpos presentes a una frecuencia significativamente mayor tras la reinmunización se identifican como secuencias de anticuerpos candidatas maduras.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos donde las frecuencias relativas de las secuencias de ADNc de anticuerpos diana se comparan en dos o más veces tras la exposición al antígeno, donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana que tienen una frecuencia significativamente menor en momentos posteriores se identifican como secuencias del anticuerpo candidato.

En algunos aspectos, las secuencias de anticuerpos diana comprenden secuencias del dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig). En aspectos adicionales, las secuencias de anticuerpos diana comprenden secuencias de una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig). En diversos aspectos, las secuencias de anticuerpos candidatas con una secuencia del dominio variable de la cadena ligera y una región marco de Ig producen un conjunto de anticuerpos monoclonales candidatos. En algunos aspectos, la región marco de Ig es una región marco de Ig humana.

De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para evaluar los anticuerpos monoclonales candidatos para determinar su afinidad con un antígeno. En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona someter los anticuerpos monoclonales candidatos a selección positiva para identificar anticuerpos monoclonales de alta afinidad. En otros aspectos adicionales, someter los anticuerpos monoclonales candidatos a selección positiva comprende poner en contacto los anticuerpos monoclonales candidatos al antígeno unido a un sustrato y aislar los anticuerpos unidos de los anticuerpos no unidos. En determinados aspectos, los anticuerpos monoclonales candidatos se unen a un antígeno con una afinidad de al menos  $1 \times 10^{10}$  litro/mol, medida como una constante de asociación ( $K_{af}$ ).

De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para secuenciar los anticuerpos monoclonales de alta afinidad. En aspectos adicionales, las frecuencias relativas de las secuencias de los anticuerpos diana se analizan utilizando un algoritmo de software bioinformático. En otros aspectos adicionales, las secuencias de ADNc diana amplificadas se secuencian mediante secuenciación masiva paralela de firmas (MPSS).

En determinados aspectos, el sujeto hospedador es un animal experimental. En algunos aspectos, el sujeto hospedador es un animal transgénico que expresa anticuerpos humanos. En otros aspectos, el sujeto hospedador es un paciente humano que se ha expuesto a un antígeno o a un patógeno o que padece una enfermedad que altera la respuesta inmunitaria adaptativa.

De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona que un sujeto hospedador se inmunice con múltiples antígenos. En aspectos adicionales, el anticuerpo monoclonal es reactivo a múltiples antígenos.

5 De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para administrar un antígeno de fondo y seleccionarlo frente anticuerpos que son reactivos al antígeno de fondo. En otros aspectos, el antígeno de fondo se administra después de un primer antígeno.

10 Las características y ventajas descritas en la memoria descriptiva no son todas inclusivas y, en concreto, serán evidentes para una persona normalmente experta en la materia muchas características y ventajas adicionales a la vista de los dibujos, la memoria descriptiva, y las reivindicaciones. Además, debe señalarse que el lenguaje utilizado en la memoria descriptiva se ha seleccionado principalmente por su legibilidad y a fines instructivos, y puede no haberse seleccionado para delinear o circunscribir la materia objeto descrita.

15 **Breve descripción de las figuras**

**Figura 1:** Generación de una biblioteca de secuencias de la cadena pesada. Esta figura ilustra un proceso a modo de ejemplo por el cual se pueden generar regiones de cadena variables específicas de antígenos candidatos. Se generan datos de MPSS para un isotipo específico de la región variable de la cadena pesada de Ig, antes y después de la exposición al antígeno. Estos datos se analizan digitalmente para identificar aquellas secuencias que se han generado en respuesta a la exposición al antígeno.

20 **Figura 2:** Generación de una biblioteca de secuencias de la cadena pesada utilizando múltiples antígenos / refuerzo. Esta figura es una ampliación de la figura 1 por la cual, la región variable se muestrea varias veces tras realizar refuerzos repetidos con el mismo antígeno o antígenos relacionados. Estos datos se analizan digitalmente para identificar dominios variables de anticuerpos candidatos que se han inducidos después de que cada refuerzo reaccionara con los antígeno(s).

25 **Figura 3:** Análisis de grupos basados en puntuaciones experimentales. **(A)** Esta figura muestra el proceso de identificar nodos máximos de significancia estadística a partir de los datos de la secuencia NGS del código de barras. **(B)** Esta figura muestra histogramas del logaritmo negativo de las puntuaciones experimentales de los nodos máximos del brazo experimental indicado sobre el eje Y superior, y el inverso del logaritmo de las puntuaciones control en el eje Y inferior. Las puntuaciones experimentales de las cohortes experimentales están indicadas como brazo 1..5 y las puntuaciones inversas están indicadas rev 1..5. Las cuatro gráficas muestran los efectos de diferentes valores de T desde 1 a 1000 de las puntuaciones experimentales.

30 **Figura 4:** Emparejamiento de la cadena ligera con la biblioteca de secuencias de la cadena pesada. Esta figura muestra un método para emparejar las secuencias de la cadena pesada con secuencias de la cadena ligera candidatas para generar anticuerpos de longitud completa que se expresan y seleccionan a continuación para las propiedades deseadas. Las secuencias de la cadena ligera candidatas pueden tanto generarse de manera similar a las secuencias de la cadena pesada candidatas, como deducirse sobre la base de isotipos conocidos por emparejarse frecuentemente con, y que estabilizan, el isotipo de la lista de candidatos de la cadena pesada.

35 **Descripción detallada**

45 La presente divulgación proporciona de forma general un método novedoso, eficaz y preciso para producir anticuerpos monoclonales de alta afinidad. Los métodos de la presente divulgación son más rápidos y menos laboriosos que cualquier tecnología existente para generar anticuerpos monoclonales.

50 Una persona experta en la materia apreciará que la presente divulgación se puede realizar sin experimentación innecesaria de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento. Los métodos, técnicas y sustancias químicas son como se describen en las referencias proporcionadas o proceden de protocolos de los libros de texto habituales de biotecnología y biología molecular.

55 Las Figuras y la siguiente descripción se refieren a los aspectos preferidos solamente como ilustración. Debe señalarse que, a partir de la siguiente descripción, los aspectos alternativos divulgados en el presente documento se reconocerán fácilmente como alternativas viables que se pueden emplear sin separarse de los principios de lo que se reivindica.

60 Debe señalarse que el lenguaje utilizado en el presente documento se ha seleccionado principalmente por su legibilidad y a fines instructivos, y puede no haberse seleccionado para delinear o circunscribir la materia objeto descrita. De acuerdo con ello, se pretende que la divulgación sea ilustrativa, pero no limitante, del alcance de los métodos reivindicados.

65 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una combinación de dos o más anticuerpos, y similares.

Debe entenderse que cualquier término no definido directamente tiene los significados normalmente asociados con estos como se entiende en la técnica de la presente divulgación. Se describen determinados términos en el presente documento para proporcionar una directriz adicional al especialista para describir las composiciones, dispositivos, métodos y similares de los aspectos de la presente divulgación, y cómo realizarlos o usarlos. Se apreciará que la misma idea puede expresarse en más de una manera. Por consiguiente, se pueden usar un lenguaje y sinónimos alternativos para una cualquiera o más de los términos descritos en el presente documento. No se debe considerar significativo si un término se ha elaborado o descrito en el presente documento, o no se ha hecho. Se proporcionan algunos métodos, materiales y similares sinónimos o sustituibles. Las citas de uno o unos pocos sinónimos o equivalentes no excluyen el uso de otros sinónimos o equivalentes, a no ser que se indique de forma explícita. El uso de ejemplos, incluyendo ejemplos de términos, se hace solamente con fines ilustrativos, y no limita el alcance y el significado de los aspectos de la presente divulgación del presente documento.

"Aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferentemente  $\pm 5\%$ , incluso más preferentemente  $\pm 1\%$ , y aún más preferentemente  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que dichas variaciones son adecuadas para llevar a cabo los métodos divulgados.

"Paciente", "sujeto" o "mamífero" se usan de forma indistinta y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como animales experimentales tales como conejos, ratas, y ratones, y otros animales. Los animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, y reptiles.

El término "cantidad suficiente" significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad de antígeno suficiente para dar lugar a una respuesta inmunitaria en un hospedador.

El término "aislado" significa un componente biológico, tal como una célula, grupo de células, ácido nucleico, péptido o proteína, que se ha separado sustancialmente, producido separado de, o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo donde el componente se produce naturalmente, es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos y proteínas. Los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas que se han aislado de esta manera incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas mediante métodos de purificación normalizados. El término abarca también ácidos nucleicos, péptidos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

El término "muestra", se usa en su sentido más amplio. Una muestra biológica sospechosa de contener ácidos nucleicos que codifican al menos un anticuerpo monoclonal, o fragmento del mismo, o al menos el propio anticuerpo monoclonal y dicha muestra puede comprender un fluido corporal, un extracto procedente de una célula, cromosoma, orgánulo, o membrana aislada de una célula, una célula, ADN, ARN o ADNc genómico (en solución o unido a un soporte sólido), un tejido, una impresión de tejidos, y similares.

Como se usa en el presente documento, cualquier referencia a "1 aspecto" o "un aspecto" significa que un elemento, característica, estructura, o característica concreta descrita con el aspecto se incluye en al menos un aspecto. Las apariciones de la expresión "en un aspecto" en varios lugares a lo largo de la memoria descriptiva no se refieren todas necesariamente al mismo aspecto.

Se pretende que los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "tiene", "que tiene" o cualquier otra variación de los mismos cubran una inclusión no exclusiva. Por ejemplo, un proceso, método, artículo, o equipo que comprende una lista de elementos no está necesariamente limitado solo a aquellos elementos, sino que puede incluir otros elementos no expresamente relacionados o inherentes a dicho proceso, método, artículo, o equipo. Además, a no ser que se indique expresamente lo contrario, "o" se refiere a un o inclusivo y no a un o exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B se satisface por uno cualquiera de lo siguiente: A es verdadero (o presente) y B es falso (o no presente), A es falso (o no presente) y B es verdadero (o presente), y A y B son verdaderos (o presentes).

Además, el uso de "un" o "uno" se emplea para describir elementos y componentes de los aspectos del presente documento. Esto se lleva a cabo meramente por conveniencia y para dar una impresión general de la invención. Esta descripción debe leerse para incluir uno o al menos uno y el singular incluye también el plural a no ser que sea obvio que se entienda de otra manera.

"Aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferentemente  $\pm 5\%$ , incluso más preferentemente  $\pm 1\%$ , y aún más preferentemente  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que dichas variaciones son adecuadas para llevar a cabo los métodos divulgados.

La presente divulgación incluye, pero no de forma limitativa, un método para derivar anticuerpos monoclonales a partir de un organismo inmunizado. El organismo puede ser un organismo experimental tratado con el antígeno y un adyuvante adecuado, o expuesto a un patógeno u otro agente biológico. El organismo puede ser también un

paciente humano que padece de la exposición a un patógeno o a una enfermedad. Como el método requiere solamente pequeñas cantidades de sangre o tejido, el mismo organismo puede muestrearse múltiples veces y someterse a los siguientes análisis descritos.

- 5 De acuerdo con un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales, comprendiendo el método las etapas de: (a) inmunizar un sujeto hospedador con un antígeno; (b) crear una biblioteca de secuencias de ADNc, comprendiendo la creación las etapas de: (i) aislar linfocitos procedentes del sujeto hospedador, (ii) aislar ARNm de los linfocitos, (iii) transcribir de forma inversa el ARNm a ADNc, (iv) amplificar las secuencias de ADNc del anticuerpo diana, y (v) secuenciar las secuencias de ADNc del anticuerpo diana; y (c) analizar la frecuencia las secuencias de ADNc del anticuerpo diana, donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana que tienen una frecuencia relativamente alta se identifican como secuencias del anticuerpo candidato.

De acuerdo con determinados aspectos, los linfocitos comprenden linfocitos B y linfocitos T. De acuerdo con aspectos adicionales, los linfocitos comprenden linfocitos B aislados.

- 15 En algunos aspectos, se proporcionan métodos donde las frecuencias relativas de las secuencias de ADNc del anticuerpo se comparan antes y después de la exposición al antígeno, donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana que tienen una frecuencia significativamente mayor tras la exposición al antígeno se identifican como secuencias del anticuerpo candidato.

- 20 En aspectos adicionales, un sujeto hospedador se vuelve a inmunizar con el antígeno, se crea una biblioteca de secuencias de ADNc tras la reinmunización, y las frecuencias relativas de las secuencias del anticuerpo diana se comparan antes y después de la reinmunización, donde las secuencias de anticuerpos presentes a una frecuencia significativamente mayor tras la reinmunización se identifican como secuencias de anticuerpos candidatas maduras.

- 25 En algunos aspectos, se proporcionan métodos donde las frecuencias relativas de secuencias de ADNc de anticuerpos diana se comparan en dos o más veces tras la exposición al antígeno, donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana que tienen una frecuencia significativamente menor en momentos posteriores se identifican como secuencias del anticuerpo candidato.

### 30 **Inmunización del hospedador y producción de anticuerpos**

- Los inmunógenos se administran a un hospedador para estimular una respuesta inmunitaria. El hospedador puede ser cualquier animal conocido en la materia que sea útil en ensayos de selección biotecnológicos y que sea capaz de producir anticuerpos recuperables cuando se administra un inmunógeno, tal como, pero no de forma limitativa, conejos, ratones, ratas, hámsteres, monos, babuinos y seres humanos. En otro aspecto más, el hospedador es transgénico y produce anticuerpos humanos, facilitando de esta forma mucho el trabajo de desarrollo para crear un tratamiento terapéutico para seres humanos.

- 40 En algunos aspectos de la presente divulgación, se proporcionan métodos donde las secuencias del anticuerpo diana comprenden las secuencias del dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig). En aspectos adicionales, las secuencias del anticuerpo diana comprenden las secuencias de una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig). En diversos aspectos, las secuencias de anticuerpos candidatas con una secuencia del dominio variable de la cadena ligera y una región marco de Ig producen un conjunto de anticuerpos monoclonales candidatos. En algunos aspectos, la región marco de Ig es una región marco de Ig humana.

- 50 En determinados aspectos, el sujeto hospedador es un animal experimental. En algunos aspectos, el sujeto hospedador es un animal transgénico que expresa anticuerpos humanos. En otros aspectos, el sujeto hospedador es un paciente humano que se ha expuesto a un antígeno o a un patógeno o que padece una enfermedad que altera la respuesta inmunitaria adaptativa.

- El término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina o molécula intacta así como a los fragmentos de la misma que se unen a un epítipo específico. Dichos anticuerpos incluyen, pero no de forma limitativa, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, monocatenarios, fragmentos Fab, Fab', F(ab)' y/o porciones de F(v) del anticuerpo completo. Los anticuerpos pueden incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monocatenarios, y fragmentos de los mismos que retienen la función de unión del antígeno progenitor.

- 60 Un "anticuerpo" intacto comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>

está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas entre el extremo amino y el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con el antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. El término anticuerpo incluye porciones de unión a antígeno o un anticuerpo intacto que retiene la capacidad de unión. Los ejemplos de unión incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $CH1$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro a la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $CH1$ ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature, 341:544-546 (1989)), que consiste en un dominio  $V_H$ ; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR).

El término "anticuerpos monocatenarios" o "Fv monocatenario (scFv)" se refiere a una molécula de fusión a anticuerpo de los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ . Aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes diferentes, se pueden unir utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite su fabricación en forma de una cadena de proteína monocatenaria donde las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, Science, 242:423-426 (1988); y Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos monocatenarios que están incluidos por referencia en el término fragmentos de "anticuerpo" se pueden preparar mediante técnicas recombinantes o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción incompleta o aislada de la secuencia completa del anticuerpo que retiene la función del antígeno de unión del anticuerpo progenitor. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos se encuentran abarcados por la presente divulgación siempre que retengan la afinidad deseada del anticuerpo de longitud completa. En particular, pueden ser más cortos en al menos un aminoácido.

También, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes. Véanse, Cabilly, patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Queen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10033 (1989).

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Una composición de anticuerpo molecular muestra una única especificidad y afinidad de unión para un epítipo concreto. De acuerdo con ello, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tiene regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas.

El término "respuesta celular inmunitaria" se refiere a la respuesta de las células del sistema inmunitario a estímulos externos o internos (por ejemplo, antígenos, receptores superficiales celulares, citoquinas, y otras células) que producen cambios bioquímicos en las células inmunitarias que dan como resultado la migración de células inmunitarias, la destrucción de células diana, la fagocitosis, la producción de anticuerpos, otros efectores solubles de la respuesta inmunitaria, y similares.

"Respuesta inmunitaria" se refiere a la acción concertada de linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las anteriores células o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y complementos) que dan como resultado un daño selectivo, la destrucción, o la eliminación del cuerpo humano de células cancerosas, células tumorales metastásicas, células de cáncer de mama metastásico, patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, o en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

El término "inmunidad protectora" significa que el sujeto desencadena una respuesta inmunitaria activa contra la composición inmunógena y/o que se ha proporcionado al sujeto inmunidad pasiva, de tal manera que, tras la exposición o un estímulo posterior, el sujeto es capaz de resistir y/o superar la infección y/o la enfermedad. De esta manera, una respuesta inmunitaria protectora disminuirá preferentemente la incidencia de morbilidad y/o mortalidad derivadas de la posterior exposición a la infección y/o a la enfermedad.

"Inmunidad adaptativa" o "respuesta inmunitaria adaptativa" se usan de forma indistinta y en un sentido amplio en el presente documento, y denotan la respuesta inmunitaria a un estímulo antigénico, incluyendo el desarrollo de memoria inmunológica. La respuesta inmunitaria adaptativa incluye, sin limitación, inmunidad humoral y celular.

El hospedador desencadena una "respuesta inmunitaria activa" tras la exposición a inmunógenos por infección o por vacunación. Por el contrario, se adquiere "inmunidad pasiva" por transferencia de sustancias preformadas (por ejemplo, anticuerpos, factores de transferencia, injertos tímicos, interleuquina-2, y similares) procedentes de un hospedador inmunizado activamente a un hospedador no inmune.

"Linfocito" como se usa en el presente documento, tiene el significado normal en la materia, y se refiere a cualquiera de leucocitos mononucleares no fagocíticos, que se encuentran en la sangre, linfa, y tejidos linfoides, por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T.

- 5 "Respuesta de linfocitos T" y "actividad de linfocitos T" se usan en el presente documento de forma indistinta para referirse al componente de la respuesta inmunitaria dependiente de los linfocitos T (por ejemplo, la proliferación y/o diferenciación de los linfocitos T en linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o linfocitos T supresores, la provisión de señales por los linfocitos T auxiliares a los linfocitos B que producen o evitan la producción de anticuerpos, la destrucción de las células diana específicas por los linfocitos T citotóxicos, y la liberación de factores solubles tales como citoquinas que modulan la función de otras células inmunitarias).

15 Se pueden detectar *in vitro* los componentes de una respuesta inmune mediante diversos métodos que son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la materia. Por ejemplo, (1) los linfocitos T citotóxicos se pueden incubar con células diana marcadas radioactivamente y la lisis de estas células diana se puede detectar por la liberación de radioactividad; (2) se pueden incubar linfocitos T auxiliares con antígenos y células presentadoras de antígenos y medirse la síntesis y secreción de citoquinas mediante métodos normalizados (Windhagen *et al.*, *Immunity*, 2:373-380 (1995)); (3) se pueden incubar células presentadoras de antígenos con antígenos de proteínas completas y detectarse la presentación de este antígeno sobre MHC tanto mediante ensayos de activación de linfocitos T como mediante métodos biofísicos (Harding *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*, 86:4230-4234 (1989)); (4) se pueden incubar mastocitos con reactivos que reticular sus receptores Fc-épsilon y medirse la liberación de histaminas mediante enzimoanálisis (Siraganian *et al.*, *TIPS*, 4:432-437 (1983)).

25 De forma similar, se pueden detectar también los productos de una respuesta inmunitaria tanto en un organismo modelo (por ejemplo, un ratón) como en un paciente humano mediante diversos métodos que son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la materia. Por ejemplo, (1) se puede detectar fácilmente la producción de anticuerpos en respuesta a la vacunación mediante métodos normalizados utilizados actualmente en laboratorios clínicos, por ejemplo, un ELISA; (2) se puede detectar la migración de células inmunitarias a los sitios de la inflamación rascando la superficie de la piel y colocando un recipiente estéril para capturar las células en migración sobre el sitio del rascado (Peters *et al.*, *Blood*, 72:1310-1315 (1988)); (3) se puede medir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica en respuesta a mitógenos o se puede medir una reacción con mezcla de linfocitos utilizando <sup>3</sup>H-timidina; (4) se puede medir la capacidad fagocítica de los granulocitos, macrófagos, y otros fagocitos en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) colocando PBMC en pocillos junto con partículas marcadas (Peters *et al.*, *Blood*, 72:1310-1315 (1988)); y (5) se puede medir la diferenciación de células del sistema inmunitario marcando PBMC con anticuerpos dirigidos a moléculas CD tales como CD4 y CD8 y midiendo la fracción de los PBMC que expresan estos marcadores.

40 Por conveniencia, las respuestas inmunitarias se describen a menudo en la presente divulgación como respuestas inmunitarias tanto "primarias" como "secundarias". Una respuesta inmunitaria primaria, que se describe también como una respuesta inmunitaria "protectora", se refiere a una respuesta inmunitaria producida en un individuo como resultado de alguna exposición inicial (por ejemplo, la "inmunización" inicial) a un antígeno concreto, por ejemplo, un receptor superficial celular, o un receptor activado de la integrina. Dicha inmunización se puede producir, por ejemplo, como resultado de alguna exposición natural al antígeno (por ejemplo, a partir de una infección inicial por algún patógeno que expone o presenta el antígeno) o a partir de un antígeno presentado por células cancerosas de algún tumor en el individuo. De forma alternativa, la inmunización se puede producir como resultado de la vacunación del individuo con una vacuna que contiene el antígeno.

50 Una respuesta inmunitaria primaria puede debilitarse o atenuarse con el tiempo y puede incluso desaparecer o al menos quedar tan atenuada que no se pueda detectar. De acuerdo con ello, la presente divulgación se refiere también a una respuesta inmunitaria "secundaria", que se describe también en el presente documento como una "respuesta inmunitaria de memoria". El término respuesta inmunitaria secundaria se refiere a una respuesta inmunitaria estimulada en un individuo después que se ha producido ya una respuesta inmunitaria primaria. De esta manera, se puede estimular una respuesta secundaria o inmunitaria, por ejemplo, para potenciar una respuesta inmunitaria existente que se debilitado o atenuado, o para recrear una respuesta inmunitaria anterior que bien ha desaparecido o bien ya no se puede detectar. Un agente que se puede administrar para estimular una respuesta inmunitaria secundaria se denomina después un "refuerzo" ya que puede decirse que el agente "refuerza" la respuesta inmunitaria primaria.

60 Como ejemplo, y no como limitación, se puede estimular una respuesta inmunitaria reintroduciendo en el individuo un antígeno que estimule la respuesta inmunitaria primaria (por ejemplo, readministrando una vacuna). Sin embargo, se puede estimular también una respuesta inmunitaria a un antígeno administrando otros agentes que no pueden contener el antígeno real. La respuesta inmunitaria secundaria o con memoria puede ser tanto una respuesta humoral (anticuerpo) como una respuesta celular. Se produce una respuesta humoral secundaria o con memoria tras la estimulación de los linfocitos B con memoria que se generaron en la primera presentación del antígeno. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) son un tipo de respuesta inmunitaria secundaria o con memoria celular que están mediadas por linfocitos CD4+. Una primera exposición a un antígeno da como resultado el cebado del sistema inmunitario y una exposición(ones) adicionales en una DTH.



De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona que un sujeto hospedador se inmunice con múltiples antígenos. En aspectos adicionales, el anticuerpo monoclonal es reactivo a múltiples antígenos.

"Reactividad cruzada inmunológicamente" o "inmunológicamente reactivo" se refiere a un reactivo que es específicamente reactivo con un anticuerpo que se ha generado utilizando el mismo antígeno ("inmunológicamente reactivo") o un antígeno diferente (reactividad cruzada inmunológicamente).

"Condiciones inmunológicamente reactivas" se refieren a condiciones que permiten que un anticuerpo, generado para un epítipo concreto de un antígeno, unirse a este epítipo en un grado mayor detectable del de un anticuerpo que se une sustancialmente al resto de los epítipos, generalmente al menos dos veces por encima de la unión al fondo, preferentemente al menos cinco veces por encima del fondo. Las condiciones inmunológicamente reactivas son dependientes del formato de la reacción de unión a anticuerpo y normalmente son las utilizadas en protocolos de inmunoensayo. Véase, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo.

"Célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, por oposición a las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ilustrativas incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T incluyendo linfocitos T citolíticos (LTC)), linfocitos citotóxicos, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos, y basófilos. Las células efectoras expresan receptores FE específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. Una célula efectora puede inducir citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Una célula efectora puede también fagocitar un antígeno diana, una célula diana, una célula cancerosa metastásica, o un microorganismo.

El término "antígeno" se refiere a una sustancia que indica la generación de anticuerpos y que puede producir una respuesta inmunitaria. Se puede utilizar de forma indistinta en la presente divulgación con el término "inmunógeno". En sentido estricto, los inmunógenos son aquellas sustancias que estimulan una respuesta del sistema inmunitario, mientras que los antígenos se definen como sustancias que se unen a anticuerpos específicos. Un antígeno o fragmento del mismo puede ser una molécula (es decir, un epítipo) que se pone en contacto con un anticuerpo concreto. Cuando se usa una proteína o un fragmento de una proteína para inmunizar un hospedador animal, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos (es decir, estimular la respuesta inmunitaria), que se une específicamente al antígeno (regiones concretas de estructuras tridimensionales de la proteína).

El término "epítipo" se refiere a un determinante de la proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten usualmente en agrupaciones de moléculas superficiales químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas secundarias de azúcares y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

Los ejemplos de los métodos utilizados para la producción de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se proporcionan en los EJEMPLOS 1-5. Estos ejemplos proporcionan los métodos generales usados para la producción de anticuerpos monoclonales.

Además, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*, 81:6851-6855 (1984)), cortando y empalmado los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de la especificidad de antígeno adecuada junto con los genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica adecuada. Por ejemplo, se pueden cortar y empalmar los genes procedentes de una molécula de anticuerpo de ratón específica de un autoinductor junto con los genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica adecuada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual las diferentes partes se derivan de especies animales distintas, tales como los que tienen una región variable derivada de mAb de murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

El término "anticuerpo de secuencia humana" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina procedentes de una línea germinal humana. Los anticuerpos de secuencia humana de la presente divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Dichos anticuerpos se pueden generar en animales transgénicos no humanos, por ejemplo, como se describe en las publicaciones de solicitud PCT con números WO 01/14424 y WO 00/37504. Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo de secuencia humana", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos donde las secuencias CDR derivadas de líneas germinales de otras especies de mamíferos, tales como ratón se hayan injertado sobre secuencias marco humanas (por ejemplo, anticuerpos humanizados).

El término "anticuerpo humanizado", se refiere a al menos una molécula de anticuerpo donde la secuencia de

aminoácidos en las regiones sin unión a antígeno se ha alterado de tal manera que el anticuerpo se asemeja más estrechamente a un anticuerpo humano, y sigue reteniendo su capacidad de unión original.

Además, se han desarrollado técnicas para la producción de anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos números 5.585.089 y 5.225.539). Una región variable de la cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina consiste en una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). En resumen, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos procedentes de especies no humanas que tienen una o más CDR procedentes de especies no humanas y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana.

En determinados aspectos de la presente divulgación, se producen anticuerpos humanizados. Para humanizar un anticuerpo derivado de una especie diferente, el anticuerpo se secuencian y las secuencias se introducen en una estructura de anticuerpo humano. Como determinadas secuencias son más fácilmente predecibles que otras para introducirse en la estructura humana, se puede seleccionar la lista de secuencias candidatas sobre la base de la facilidad de humanización.

En otros aspectos, las secuencias candidatas pueden introducirse directamente en una estructura humana, evitando de esta manera las etapas de clonación y expresión de la proteína natural no humanizada. La tecnología de animal humanizado es un método para crear anticuerpos monoclonales que no requiere la humanización. Los anticuerpos humanizados se producen creando un ratón transgénico cuyos loci de la Ig natural se sustituyen por los loci de la Ig humana correspondiente. El anticuerpo resultante es de esta manera humano y no requiere humanización. Sin embargo, este proceso sigue necesitando que se recupere un anticuerpo monoclonal con una propiedad deseada procedente del animal humanizado utilizando tanto técnicas tanto del hibridoma como de aislamiento de linfocitos B.

De forma alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios frente a un conjugado inmunógeno de la presente divulgación. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de la cadena pesada y la cadena ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido monocatenario. Se pueden preparar porciones Fab y F(ab')<sub>2</sub> de moléculas de anticuerpos mediante la reacción proteolítica de la papaína y la pepsina, respectivamente, sobre moléculas de anticuerpos sustancialmente intactas mediante métodos que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.342.566. Son también bien conocidas las porciones de moléculas del anticuerpo Fab', y se producen a partir de porciones de F(ab')<sub>2</sub> seguido por la reducción de enlaces disulfuro unidos a las dos porciones de la cadena pesada con mercaptoetanol, y seguido por la alquilación del mercaptano de la proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden unir a su correspondiente antígeno. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden unir a un antígeno correspondiente expresado sobre la superficie de una célula, en cuyo caso, la célula está destinada a una lisis inmunomediada. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención tienen una alta afinidad por sus antígenos correspondientes.

De acuerdo con algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para derivar anticuerpos monoclonales de un organismo inmunizado. El organismo puede ser un organismo experimental tratado con el antígeno y un adyuvante adecuado, o expuesto a un patógeno u otro agente biológico. El organismo puede ser también un paciente humano que padece de la exposición a un patógeno o a una enfermedad. Como el método requiere solamente pequeñas cantidades de sangre o tejido, el mismo organismo puede muestrearse múltiples veces.

El anticuerpo puede marcarse con al menos un radionucleido a fin de aumentar las dianas de los elementos infecciosos y/o enfermos *in vivo* en al menos una capacidad diagnóstica y/o terapéutica. El anticuerpo puede estar marcado con al menos una toxina y/o un reactivo quimioterapéutico. En particular, el anticuerpo marcado puede utilizarse como una inmunotoxina para dirigir mejor estos agentes tóxicos contra elementos infecciosos y/o enfermos.

Se apreciará que, una vez que las CDR de un anticuerpo están identificadas, se pueden usar técnicas de ingeniería genética convencionales para idear polinucleótidos expresables que codifican cualquiera de las formas o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento.

### **Adyuvantes**

Como es también bien conocido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición inmunógena concreta puede potenciarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes adecuados incluyen todos los compuestos inmunoestimuladores aceptables, tales como citoquinas, quimioquinas, cofactores, toxinas, plasmidios, composiciones sintéticas o los LEE o CEE que codifican dichos adyuvantes.

Los adyuvantes adecuados adicionales pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes: sales de aluminio

(alúmina), adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA), dipéptido de muramilo (MDP). Véase, por ejemplo, Ellouz *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 59:1317 (1974). Análogos sintéticos de MDP (véase, Chedid *et al.*, *Prog Allergy*, 25:63 (1978)), análogos de MDP incluyendo derivados de treonilo de MDP (Byars *et al.*, *Vaccine*, 5:223 (1987)), derivados de n-butilo de MDP (Chedid *et al.*, *Infect Immun*, 35:417), y un derivado lipófilo de un tripéptido de muramilo (Gisler *et al.*, en *Immunomodulations of Microbial Products and Related Synthetic Compounds*, 167 (1981)). Compuestos MDP, tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE). Los adyuvantes adicionales incluyen MF59 (véase, por ejemplo, Ott *et al.*, "MF59-Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, 277-296 (1995)). QS21 es otro adyuvante que ha mostrado tener una actividad biológica significativa (Kensil *et al.*, (1991); Wu *et al.*, (1992); White *et al.*, (1991) y White *et al.*, *Adv Exp Med Biol*, 303:207-210 (1991)). Los adyuvantes adicionales incluyen saponina (Kensil *et al.*, *J Immunol*, 148:1519-1525 (1992); y Kensil *et al.*, *J Immunol*, 146:431-437 (1991)). Otros adyuvantes adicionales de acuerdo con los presentes métodos incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, interferón- $\gamma$ , GMCSF, BCG, Resiquimod (R-848), hidróxido de aluminio, lípido A, y monofosforil lípido A (MPL). Se contempla también RIBI, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión al 2 % de escualeno/Tween 80.

### Ausencia de preinmunización

En otro aspecto, los presentes métodos se pueden llevar a cabo en la ausencia de datos de preinmunización. Por ejemplo, este método es útil cuando no están disponibles muestras de suero preimmune tal como puede ser el caso de un ser humano que se expone a un patógeno. En estas condiciones, se van a usar datos de frecuencias de secuencias posteriores a la infección para derivar una lista de secuencias de anticuerpos candidatas ya que el número de plasmacitos en circulación disminuirá significativamente. Esta técnica es particularmente útil para la generación rápida de anticuerpos durante epidemias.

### Generación de anticuerpos contra antígenos múltiples relacionados

En determinados aspectos de la presente divulgación, se proporcionan especies de antígenos diferentes pero relacionadas al hospedador después de múltiples refuerzos. Los anticuerpos se seleccionan posteriormente por reactividad cruzada entre múltiples antígenos, tales como pueden requerirse para determinadas aplicaciones. Por ejemplo, puede ser deseable crear anticuerpos frente a una familia de proteínas derivadas de patógenos, o un conjunto de proteínas diseñadas sintéticamente. En el EJEMPLO 5, más adelante, se muestra que múltiples secuencias del dominio variable y la cadena pesada de IgG estuvieron presentes en el brazo 3 y el brazo 5 del experimento en agrupaciones de alta significancia. La presencia de secuencias idénticas significantes entre las muestras indica que existe un nivel de solapamiento entre diferentes animales en la generación de anticuerpos contra un antígeno común. Por tanto, pueden encontrarse anticuerpos contra epítopos compartidos a través de múltiples antígenos relacionados inmunizando antígenos relacionados en cohortes separadas y comparando las secuencias inducidas entre las cohortes. De acuerdo con ello, un único animal puede reforzarse con antígenos diferentes, pero relacionados, a fin de determinar si existen conjuntos de secuencias relacionadas que son inducidas tras cada refuerzo. De esta manera, un aspecto de la presente divulgación proporciona anticuerpos que tienen mayor reactividad que un antígeno, especialmente cuando los antígenos están relacionados.

### Antígenos de selección negativa

En determinados aspectos de la presente divulgación se puede llevar a cabo un refuerzo final con un antígeno de fondo, para el cual no es deseable tener anticuerpos dirigidos contra el mismo. En este caso, los datos de MPSS procedentes de una inmunización posterior del antígeno de fondo se usan para seleccionar candidatos de anticuerpos no deseados. Por ejemplo, se pueden utilizar un epítipo sintético o una estructura de proteína para ayudar en la creación del antígeno, de tal manera que el mismo epítipo o estructura podrían introducirse en el antígeno de fondo. En este caso, las secuencias del anticuerpo candidatas correspondientes al conjunto de datos de fondo se eliminan de la lista de secuencias de anticuerpos.

De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para administrar un antígeno de fondo y seleccionarlo frente a anticuerpos que son reactivos al antígeno de fondo. En otros aspectos, el antígeno de fondo se administra después de un primer antígeno.

### Aislamiento de linfocitos

Una vez que el hospedador se ha inmunizado, se pueden aislar linfocitos de sangre en circulación u otros tejidos según sea adecuado. Son bien conocidos en la materia diversos métodos para aislar linfocitos, por ejemplo, se pueden aislar linfocitos de sangre periférica humana mediante centrifugación en gradiente de densidad normalizada, aféresis, selección negativa (por ejemplo, eliminando glóbulos rojos utilizando anticuerpos específicos de glóbulos rojos o mediante lisis osmótica de glóbulos rojos seguida por lavado en PBS) o cualquier otro medio adecuado conocido en la materia.

En algunos aspectos, los linfocitos B se aíslan de otros linfocitos sanguíneos mediante técnicas de selección positiva

o negativa. Los ejemplos de reactivos para aislar linfocitos B incluyen anticuerpos conjugados para la selección positiva tales como anticuerpos dirigidos contra CD19 y pluralidades de anticuerpos conjugados para selección negativa tales como anti-CD2, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD56, cócteles de anticuerpos dirigidos contra la glicoforina A, donde los anticuerpos se conjugan con un soporte adecuado.

5 En otro aspecto, se pueden aislar linfocitos B específicos de antígenos, utilizando una forma biotinilada del monómero unido a una perla inmunomagnética. En un aspecto adicional, se utiliza la clasificación celular para aislar linfocitos B deseados, tales como linfocitos B con memoria. Un método de clasificación que se puede utilizar de acuerdo con la presente divulgación es un método de clasificación que utiliza perlas magnéticas, tales como las producidas por Dynal o Miltenyi. Otro método de selección de linfocitos B que se puede utilizar es la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Como los linfocitos B con memoria tienen inmunoglobulina en su superficie, se puede utilizar esta especificidad para identificar y capturar estas células. Opcionalmente, las perlas pueden estar revestidas con un antígeno de interés y unidas a una columna. Los linfocitos B con inmunoglobulina sobre su superficie se pueden identificar mediante FACS así como mediante unión al antígeno. En determinados aspectos, los linfocitos B se seleccionan biotinilando en primer lugar inmunógenos que se unen a receptores de linfocitos B específicos que se encuentran en la superficie de linfocitos B específicos para el monómero. A continuación se pueden usar perlas para clasificación celular revestidas contra biotina (MAC) activadas de forma magnética para aislar linfocitos B unidos a columnas magnéticas.

## 20 **Aislamiento de ARNm**

En la presente divulgación, se usan ARNm derivados de un pequeño número de linfocitos o linfocitos B. Los ARNm se extraen de linfocitos aislados o linfocitos B aislados. Los ADNc se sintetizan utilizando los ARNm extraídos como plantilla para obtener una biblioteca de ADNc. Los kits comercialmente disponibles se usan convenientemente para extraer los ARNm y para construir la biblioteca de ADNc. Se puede aislar el ARN celular total de una muestra biológica tal como los linfocitos aislados, o de manera alternativa, los linfocitos B aislados, utilizando cualquier técnica adecuada tal como el método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo descrito por Chomczynski y Sacchi (*Anal Biochem*, 162:156-159 (1987)). Una parte del ARN total comprende moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada o ligera completa de anticuerpos producidos en respuesta a un inmunógeno.

30 En algunos aspectos, las moléculas de ácidos nucleicos se aíslan de linfocitos o linfocitos B derivados de un sujeto inmunizado. Son bien conocidos en la técnica los métodos para aislar el ARNm que codifica un anticuerpo. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* El ARNm se puede usar para producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en la clonación del ADNc de los genes del anticuerpo. En otro aspecto, el ácido nucleico se aísla de un animal no humano no transgénico. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de un animal no humano no transgénico se pueden usar, por ejemplo, en anticuerpos humanizados.

## **Producción y amplificación del ADNc**

40 En determinados aspectos, se usa el ARNm de una muestra biológica para producir ADNc a partir de una muestra mediante transcripción inversa utilizando al menos un cebador; amplificar el ADNc producido de esta manera utilizando polinucleótidos como cebadores de sentido directo y de sentido contrario para amplificar los ADNc anteriores; y detectar la presencia del ADNc amplificado. En aspectos adicionales, la secuencia del ADNc amplificado se puede determinar mediante cualquier método adecuado.

45 Son bien conocidos en la técnica numerosos métodos para amplificar y/o detectar la presencia de polinucleótidos y se pueden emplear en la práctica de los presentes métodos. Por ejemplo, se puede usar la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para amplificar secuencias que codifican las regiones conservadas procedentes del ARN obtenido a partir de una variedad de fuentes de células o tejidos o líneas celulares. En la práctica de la invención, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos o los ácidos nucleicos modificados se pueden reproducir mediante, por ejemplo, amplificación. Los métodos de amplificación incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa PCR (PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) y PCR STRATEGIES, ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., reacción en cadena de la ligasa (LCR) (1995) (véase, por ejemplo, Wu, *Genomics*, 4:560 (1989); Landegren, *Science*, 241:1077 (1988); Barringer, 89:117 (1990)); amplificación de la transcripción (véase, por ejemplo, Kwok, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:1173 (1989)); y, replicación autosostenida de la secuencia (véase, por ejemplo, Guatelli, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:1874 (1990)); amplificación de la replicasa Q Beta (véase por ejemplo, Smith, *J Clin Microbiol*, 35:1477-1491 (1997)), ensayo de amplificación automatizado de la replicasa Q-beta (véase, por ejemplo, Burg, *Mol Cell Probes*, 10:257-271 (1996)) y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véase también Berger, *Methods Enzymol*, 152:307-316 (1987); Sambrook; Ausubel; patentes de Estados Unidos números 4.683.195 y 4.683.202; Sookninan, *Biotechnology*, 13:563-564 (1995).

65 Son bien conocidos en la técnica los métodos para diseñar y usar cebadores para la RT-PCR y un experto en la materia puede llevarlas a cabo fácilmente. Se puede diseñar cualquier número de combinaciones de sondas de sentido directo y sentido contrario adecuadas a partir de una secuencia de nucleótidos y utilizarse para este fin.

En determinados aspectos, los linfocitos B se aíslan a partir de otros linfocitos sanguíneos mediante técnicas de selección positiva o negativa antes de generar la muestra de ARNm. Adicionalmente, se puede aplicar una etapa de amplificación lineal para crear una muestra de secuenciación más representativa, por ejemplo, se pueden colocar sitios para la ARN polimerasa T7 en el cebador de ADNc a fin de crear más ARNm correspondiente a la región de  
5 cadena pesada de Ig utilizando la ARN polimerasa T7, que se puede usar a continuación para la creación del ADNc y la PCR.

### Secuenciación

10 Los métodos de la presente divulgación no están limitados a ningún método de secuenciación concreto, sino que se pueden usar junto con esencialmente cualquier metodología de secuenciación que se base en la incorporación sucesiva de nucleótidos a una cadena de polinucleótidos. Las técnicas adecuadas incluyen, por ejemplo, Pyrosequencing™, FISSEQ (secuenciación fluorescente *in situ*), MPSS (secuenciación masiva paralela de firmas), y métodos de secuenciación basados en litigios, algunos de los cuales se describen con más detalle a continuación.

15 De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para secuenciar los anticuerpos monoclonales de alta afinidad. En aspectos adicionales, las frecuencias relativas de las secuencias de los anticuerpos diana se analizan utilizando un algoritmo de software bioinformático. En otros aspectos adicionales, las secuencias de ADNc diana amplificadas se secuencian mediante secuenciación masiva paralela de firmas  
20 (MPSS).

En un aspecto de la presente divulgación, se usan métodos de secuenciación masiva paralela para la identificación y cuantificación de las secuencias de nucleótidos. Adicionalmente, el método presenta preferentemente un intervalo amplio, dinámico y de alta sensibilidad que permite la cuantificación especies tanto muy abundantes como raras. Se prefiere también un método que proporciona una medida absoluta de la abundancia, en lugar de la cuantificación  
25 relativa en forma de una relación con respecto a un gen constitutivo o normalizante. La abundancia absoluta facilita la comparación de las abundancias de nucleótidos entre muestras y entre experimentos y permite que los datos de diferentes ciclos se "almacenen" en una base de datos y se comparen directamente. Finalmente, para permitir el descubrimiento de nuevas secuencias de nucleótidos, el método proporciona preferentemente una lectura directa de la secuencia, y es independientemente del conocimiento previo de la secuencia. Se han descrito algunos métodos para el análisis de la secuencia de nucleótidos que demuestran una o más de estas características de comportamiento.

30 Los métodos de secuenciación de Mermod *et al.* (publicación de solicitud PCT N.º WO 00/18957) y Adessi *et al.*, Nucleic Acids Res, 28(20):e87 (2000)) pueden utilizarse también de acuerdo con la presente divulgación. Estos autores han descrito un método de PCR en fase sólida donde colonias de ADN muy multiplexadas derivadas de fragmentos de un ADN individual se crean sobre la superficie de un soporte sólido. En este método, parejas de cebadores y moldes que contienen sitios de cebado universales se inmovilizan sobre la superficie de un porta de vidrio funcionalizado a una densidad adecuada para la generación de colonias discretas. Se produce la amplificación  
40 de los moldes mediante la extensión del cebador en un proceso denominado "amplificación de puente" para crear aproximadamente dos mil copias de cada molde por colonia. Se pretende que este método dé como resultado colonias a una densidad de millones de características por mm<sup>2</sup>, que es adecuado para el análisis amplio del genoma. Se puede llevar a cabo el análisis de las secuencias de las colonias mediante métodos tradicionales, tales como secuenciación mediante adición o MPSS.

45 Leamon *et al.*, han descrito un método de amplificación de ADN genómico muy multiplexado en una plataforma basada en una placa con un volumen bajo que es también aplicable a la presente divulgación. Los productos de la PCR derivados de fragmentos genómicos se unen a perlas en fase sólida, y se lleva a cabo la secuenciación de los fragmentos mediante síntesis utilizando la tecnología Pyrosequencing™. Dicha tecnología es aplicable a la presente  
50 divulgación.

Otros métodos de secuenciación adecuados incluyen secuenciación con polonio multiplexado (como se describe en Shendure *et al.*, Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome, Scienceexpress, 4 de agosto de 2005, pg 1 disponible en [www.scienceexpress.org/4 Aug. 2005/Page1/10.1126/science.1117389](http://www.scienceexpress.org/4_Aug_2005/Page1/10.1126/science.1117389)), que emplea microperlas inmovilizadas, y secuenciación en reactores de picolitros microfabricados (como se describe en Margulies *et al.*, Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors, Nature, agosto de 2005, disponible en [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature) (publicado online 31 de julio de 2005, doi:10.1038/nature03959)). En determinados aspectos de la presente divulgación, uno cualquiera de estos métodos se puede usar para secuenciar los vectores de ADNc y obtener datos de secuencias sobre las secuencias de ARN aisladas.

### 60 Secuenciación masiva paralela de firmas (MPSS)

En determinados aspectos de la presente divulgación, se usó MPSS para la secuenciación del ADNc. Cuando se usa MPSS, una única especie de ADN se une a una perla soporte sólido. Se crean millones de estas perlas usando  
65 PCR en emulsión. Las perlas se introducen en una cámara y se someten a múltiples ciclos de secuenciación pirógena, que es una química que permite a las perlas emitir fluorescencia dependiendo de qué base se encuentra a

continuación en la secuencia. Durante cada ciclo, las perlas se fotografían mediante una cámara CCD sensible y, de esta manera, se deduce la secuencia del ADN de cada perla. El resultado es que se pueden producir millones de secuencias en un único ciclo. Hasta recientemente, la longitud de estas lecturas de secuencias era solo de 20 a 30 bases. La química más nueva permite ahora lecturas en el intervalo de 400 bases, tales como en el caso con la tecnología de titanio 454 de Roche. Estos métodos de lectura más largos permiten la generación de millones de secuencias con una longitud de 400 bases en paralelo, que es una longitud suficiente para cubrir la región completa del dominio variable de las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de Ig. Además, este tipo de secuenciación no requiere grandes cantidades de material de partida. Por ejemplo, la longitud de un ciclo de lectura de MPSS requiere solo 250 nanogramos de ADN.

Tras la hibridación, se inmoviliza un mínimo de un millón de perlas en una celda de flujo para determinar la bioquímica y la formación de imágenes de la secuenciación. La secuencia de firma en cada perla se determina en paralelo. El novedoso proceso de secuenciación implica exponer repetidamente cuatro nucleótidos mediante digestión enzimática, ligar una familia de adaptadores codificados, y decodificar la secuencia mediante hibridación secuencial con sondas decodificadoras fluorescentes.

El proceso de secuenciación MPSS está completamente automatizado. Se administran tampones y reactivos a las perlas de la celda de flujo mediante una plataforma de instrumentación patentada, y las respuestas fluorescentes dependientes de secuencia procedentes de las microperlas se registran mediante una cámara CCD después de cada ciclo.

Los datos de MPSS tienen muchos usos. Los niveles de expresión de casi todos los transcritos poliadenilados se pueden determinar cuantitativamente; la abundancia de las firmas es representativa del nivel de expresión del gen en el tejido analizado. Los métodos cuantitativos para el análisis de las frecuencias de las etiquetas y la detección de diferencias entre bibliotecas se han publicado e incorporado a bases de datos públicas para los datos SAGE™ y son aplicables a los datos de MPSS. La disponibilidad de secuencias completas del genoma permite la comparación directa de firmas de secuencias genómicas y amplía además la utilidad de los datos de MPSS. Como las dianas del análisis de MPSS no están preseleccionadas (de manera similar a una micromatriz), los datos de MPSS pueden caracterizar la complejidad global de los transcriptomas, y se pueden usar para el "descubrimiento de genes". Esto es análogo a los millones de secuenciaciones de EST en una vez, pero la corta longitud de las firmas de MPSS hace que esta solución sea más útil en organismos para los cuales están disponibles los datos de las secuencias genómicas, de tal manera que la fuente de la firma de MPSS pueda identificarse fácilmente por medios informáticos.

Se puede obtener información adicional con respecto a la tecnología MPSS revisando las muchas publicaciones de este tema, incluyendo las patentes de Estados Unidos números 6.013.445, 5.846.719 y 5.714.330.

En un aspecto de la presente divulgación, la región del dominio variable de la cadena pesada de un isotipo específico de un anticuerpo se usa para crear una biblioteca de MPSS y se somete a secuenciación MPSS. La muestra puede tomarse de linfocitos o linfocitos B aislados que se encuentran en la sangre en circulación u otro tejido adecuado. Para aplicar la tecnología de secuenciación de MPS, las etiquetas específicas de secuencias de ADN deben colocarse en cualquier extremo de la región de los ADN que se van a secuenciar. Esto se pueden llevar a cabo creando un ADNc a partir de un ARNm procedente de linfocitos B utilizando transcriptasa inversa, y a continuación se aplica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores con las secuencias específicas del isotipo adecuados y las etiquetas MPSS para generar la biblioteca de ADN.

El método MPSS implica cantidades significativas de análisis digitales. Como resultado, se puede realizar una sustracción y análisis de secuencias perfecto, en oposición a los métodos físicos que están siempre sujetos a imperfecciones y contaminación. También, a diferencia de los métodos físicos, la técnica del análisis digital puede alterarse y aplicarse varias veces sin la necesidad de muestras físicas adicionales.

Se puede producir información más precisa acerca de las secuencias del anticuerpo candidato mediante un muestreo más frecuente utilizando MPSS. Las muestras pueden tomarse como la respuesta del organismo que decae hasta los niveles de fondo y para establecer el fondo antes del siguiente refuerzo. Otra ventaja de los puntos de datos múltiples es que se pueden generar datos de maduración por afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más anticuerpos muy relacionados con un anticuerpo detectado en una muestra previa pueden aparecer con el tiempo, lo que representa una línea de linfocitos B que ha experimentado maduración por afinidad. Los anticuerpos madurados por afinidad tienen mayor afinidad por la secuencia diana que la secuencia parenteral, de tal manera que pueda ser deseable la identificación de estas secuencias.

En determinados aspectos, la lista de las secuencias candidatas puede cambiarse aplicando filtros basados en la secuencia de ADN o la secuencia de proteína prevista. Por ejemplo, si están presentes restos cisteína adicionales en la secuencia, lo que se considera como posible que cree dificultades potenciales en la fabricación de la proteína, dichas secuencias podrían eliminarse de la lista de secuencias del anticuerpo candidato. Podrían utilizarse también otras propiedades de las secuencias de proteínas previstas, tales como la presencia o ausencia de restos cargados, o la conformación de modelos de secuencias de anticuerpos convencionales.

## Ácidos nucleicos

De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica: al menos una cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento del mismo como se ha identificado mediante los presentes métodos y/o al menos una cadena ligera de un anticuerpo, como se ha identificado mediante los presentes métodos. En otros aspectos, la presente divulgación proporciona también variantes, mutantes o fragmentos de los ácidos nucleicos aislados.

De acuerdo con aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo identificado de acuerdo con los presentes métodos y una célula hospedadora que comprende el vector de expresión. En particular, los vectores pueden comprender, pero no de forma limitativa, vectores lentivíricos, vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, vectores de virus adenoasociados y vectores del virus del herpes simple. Más en particular, se pueden usar vectores retrovíricos para la administración de las construcciones, tanto *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

## Técnicas de ácidos nucleicos recombinantes

Los ácidos nucleicos utilizados para llevar a la práctica la presente invención, tanto ARN, ARNip, ácido nucleico de sentido contrario, ADNc, vectores de ADN genómico, virus o híbridos de los mismos, se pueden aislar de una variedad de fuentes, amplificarse mediante ingeniería genética, y/o expresarse/generarse de manera recombinante. Los polipéptidos recombinantes generados a partir de estos ácidos nucleicos pueden aislarse o clonarse individualmente y someterse a ensayo para determinar una actividad deseada. Se puede usar cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo sistemas de expresión de células bacterianas, de mamíferos, levaduras, insectos o plantas.

De forma alternativa, estos ácidos nucleicos se pueden sintetizar *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe en, por ejemplo, Adams, J Am Chem Soc, 105:661 (1983); Belousov, Nucleic Acids Res, 25:3440-3444 (1997); Frenkel, Free Radic Biol Med, 19:373-380 (1995); Blommers, Biochemistry, 33:7886-7896 (1994); Narang, Meth Enzymol, 68:90 (1979); Brown, Meth Enzymol, 68:109 (1979); Beaucage, Tetra Lett, 22:1859 (1981); patentes de Estados Unidos N.º 4.458.066.

Las técnicas de manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, subclonación, sondas de marcado (por ejemplo, marcado aleatorio de cebadores usando polimerasa Klenow, traducción de muescas, amplificación), secuenciación, hibridación, y similares están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (3ª ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (2001); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY; Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Se pueden analizar ácidos nucleicos, vectores, cápsidas, polipéptidos, y similares y cuantificarse mediante cualquiera de numerosos medios generales bien conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen, por ejemplo, métodos de bioquímica analítica, tales como RMN, espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), y cromatografía por hiperdifusión, diversos métodos inmunológicos, por ejemplo, reacciones de precipitación en fluido o gel, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, análisis de transferencia Southern, análisis de transferencia Northern, análisis de inmunotransferencia, electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE), métodos de amplificación de ácidos nucleicos o la diana o la señal, radio marcado, recuento por centelleo, y cromatografía de afinidad.

La obtención y manipulación de ácidos nucleicos utilizados para practicar los métodos de la presente divulgación se pueden llevar a cabo por clonación de las muestras genómicas y, si se desea, seleccionar y volver a clonar las inserciones aisladas o amplificadas procedentes, por ejemplo, de clones genómicos o clones de ADNc. Las fuentes de ácidos nucleicos usados en los métodos de la presente divulgación incluyen bibliotecas genómicas o de ADNc contenidas en, por ejemplo, cromosomas artificiales de mamíferos (MAC), véase, por ejemplo patentes de Estados Unidos números 5.721.118; 6.025.155; cromosomas artificiales humanos, véase, por ejemplo, Rosenfeld, Nat Genet, 15:333-335 (1997); cromosomas artificiales de levaduras (YAC); cromosomas artificiales bacterianos (BAC); cromosomas artificiales P1, véase, por ejemplo, Woon, Genomics, 50:306-316 (1998); vectores derivados de P1 (PAC), véase, por ejemplo, Kern, Biotechniques, 23:120-124 (1997); cósmidos, virus recombinantes, fagos o plásmidos.

La presente divulgación proporciona proteínas de fusión y ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo que se ha identificado mediante los presentes métodos. Se puede fusionar un anticuerpo con un péptido o polipéptido heterólogo tal como péptidos identificativos en el extremo N que transmiten características deseadas, tales como mayor estabilidad o purificación simplificada. Los péptidos y los polipéptidos de la presente divulgación pueden sintetizarse y expresarse también como proteínas de fusión con uno o más dominios adicionales unidos a las

anteriores para, por ejemplo, producir un péptido más inmunógeno, para aislar más fácilmente un péptido sintetizado de forma recombinante, para identificar y aislar anticuerpos y linfocitos B que expresan anticuerpos, y similares. Los dominios que facilitan la detección y purificación incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes metálicos, tales como tramos de polihistidina y módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación de metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de extensión/purificación por afinidad FLAGS (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri). La inclusión de secuencias enlazadoras escindibles tales como el Factor Xa o la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego Calif.) entre un dominio de purificación y el péptido que comprende el motivo o el polipéptido para facilitar la purificación. Por ejemplo, un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un epítipo unida a seis restos de histidina seguido por una tiorredoxina y un sitio de escisión de la enteroquinasa (véase por ejemplo, Williams, *Biochemistry*, 34:1787-1797 (1995); Dobeli, *Protein Expr Purif*, 12:404-414 (1998)). Los restos de histidina facilitan la detección y la purificación mientras que el sitio de escisión de la enteroquinasa proporciona un medio para purificar el epítipo del resto de la proteína de fusión. En un aspecto, un ácido nucleico que codifica un polipéptido se ensambla en una fase adecuada con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción del polipéptido traducido o un fragmento del mismo. La tecnología específica de los vectores que codifican las proteínas de fusión y la aplicación de las proteínas de fusión está bien descrita en la bibliografía científica y de patentes, véase por ejemplo, Kroll, *DNA Cell Biol*, 12:441-53 (1993).

En algunos aspectos, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio  $V_H$  de la presente divulgación unido en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de la cadena pesada procedente de cualquier fuente. De forma similar, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo como se ha identificado mediante los presentes métodos puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio  $V_L$  de la presente divulgación unido en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de la cadena ligera procedente de cualquier fuente.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de las cadenas pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ) se "convierten" en genes de anticuerpos de longitud completa. En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios  $V_H$  o  $V_L$  se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa mediante su inserción en un vector de expresión que codifica ya los dominios constantes de la cadena pesada ( $C_H$ ) o de la cadena ligera ( $C_L$ ), respectivamente, de tal manera que el segmento  $V_H$  está unido operativamente al(a los) segmento(s)  $C_H$  del vector, y el segmento  $V_L$  está unido operativamente al segmento  $C_L$  del vector. En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa uniendo, por ejemplo, por ligadura, una molécula de ácido nucleico que codifica dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  a una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio  $C_H$  y/o  $C_L$  utilizando técnicas biológicas moleculares normalizadas. Se conocen en la técnica las secuencias de ácidos nucleicos de los genes del dominio constante de la inmunoglobulina de la cadena pesada y la cadena ligera humanas. Véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., NIH Publ. N° 91-3242 (1991). A continuación, las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y/o ligera de longitud completa se pueden expresar desde una célula donde se hayan introducido, y aislarse el anticuerpo monoclonal concreto.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden usar para expresar de forma recombinante grandes cantidades de anticuerpos monoclonales. Las moléculas de ácidos nucleicos se pueden usar también para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monocatenarios, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe adicionalmente a continuación. Si las moléculas de ácido nucleico se derivan de un animal no humano no transgénico, las moléculas de ácido nucleico se pueden usar para la humanización de anticuerpos, también como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación se usa como sonda o cebador de la PCR para una secuencia de anticuerpos específica. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede usar como sonda en métodos diagnósticos o como cebador de la PCR para amplificar regiones de ADN que podrían utilizarse, *inter alia*, para aislar moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican dominios variables de anticuerpos concretos. En algunos aspectos, las moléculas de ácidos nucleicos son oligonucleótidos. En algunos aspectos, los oligonucleótidos proceden de regiones muy variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de interés.

### Elementos de control transcripcional

Los ácidos nucleicos, como aspectos de la presente divulgación, pueden unirse operativamente a un promotor. Un promotor puede ser un motivo o una matriz de secuencias control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Un promotor puede incluir las secuencias de ácidos nucleicos próximas al sitio de inicio de la transcripción tal como, en el caso de la polimerasa de tipo II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales que pueden estar localizados a una distancia incluso de varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está bajo regulación ambiental o de desarrollo. Un promotor "específico de tejido" es activo en



determinados tipos de tejidos de un organismo, pero no en otros tipos de tejidos del mismo organismo. El término "unido de manera operativa" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o una matriz de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la expresión de la secuencia control dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

### Vectores de expresión y vehículos de clonación

Algunos aspectos de la presente divulgación proporcionan vectores de expresión y vehículos de clonación que comprenden ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, secuencias que codifican las proteínas de la divulgación. Los vectores de expresión y los vehículos de clonación pueden comprender partículas víricas, baculovirus, fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmidos, cromosomas artificiales bacterianos, ADN vírico (por ejemplo, vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, pesudorrabia y derivados de SV40) cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levaduras, cromosomas artificiales de levaduras, y cualesquiera otros vectores específicos de hospedadores de interés específicos (tales como bacilos, Aspergillus y levaduras). Los vectores pueden incluir secuencias cromosómicas, no cromosómicas y secuencias de ADN sintéticas. Los expertos en la materia conocen grandes cantidades de vectores adecuados, y están comercialmente disponibles.

Los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden clonarse, si se desea, en cualquiera de una variedad de vectores utilizando métodos biológicos moleculares rutinarios; los métodos para la clonación *in vitro* de ácidos nucleicos amplificados se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.426.039. Para facilitar la clonación de las secuencias amplificadas, los sitios de la enzima de restricción pueden "incorporarse" a una pareja de cebadores de la PCR.

La presente divulgación proporciona bibliotecas de vectores de expresión que codifican polipéptidos y péptidos de la divulgación. Estos ácidos nucleicos pueden introducirse en un genoma o en el citoplasma o en un núcleo de una célula y expresarse mediante una variedad de técnicas convencionales, bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Roberts, Nature, 328:731 (1987); Schneider, Protein Expr Purif, 6435:10 (1995); Sambrook, Tijssen o Ausubel. Los vectores pueden aislarse de fuentes naturales, obtenerse de fuentes tales como las bibliotecas de la ATCC o del GenBank, o prepararse mediante métodos sintéticos o recombinantes. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden expresarse en casetes de expresión, vectores o virus, que se expresan de forma estable o transitoria en células (por ejemplo, sistemas de expresión episómicos). Se pueden incorporar marcadores de selección en casetes y vectores de expresión para conferir un fenotipo seleccionable en células y secuencias transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar el mantenimiento y la replicación episómica de tal manera que no se requiere la integración en el genoma hospedador.

En un aspecto, los ácidos nucleicos de la presente divulgación se administran *in vivo* para la expresión *in situ* de los péptidos o polipéptidos de la presente divulgación. Los ácidos nucleicos se pueden administrar como "ADN puro" (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 5.580.859) o en la forma de un vector de expresión, por ejemplo, un virus recombinante. Los ácidos nucleicos pueden administrarse mediante cualquier ruta, incluyendo peritumoral o intratumoral, como se describe a continuación. Los vectores administrados *in vivo* se pueden derivar de genomas víricos, incluyendo virus de ADN y ARN encapsulados y no encapsulados modificados de forma recombinante, seleccionados preferentemente de baculoviridae, parvoviridae, picornoviridae, herpesviridae, poxyiridae, adenoviridae, o picornnaviridae. Se pueden emplear también vectores quiméricos que aprovechan los méritos ventajosos de cada una de las propiedades del vector progenitor (Véase por ejemplo, Feng, Nature Biotechnology, 15:866-870 (1997)). Dichos genomas víricos pueden modificarse mediante técnicas de ADN recombinante para incluir los ácidos nucleicos de la presente divulgación; y se pueden diseñar adicionalmente mediante ingeniería genética para que sean deficientes para replicación, tengan una replicación condicional o sean competentes para la replicación. En aspectos alternativos, los vectores se derivan de genomas adenovíricos (por ejemplo, vectores incompetentes para la replicación derivados del genoma de adenovirus humano, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 6.096.718; 6.110.458; 6.113.913; 5.631.236); genomas víricos adenoasociados y genomas retrovíricos. Los vectores retrovíricos pueden incluir aquellos basados en el virus de la leucemia de murino (VLMu), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y combinaciones de los mismos; véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 6.117.681; 6.107.478; 5.658.775; 5.449.614; Buchscher, J Virol, 66:2731-2739 (1992); Johann, J Virol, 66:1635-1640 (1992). Se pueden usar vectores basados en virus adenoasociados (VAA) para radioinmunizar células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos y en procedimientos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*; véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 6.110.456; 5.474.935; Okada, Gene Ther, 3:957-964 (1996).

El término "casete de expresión" se refiere a una secuencia de nucleótidos que puede alterar la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia que codifica una proteína, tal como un polipéptido de la presente divulgación) en un hospedador compatible con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos un promotor unido operativamente a la secuencia de codificación del polipéptido; y, opcionalmente, a otras secuencias, por ejemplo, señales de terminación de la transcripción. Se pueden usar también factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, por ejemplo, potenciadores.

Un ácido nucleico está "unido de manera operativa" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador se une operativamente a una secuencia de codificación si altera la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de la transcripción, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, cuando es necesario, unen las regiones de codificación de dos proteínas, contiguas y en marco de lectura. Para las secuencias intercambiadas, unido operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar la recombinación por intercambio. De esta manera, los casetes de expresión incluyen también plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector de "ADN puro", y similares.

Se pretende que el término "vector" se refiera a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, al que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora donde se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y se replican por tanto junto con el genoma hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están operativamente unidos. Dichos vectores se denominan en el presente documento como "vectores de expresión recombinante" (o sencillamente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas del ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar de manera indistinta ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la presente divulgación dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectivos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados) que sirven para funciones equivalentes.

#### **Células hospedadoras y células transformadas**

La presente divulgación también proporciona una célula transformada que comprende una secuencia de ácido nucleico de la divulgación, por ejemplo, una secuencia que codifica un polipéptido de la divulgación, o un vector de la divulgación. La célula hospedadora puede ser cualquiera de las células hospedadoras familiares para los expertos en la materia, incluyendo células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levaduras, células de mamíferos, células de insectos, o células vegetales. Las células bacterianas ilustrativas incluyen *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies comprendidas en los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*. Las células de insectos ilustrativas incluyen *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células de animales ilustrativas incluyen CHO, COS o melanoma de Bowes o cualquier línea celular de ratón o ser humano. La selección de un hospedador adecuado está comprendida en las capacidades de los expertos en la materia.

Se puede introducir el vector en las células hospedadoras utilizando cualquiera de una variedad de técnicas, incluyendo la transformación, transfección, transducción, infección vírica, pistolas génicas, o transferencia génica mediada por Ti. Los métodos particulares incluyen transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación.

Se pueden cultivar células hospedadoras diseñadas mediante ingeniería genética en un medio nutriente convencional modificado según sea adecuado para activar promotores, seleccionar transformante o amplificar los genes de la presente divulgación. Tras la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el crecimiento de la cepa hospedadora a una densidad celular adecuada, se puede inducir el promotor seleccionado mediante los medios adecuados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y se pueden cultivar las células durante un periodo adicional para permitirles producir el polipéptido deseado o un fragmento del mismo.

Se pueden recoger las células mediante centrifugación, romperse mediante medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se retiene para purificación adicional. Las células microbianas empleadas para la expresión de las proteínas se pueden romper mediante cualquier método conveniente, incluyendo criocongelación, ciclación, sonicación, perturbación mecánica, o uso de agentes lisantes de células. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia. El polipéptido o fragmento expresado se puede recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos que incluyen sulfato de amonio o precipitación con etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatito y cromatografía con lectina. Se pueden usar etapas de replegado de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración del polipéptido. Si se desea, se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas finales de purificación.

Se pueden emplear también diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono y otras líneas de células capaces de expresar proteínas a partir de un vector compatible, tales como las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK.

Las construcciones en las células hospedadoras se pueden usar de manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos producidos por las células hospedadoras que contienen el vector se pueden glicosilar, o no. Los polipéptidos de la presente divulgación pueden también incluir o no incluir un resto inicial del aminoácido metionina.

Se pueden emplear también sistemas de traducción exentos de células para producir un polipéptido de la presente divulgación. Los sistemas de traducción exentos de células pueden utilizar ARNm transcritos procedentes de una construcción de ADN que comprende un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica el polipéptido o el fragmento del mismo. En algunos aspectos, la construcción de ADN puede linealizarse antes de llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro*. El ARNm transcrito se incubaba a continuación con un extracto de la traducción adecuado, exento de células, tal como extracto de reticulocitos de conejo, para producir el polipéptido deseado o el fragmento del mismo.

Los vectores de expresión pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células hospedadoras transformadas, tal como resistencia a la dihidrofolato reductasa o resistencia a la neomicina para un cultivo de células eucariotas, o tal como resistencia a la tetraciclina o la ampicilina en *E. coli*.

## 20 Restos funcionales

En un aspecto, los anticuerpos monoclonales generados de acuerdo con los presentes métodos pueden modificarse para tener al menos un resto funcional, tal como, pero no de forma limitativa, un resto detectable o un resto terapéutico, unido al anterior. Por ejemplo, pero no como limitación, se puede seleccionar el resto detectable a partir del grupo que consiste en un fluoróforo, una enzima, un radioisótopo y combinaciones de los mismos, mientras que el resto terapéutico se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en un resto citotóxico, un resto tóxico, un resto citoquina, un resto de anticuerpo biespecífico, y combinaciones de los mismos.

Se conocen muchos métodos en la técnica para conjugar o fusionar (acoplar) moléculas de diferentes tipos, incluyendo péptidos. Estos métodos se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para acoplar un resto diferente de anticuerpo, tal como un resto terapéutico o un resto identificable, para proporcionar por tanto una inmunotoxina o una inmunomarca.

Se pueden conjugar o fusionar dos péptidos aislados usando cualquier método de conjugación conocido por un experto en la materia. Un péptido se puede conjugar con un anticuerpo de interés utilizando éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-(2-piridilditio)propiónico (denominado también propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio)) ("SDPD"), un procedimiento de conjugación con glutaraldehído, o un procedimiento de conjugación con carbodiimida.

Se puede usar cualquier método de conjugación SPDP conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, en un aspecto ilustrativo, se puede usar el método de conjugación de Cumber *et al.*, *Methods of Enzymology*, 112:207-224 (1985).

Se puede llevar a cabo la conjugación de un péptido (por ejemplo, un resto identificable o un resto terapéutico) con un anticuerpo mediante métodos conocidos por los expertos en la materia usando glutaraldehído. Por ejemplo, en un aspecto ilustrativo, se puede usar el método de conjugación de G. T. Hermanson, "Antibody Modification and Conjugation, in *Bioconjugate Techniques*", Academic Press, San Diego (1996).

Se puede llevar a cabo la conjugación de un péptido con un anticuerpo por los métodos conocidos por los expertos en la materia utilizando un agente deshidratante tal como carbodiimida. Lo más preferible, se usa la carbodiimida en presencia de 4-dimetil aminopiridina. Como conocen bien los expertos en la materia, se puede usar la conjugación de la carbodiimida para formar un enlace covalente entre un grupo carboxilo de un péptido y un grupo hidroxilo de un anticuerpo (dando como resultado la formación de un enlace éster), o un grupo amino de un anticuerpo (dando como resultado la formación de un enlace amida) o un grupo sulfhidrilo de un anticuerpo (dando como resultado la formación de un enlace tioéster).

De la misma forma, se puede usar el acoplamiento de la carbodiimida para formar enlaces covalentes análogos entre un grupo carbono de un anticuerpo y un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del péptido. Véase, en general, March, *Advanced Organic Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure*, 3ª ed.:349-50 y 372-74 (1985). Por medio de ilustración, y no de limitación, el péptido se conjuga con un anticuerpo mediante un enlace covalente utilizando una carbodiimida, tal como dicitohexilcarbodiimida. Véanse en general, los métodos de conjugación de Neises *et al.*, *Angew Chem, Int Ed Engl*, 17:522 (1978); Hassner *et al.*, *Tetrahedron Lett*, 4475 (1978); Boden *et al.*, *J Org Chem*, 50:2394 (1986) y Mathias, *Synthesis*, 561 (1979).

65

## Ensayos de anticuerpos

De acuerdo con determinados aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para evaluar los anticuerpos monoclonales candidatos para determinar su afinidad con un antígeno. En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona someter los anticuerpos monoclonales candidatos a selección positiva para identificar anticuerpos monoclonales de alta afinidad. En otros aspectos adicionales, someter los anticuerpos monoclonales candidatos a selección positiva comprende poner en contacto los anticuerpos monoclonales candidatos al antígeno unido a un sustrato y aislar los anticuerpos unidos de los anticuerpos no unidos.

Los términos "unión específica" o "unir específicamente" se refieren a la interacción entre el antígeno y sus anticuerpos correspondientes. La interacción es dependiente de la presencia de una estructura concreta de la proteína reconocida por la molécula de unión (es decir, el antígeno o epítipo). Para que la unión sea específica, debe implicar la unión del anticuerpo de(de los) epítipo(s) de interés y no de los antígenos de fondo.

Una vez que se producen los anticuerpos, se evalúan para confirmar que son específicos para el antígeno de interés y para determinar que no tienen ninguna reactividad cruzada con otros antígenos. Un método para llevar a cabo dichos ensayos es un ensayo de selección en suero como se describe en la publicación de solicitud de Estados Unidos N.º 2004/0126829. Sin embargo, otros métodos de evaluación para control de calidad están comprendidos en el alcance de una persona normalmente experta en la materia y por tanto están comprendidos también en el alcance de la presente divulgación.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos, variantes o derivados de los mismos de la presente divulgación pueden también describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un antígeno. La afinidad de un anticuerpo por un antígeno se puede determinar experimentalmente utilizando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y los métodos descritos en el presente documento). La afinidad medida de una interacción particular anticuerpo-antígeno puede variar si se mide en condiciones diferentes (por ejemplo, concentración salina, pH). De esta manera, las medidas de afinidad y otros parámetros de unión a antígenos (por ejemplo,  $K_D$ ,  $K_a$ ,  $K_d$ ) se realizan preferiblemente con soluciones normalizadas de anticuerpos y antígenos, y un tampón normalizado.

Se puede determinar la constante de afinidad de la unión ( $K_{afi}$ ) utilizando la siguiente fórmula:

$$K_{afi} = \frac{(n-1)}{2(n[mAb']_t - [mAb]_t)}$$

en donde:

$$n = \frac{[mAg]_t}{[mAg']_t}$$

$[mAb]$  es la concentración de sitios de antígenos libres, y  $[mAg]$  es la concentración de sitios de unión libre de anticuerpos monoclonales según se ha determinado a dos concentraciones diferentes de antígenos (es decir,  $[mAg]_t$  y  $[mAg']_t$ ) (Beatty *et al.*, J Imm Meth, 100:173-179 (1987)).

el término "afinidad elevada" por un anticuerpo se refiere a una constante de asociación en equilibrio ( $K_{afi}$ ) de al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^8$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  litros/mol o más. La unión con "elevada afinidad" puede variar para los isotipos de anticuerpos.

## Aspectos ilustrativos

### Ejemplo 1

#### Generación de una biblioteca de regiones variables de la cadena pesada de Ig candidatas específicas de antígeno

La Figura 1 describe un proceso representativo para identificar secuencias de la cadena pesada específicas de antígeno usando MPSS y resta bioinformática. En este ejemplo, se utiliza un isotipo de la región variable de la cadena pesada de Ig para crear una muestra para secuenciación MPSS, tal como se ha descrito anteriormente. Las muestras se generaron del organismo tanto antes como después de su exposición al antígeno. Una vez generados

dichos datos, a continuación las secuencias se compararon usando un algoritmo bioinformático que identifica aquellas secuencias que están significativamente amplificadas o aparecen solamente después de la exposición al antígeno. Las secuencias que satisfacen dichos criterios se utilizaron para crear un conjunto de secuencias de cadena pesada candidatas específicas de antígeno. Debido al gran número de secuencias generadas mediante MPSS, es posible estimar la abundancia relativa de las secuencias individuales contando el número de veces en que las secuencias aparecen en la base de datos. Esta estimación cuantitativa se puede utilizar para encontrar secuencias que están presente en cantidades significativamente mayores en la muestra después de la inmunización, en comparación con la muestra antes de la inmunización.

## 10 Ejemplo 2

### Generación de una biblioteca de regiones variables de la cadena pesada de Ig candidatas específicas de antígeno a partir de múltiples refuerzos o antígenos

15 La Figura 2 describe una ampliación del método descrito en la Figura 1, que se puede utilizar para identificar anticuerpos que reaccionan con múltiples antígenos relacionados o reaccionan con un único antígeno a través de múltiples refuerzos. En este ejemplo, la secuenciación MPSS específica de la cadena pesada de Ig se aplicó al organismo después de cada inmunización, con los mismos antígenos o antígenos diferentes, y la sustracción bioinformática se lleva a cabo usando las secuencias preinmunes, mientras que la intersección o la unión del resto de las secuencias se lleva a cabo entre la primera muestra postinmune y la segunda muestra postinmune. Dicho de otra forma, se seleccionaron las secuencias comunes a las muestras postinmunes, pero que no estaban presentes, o estaban presentes en niveles significativamente más bajos, en la muestra preinmune. Una variante de este método es buscar regiones de la cadena pesada relacionadas, pero no idénticas, que pudieran representar una maduración por afinidad del anticuerpo inducida por múltiples exposiciones a los mismos antígenos o a antígenos relacionados.

## 25 Ejemplo 3

### Fórmula para el cálculo de probabilidades del árbol de homología de la región variable

30 Dado un conjunto de muestras tomadas de diferentes brazos experimentales en diferentes momentos temporales y/o tejidos, dichas muestras se pueden dividir en un conjunto anterior A, un conjunto posterior B, o ninguno, dependiendo de la circunstancias del experimento, y el cálculo se lleva a cabo. Las posibilidades de una aparición al azar de m de secuencias o más en el conjunto A, comparado con el número total de secuencias n en ambos conjuntos anterior A y posterior B define la puntuación experimental, E(n,m,Pa), que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$P_a = \frac{\text{(número de muestras del conjunto A)}}{\text{(número de muestras del conjunto A)} + \text{(número de muestras del conjunto B)}}$$

donde Pa se define como la probabilidad de que una secuencia se encuentre en el conjunto A.

40 El coeficiente binomial, es decir, el número de formas donde k elementos se pueden seleccionar entre un conjunto de n elecciones, se puede determinar mediante la siguiente fórmula:

$$C(k, n) = \frac{n!}{k!(n-k)!}$$

45 donde el símbolo '!' indica la función factorial de un número entero.

La probabilidad de k apariciones en el conjunto A viene dada por la siguiente fórmula:

$$50 \quad C(k, n) (P_a^k) (1 - P_a)^{(n-k)}$$

La probabilidad de m o más apariciones de secuencias en el conjunto A se determina a partir de la suma de m a n en la siguiente fórmula:

$$55 \quad E(n, m, P_a) = \sum_{K=m}^n C(k, n) (P_a^k) (1 - P_a)^{(n-k)}$$

El valor E(n,m,Pa) es un cálculo de la puntuación experimental, que se define como la posibilidad aleatoria de que un evento suceda n o más veces en Pa comparado con cualquier otra cosa que no sea Pa; es decir, la posibilidad de

m o más apariciones en el conjunto A del total de n eventos totales.

Cuando esta fórmula se aplica a los datos de la secuencia NGS, se deben tener en cuenta los errores potenciales derivados tanto de la secuenciación como de la preparación de la muestra. Aunque se pueda aplicar a una secuencia individual, el recuento numérico para dicha secuencia puede que no sea lo suficientemente grande como para tener significancia estadística. La fórmula de la puntuación experimental también se puede aplicar a grupos de conjuntos de secuencias relacionados y, por tanto, tiene mayores valores de significancia y es más tolerante a los posibles errores en los datos. La lógica es la siguiente: puesto que no solamente esta secuencia individual está presente principalmente en el conjunto A y no en el conjunto B, y todas las secuencias más estrechamente relacionadas también están sobrerrepresentadas en el conjunto A pero no en el conjunto B, entonces es más probable que la secuencia individual esté más genuinamente presente en la muestra que si las secuencias relacionadas no estuvieran presentes.

Para aplicar la fórmula a grupos de secuencias, se puede crear un árbol filogenético a partir de los datos de secuencias NGS. En primer lugar, se debe generar una puntuación de similitud frente a cada uno del resto de miembros de las secuencias situadas entre los sitios del cebador. Estas puntuaciones se utilizan para poblar una matriz de similitud. Esta matriz se puede poblar usando, como ejemplo, la puntuación blast resultado de una búsqueda blast de todos contra todos. A continuación, estos datos se utilizan para producir grupos de secuencias.

La Figura 3 resume el proceso de utilizar datos de secuencias NGS en la creación del árbol filogenético y en la asignación de valores de significancia a los elementos de hojas y nodo del árbol.

A partir de los datos de la matriz, se puede construir un árbol filogenético usando un algoritmo de agrupamiento aglomerativo tal como el Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, (UPGMA). La fórmula esperada  $E(n, m, Pa)$  se puede aplicar a cada nodo del árbol resultante, donde el total de eventos anterior o posterior son la suma de los eventos anteriores y posteriores en los nodos hijos. Esto proporciona una medida directa con significancia estadística a los conjuntos de secuencias relacionadas, en lugar de a las secuencias medidas una por una.

Para dividir el árbol en subconjuntos de acuerdo con la significancia, se pueden seleccionar los nodos con puntuación experimental máxima de un árbol dado. Un nodo máximo es un nodo del árbol para el que las puntuaciones experimentales de sus nodos padres e hijos son menos significativas que para él mismo. Esto representa máximos locales en el gráfico de árbol, y las cuentas y la significancia de estos nodos se puede utilizar para notificar diferencias globales entre los conjuntos de muestras anteriores y posteriores.

La forma en que la cuenta bruta de una secuencia dada de una muestra se relaciona con la fórmula de la puntuación esperada depende de si los eventos son independientes, o no. Por ejemplo, si la amplificación de una muestra por medios tales como la PCR no lineal tiene el potencial de favorecer una secuencia sobre las demás, entonces las cuentas de dichas secuencias en una muestra dada no serían totalmente independientes. Si los eventos son completamente independientes, entonces un evento representaría lo mismo que 100 eventos en una muestra PCR dada. En el otro lado, si las secuencias son completamente independientes, entonces cada aparición cuenta lo mismo, tanto si se detecta una como si se detectan 100 en una muestra. Una generalización de la fórmula de la puntuación experimental es limitar las cuentas totales permitidas de una muestra a un número máximo T. Por ejemplo,  $T=100$  significa que las apariciones de secuencias en más de 100 veces en una muestra no se consideran eventos independientes, pero menos de 20 lo son. Este parámetro es T. La Figura 3B muestra los diferentes efectos de los valores de T sobre las puntuaciones de significancia de los 5 brazos de ensayo descritos en el método experimental sometidos a ensayo frente a controles no expuestos a tratamiento. Como control adicional para el cálculo, se puede calcular la puntuación experimental del conjunto posterior frente a la del conjunto anterior. En otras palabras, al intercambiar el anterior con el posterior, se puede calcular la probabilidad de que los grupos de secuencias sean significativos en el conjunto no expuesto, en comparación con el conjunto experimental. En la mitad inferior del gráfico se han representado las puntuaciones de los correspondientes experimentos inversos, que miden la probabilidad de que las secuencias del brazo no expuesto sean únicas en comparación con el brazo de ensayo. La presencia de menos de estas puntuaciones y su menor significancia indican que la mayoría de secuencias únicas están presentes en la muestra experimental y no en el conjunto no expuesto. La presencia de la mayoría de las secuencias específicas de probabilidad muy alta en los brazos experimentales 3 y 5 se correlaciona con la respuesta inmune más intensa observada en dichos brazos, determinada mediante la actividad bloqueante de antígeno en el suero. Esto indica que la mayoría de las muestras de la parte inferior del árbol se han producido en respuesta al tratamiento, en comparación con las muestras de control. La posibilidad de que una secuencia dada en el conjunto sea específica de antígeno es extremadamente alta.

#### Ejemplo 4

##### Emparejamiento de la cadena ligera

Los anticuerpos son dímeros emparejados de proteínas de cadena pesada y ligera. Por tanto, para crear un anticuerpo completamente monoclonal, una cadena ligera se debe emparejar con la cadena pesada. La Figura 4 ilustra varios métodos que se pueden utilizar para conseguir esto. Como las cadenas ligeras contribuyen principalmente a la estabilidad de unión con el anticuerpo pero no a la especificidad de antígeno, las cadenas

pesadas candidatas específicas de antígeno se pueden transfectar simultáneamente con un conjunto limitado de anticuerpos de cadena pesada que, posteriormente, se someten a ensayo para determinar la unión frente al antígeno diana. El conjunto de clones de cadena ligera se puede desviar en función del isotipo de los clones de cadena pesada candidatos, ya que se sabe que es más probable que determinados isotipos de cadena ligera formen anticuerpos de alta afinidad estables que otros, cuando se combinan con determinados isotipos de cadena pesada. La búsqueda eficiente de una cadena ligera adecuada se puede llevar a cabo mediante transfección simultánea de múltiples clones de cadena ligera con una sola cadena pesada, analizar la unión a antígeno y, una vez que se descubre un anticuerpo de afinidad elevada, realizar la deconvolución del conjunto de cadenas ligeras con un segundo conjunto de transfección, con cada una de las cadenas ligeras sola, con la cadena pesada.

Adicionalmente, se puede realizar una MPSS sobre las secuencias de la cadena ligera de la misma forma que se ha descrito anteriormente para las secuencias de la cadena pesada. Esto proporcionaría un conjunto de cadenas ligeras candidatas que se pueden transfectar simultáneamente con las secuencias de cadena pesada, solas o en combinaciones multiplexadas para descubrir un par óptico de cadenas pesada y ligera. Esto tendría la ventaja de utilizar secuencias de cadenas ligeras naturales específicas de un estado adaptativo inmune particular de un organismo.

Todos los datos de cada punto temporal son deseables, pero no se requieren necesariamente para la identificación de las secuencias del anticuerpo candidato. El algoritmo de procesamiento de los datos combinados tiene en cuenta varias combinaciones incompletas del conjunto de datos.

## Ejemplo 5

### Conjunto de datos experimentales derivado de ratones vacunados

#### Inmunización

Los ratones recibieron una inyección de antígeno en estado en sangre de la malaria combinado con unatro formulaciones adyuvantes diferentes, es decir, brazos 1, 3, 4 y 5 del experimento. El brazo 1 era una formulación base, mientras que los brazos 3 y 5 estaban suplementados con el adyuvante líquido de glicopiranosilo (GLA), y los brazos 4 y 5 estaban suplementados con Resiquimod (R-848). Además, estos agentes son agonistas de los receptores de tipo Toll (TLR). Además, se recogieron muestras de un grupo de control no expuesto en cada momento temporal. Los ratones recibieron una inyección inicial seguido de un refuerzo primario a las tres semanas y un refuerzo secundario a las seis semanas. Las muestras de ADNc se prepararon a partir de células sanguíneas en circulación extraídas el día 6 tras el segundo refuerzo de la combinación adyuvante-antígeno, y 4 semanas después tanto de muestras de sangre en circulación como de muestras de la médula ósea. Las pruebas bioquímicas realizadas sobre el suero extraído tras la vacunación demostraron que los brazos 3 y 5 tenían el mayor título de anticuerpos con actividad bloqueante del antígeno de la proteína diana del hospedador.

#### Generación de la secuenciación de la muestra

Los glóbulos rojos de las muestras se eliminaron mediante lisis osmótica seguido por lavado en PBS. Las restantes células se lisaron y se utilizaron para la síntesis de ADNc en perlas magnéticas revestidas con oligo-dT. La polimerasa utilizada fue SuperScript III, una forma muy procesada mediante ingeniería genética de la transcriptasa inversa. Se utilizó una mezcla maestra de polimerasa muy procesada, phusion flash, para el ciclado térmico de las muestras. Estas muestras se utilizaron en seis ciclos de síntesis usando solamente cebadores en dirección 3', después de lo cual las perlas magnéticas de ADNc se eliminaron mediante el uso de un tubo contenedor magnético para muestras. A continuación, el 1 ml de la reacción en una dirección se introdujo en una reacción de 10 ml con cebadores tanto directos como inversos. Esta mezcla se sometió a un ciclo de 18 rondas usando un tiempo de extensión de 10 segundos. Tres ml de cada una de estas muestras se añadieron a 30 ml de mezcla de reacción reciente usando el mismo conjunto de cebadores y después se cicló durante 18 rondas más.

#### Conjunto de cebadores

Se diseñaron conjuntos de cebadores de la PCR para cubrir el locus de cadena pesada del ratón. En primer lugar, se creó una lista de secuencias de la región V intacta con las secuencias adecuadas en marcp mediante referencia cruzada al registro Genbank del locus con referencias de la base de datos IMGT. Se diseñaron conjuntos de cebadores en dirección 3' para cubrir la lista de la región V. Al combinar entre sí los conjuntos de cebadores con una secuencia común de seis bases en 3', se crearon seis combinaciones de cebadores directos de la región V para cubrir el conjunto completo de regiones V. Se utilizaron dos conjuntos de cebadores inversos de secuencia, una sola secuencia que era suficiente para cubrir los transcritos de la región constante de IgM, y un conjunto de 3 necesarias para cubrir los isotipos constantes de IgG. Los cebadores inversos de IgG también se diseñaron con secuencias idénticas de seis bases en 3', use usaron juntas en una única combinación. Las 8 principales bases en 5' de los cebadores se designaron con un código de barras de cuatro letras en el extremo 3'. Las combinaciones de los códigos de barras en los cebadores directo e inverso utilizados en cada muestra fueron únicas y permiten la identificación de la muestra de la que se ha derivado la secuencia. Se combinaron las reacciones de la PCR finales

programadas para el mismo ADNc, y el ADN se recuperó con una columna de limpieza Quiagen PCR. La concentración de ADN en cada muestra se determinó a partir de mediciones de DO a 260/280, y las muestras se mezclaron a continuación con cantidades iguales de cada ADN. Esta muestra se utilizó en la generación y secuenciación de la biblioteca usando el proceso Titanium 454.

5 Los resultados mostrados en la Figura 3B se obtuvieron realizando un análisis en un formato de semiplaca y se filtraron para tener en cuenta solamente la secuencias de IgG.

10 Algunas partes de la memoria descriptiva anterior describen los aspectos en términos de algoritmos y representaciones simbólicas de las operaciones durante la información. Estas descripciones y representaciones algorítmicas se suelen utilizar por los expertos en la técnica de procesamiento de datos para transmitir lo esencial de su trabajo de una forma eficaz a otros expertos en la técnica. Se entiende que estas operaciones, aunque descritas de forma funcional, computacional o lógica, se van a implementar mediante programas informáticos o circuitos electrónicos equivalentes, microcódigos o similares. Además, se ha demostrado conveniente, algunas veces, denominar estas disposiciones de operaciones como módulos, sin pérdida de generalidad. Las operaciones descritas y sus módulos asociados se pueden realizar en software, firmware, hardware, o cualquier combinación de los mismos.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para generar un anticuerpo monoclonal, que comprende las etapas de:

5 a) crear una biblioteca de secuencias de ADNc de anticuerpo diana, comprendiendo la creación las etapas de:

i) transcribir de forma inversa el ARNm a ADNc, en donde el ARNm se ha aislado de linfocitos aislados procedentes de un sujeto hospedador que se ha inmunizado con un antígeno;

ii) amplificar las secuencias de ADNc del anticuerpo diana; y

10 iii) secuenciar las secuencias de ADNc del anticuerpo diana, en donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana amplificadas se secuencian mediante secuenciación masiva paralela; y

b) analizar la frecuencia de las secuencias de ADNc del anticuerpo diana secuenciadas, que comprende:

15 i) comparar las frecuencias relativas de las secuencias de ADNc del anticuerpo diana antes y después de la exposición al antígeno, en donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana que tienen una frecuencia significativamente mayor después de la exposición al antígeno se identifican como secuencias del anticuerpo candidato; o

20 ii) comparar las frecuencias relativas de las secuencias de ADNc del anticuerpo diana en dos o más veces después de la exposición al antígeno, en donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana que tienen una frecuencia significativamente menor en momentos posteriores se identifican como secuencias del anticuerpo candidato.

25 2. El método de la reivindicación 1, en donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana comprenden secuencias de una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (Ig).

30 3. El método de la reivindicación 2, en donde el método comprende además la etapa de emparejar una secuencia del anticuerpo candidato identificada en la etapa (b) con una secuencia de cadena ligera de anticuerpo.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde los linfocitos comprenden linfocitos B y linfocitos T o linfocitos B aislados.

35 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la inmunización comprende varias exposiciones al mismo antígeno o a antígenos relacionados y en donde el análisis de la frecuencia del anticuerpo diana comprende secuencias de ADNc del anticuerpo diana que tienen regiones de cadena pesada relacionadas, pero no idénticas.

40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además crear una biblioteca de secuencias de ADNc tras haberse reinmunizado al sujeto hospedador con el antígeno y comparar las frecuencias relativas de las secuencias del anticuerpo diana antes y después de la reinmunización, en donde las secuencias de anticuerpos presentes a frecuencia significativamente mayor tras la reinmunización se identifican como secuencias de anticuerpos candidatas maduras.

45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las secuencias de ADNc del anticuerpo diana comprenden secuencias del dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (Ig).

50 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además subclonar las secuencias del anticuerpo candidato con una secuencia del dominio variable de cadena ligera y un marco de Ig para producir un conjunto de anticuerpos monoclonales candidatos, opcionalmente en donde el marco de Ig es un marco de Ig humana y opcionalmente en donde el método comprende además someter a ensayo los anticuerpos monoclonales candidatos para determinar su afinidad con el antígeno.

55 9. El método de reivindicación 8, que comprende además someter los anticuerpos monoclonales candidatos a selección positiva para identificar anticuerpos monoclonales de alta afinidad, opcionalmente en donde:

i) someter los anticuerpos monoclonales candidatos a selección positiva comprende poner en contacto los anticuerpos monoclonales candidatos al antígeno unido a un sustrato y aislar los anticuerpos unidos de los anticuerpos no unidos; y/o

60 ii) los anticuerpos monoclonales candidatos se unen a un antígeno con una afinidad de al menos  $1 \times 10^{10}$  litro/mol, medida como una constante de asociación ( $K_{afn}$ );

opcionalmente en donde el método comprende además secuenciar los anticuerpos monoclonales de alta afinidad.

65 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde las frecuencias relativas de las secuencias de ADNc de los anticuerpos diana se analizan utilizando un algoritmo de software bioinformático.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el sujeto hospedador es:

i) un animal experimental, opcionalmente en donde el sujeto hospedador es un animal transgénico que expresa anticuerpos humanos, o

5 ii) un paciente humano que se ha expuesto a un antígeno o un patógeno o que padece una enfermedad que altera la respuesta inmune adaptativa.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el sujeto hospedador es un ratón, opcionalmente en donde el sujeto hospedador es un ratón transgénico que expresa anticuerpos humanos.

10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el sujeto hospedador se ha inmunizado con múltiples antígenos, opcionalmente en donde el anticuerpo monoclonal es reactivo con múltiples antígenos.

15 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además seleccionar contra anticuerpos que son reactivos para un antígeno de fondo que se ha administrado al sujeto hospedador, opcionalmente en donde el antígeno de fondo se ha administrado después de un primer antígeno.

20 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la etapa de amplificar secuencias de ADNc diana de anticuerpo comprende amplificar las secuencias de ADNc de anticuerpo diana mediante amplificación de enlace.

Figura 1

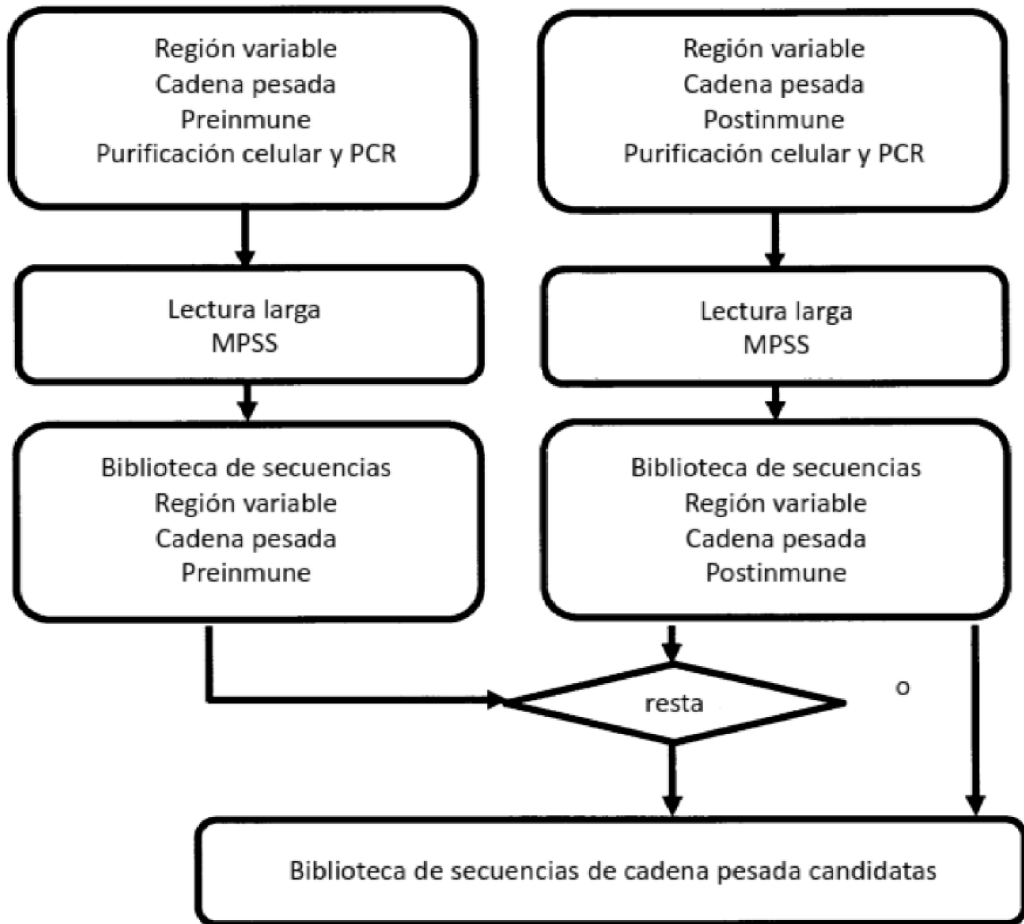


Figura 2

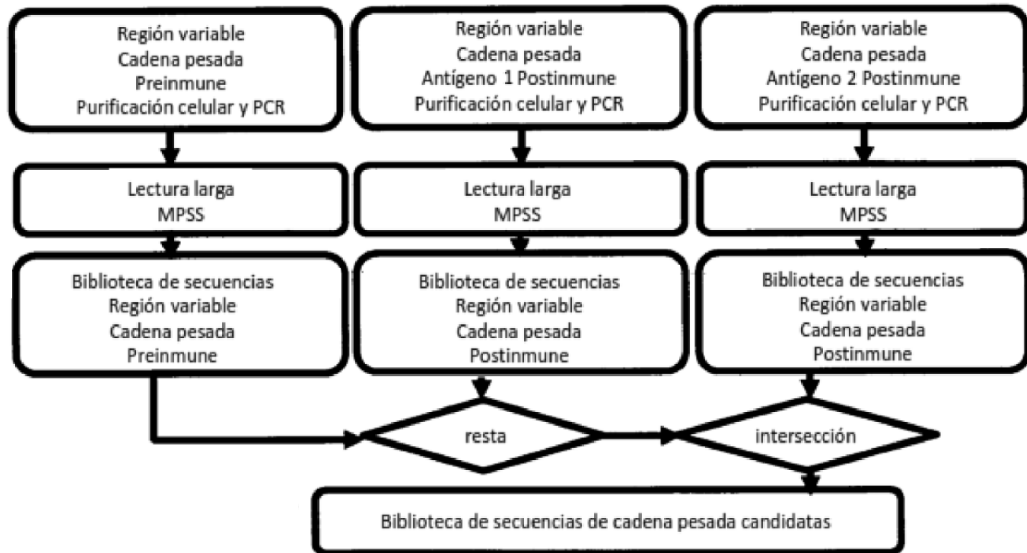
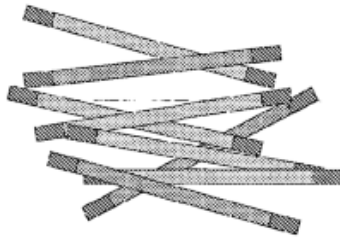
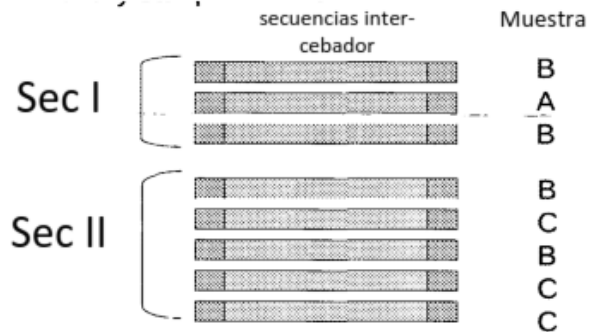


Figura 3A

1. Superponer secuencias de cebadores sobre las secuencias originales



2. Agrupar según secuencias inter-cebador y decodificar los códigos de barras del cebador para identificar la fuente de la muestra



3. Crear la matriz de puntuación para el conjunto de secuencias inter-cebador

	Sec I	Sec II	...	Sec N
Sec I		344	356	238
Sec II			476	255
...				183
Sec N				

4. Crear el árbol filogenético basándose en la matriz de puntuación usando un método de agrupamiento según algoritmo, por ejemplo, UPGMA

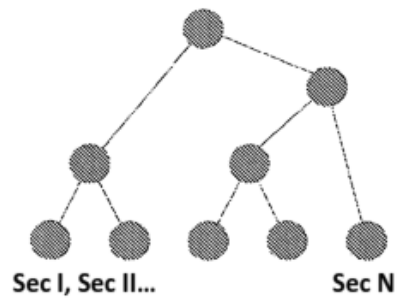
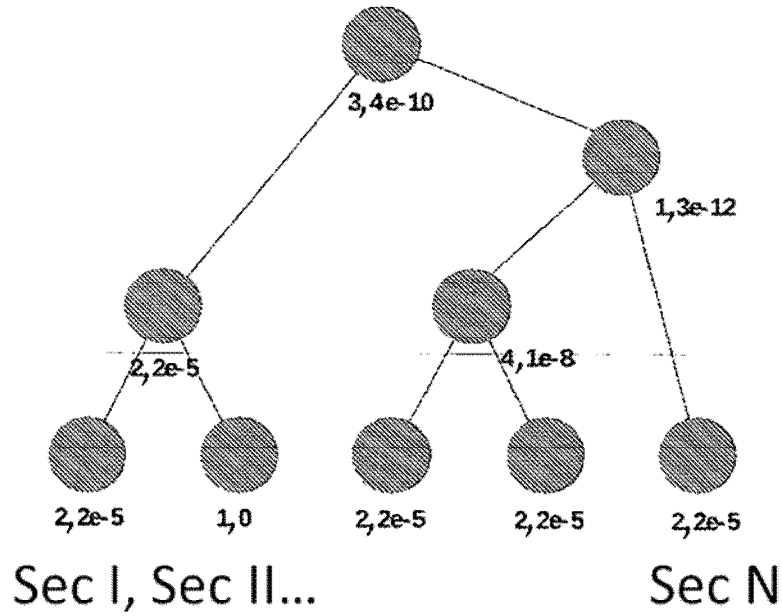
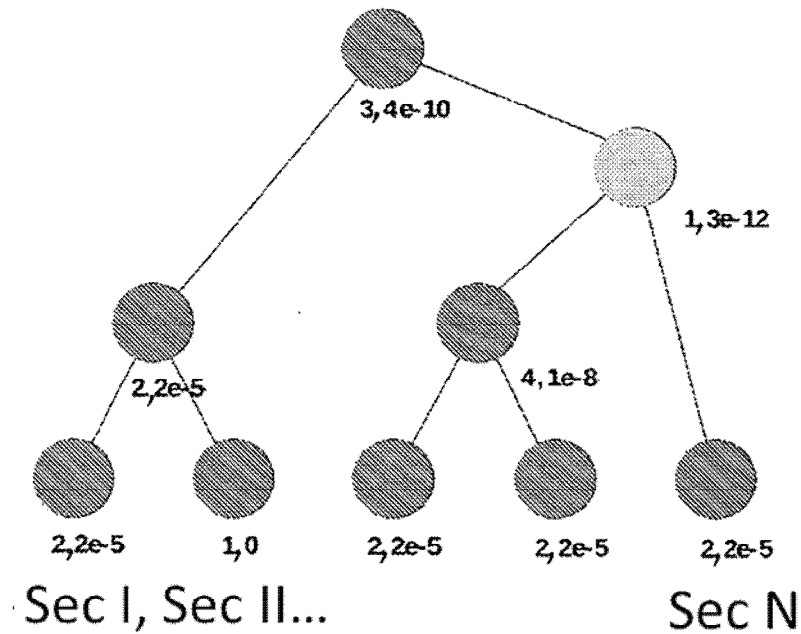


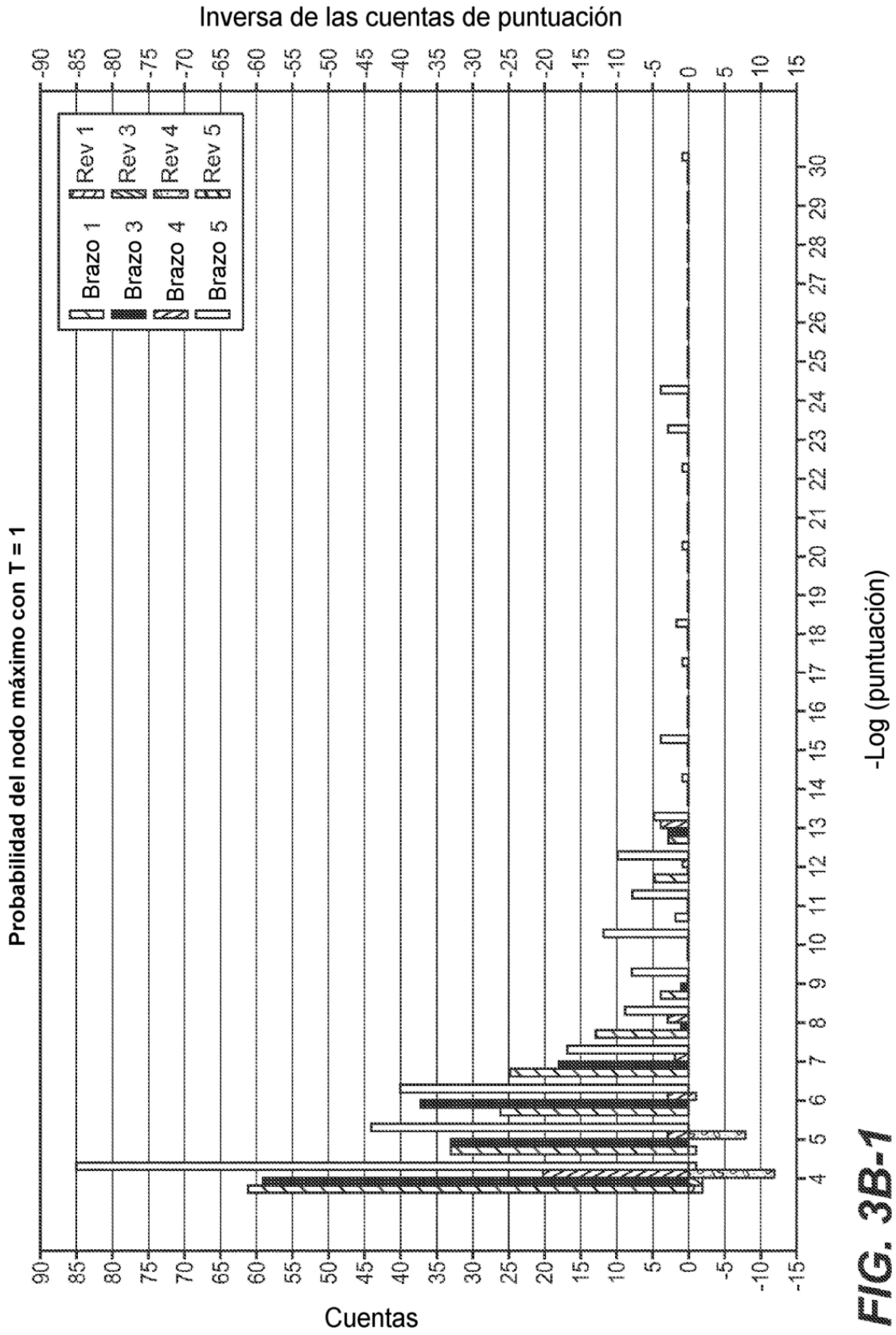
Figura 3A

5. Calcular la puntuación experimental de las cuentas de cada nodo para la muestra anterior y posterior

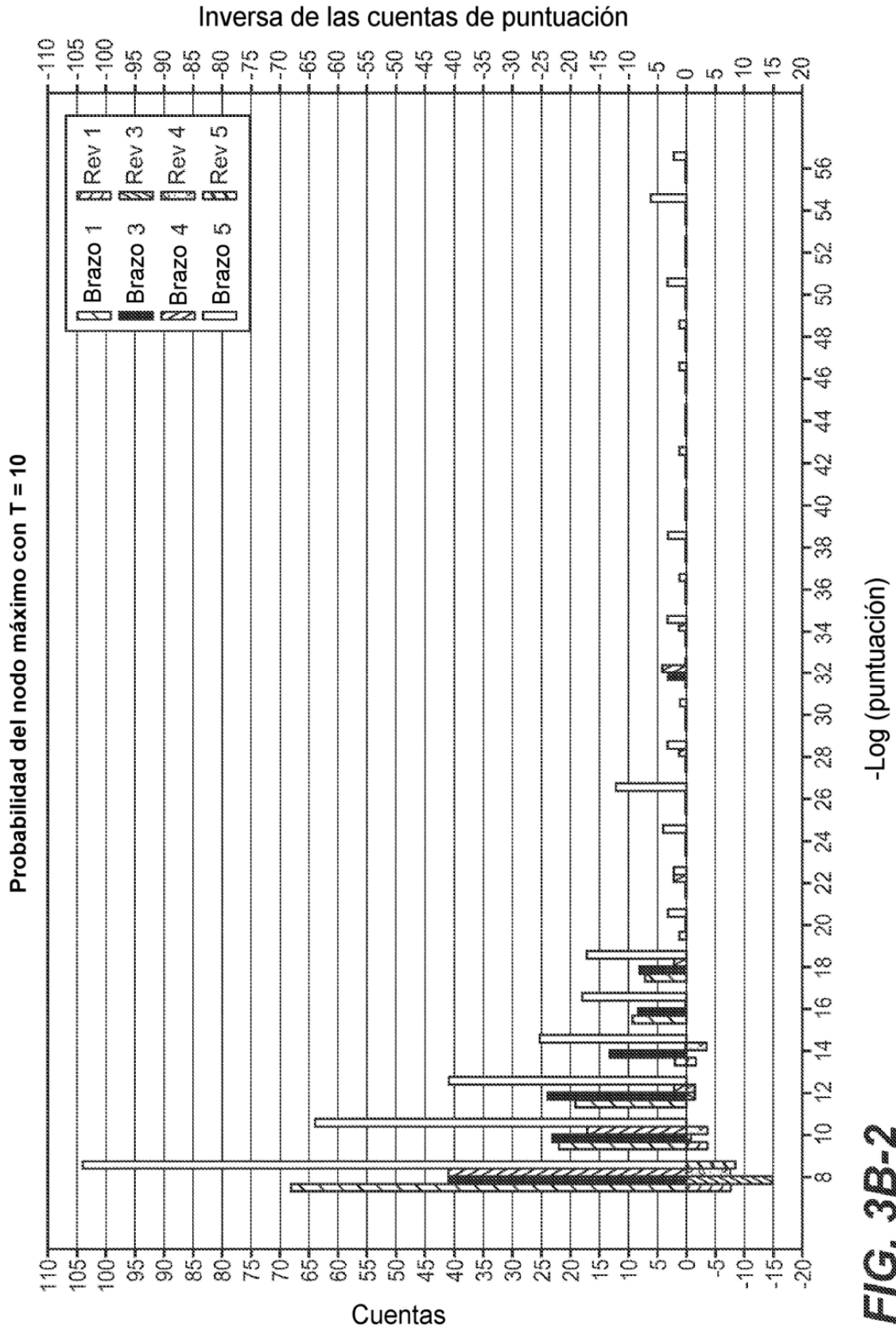


6. Identificar nodos con picos locales: la puntuación experimental más baja (máxima especificidad)



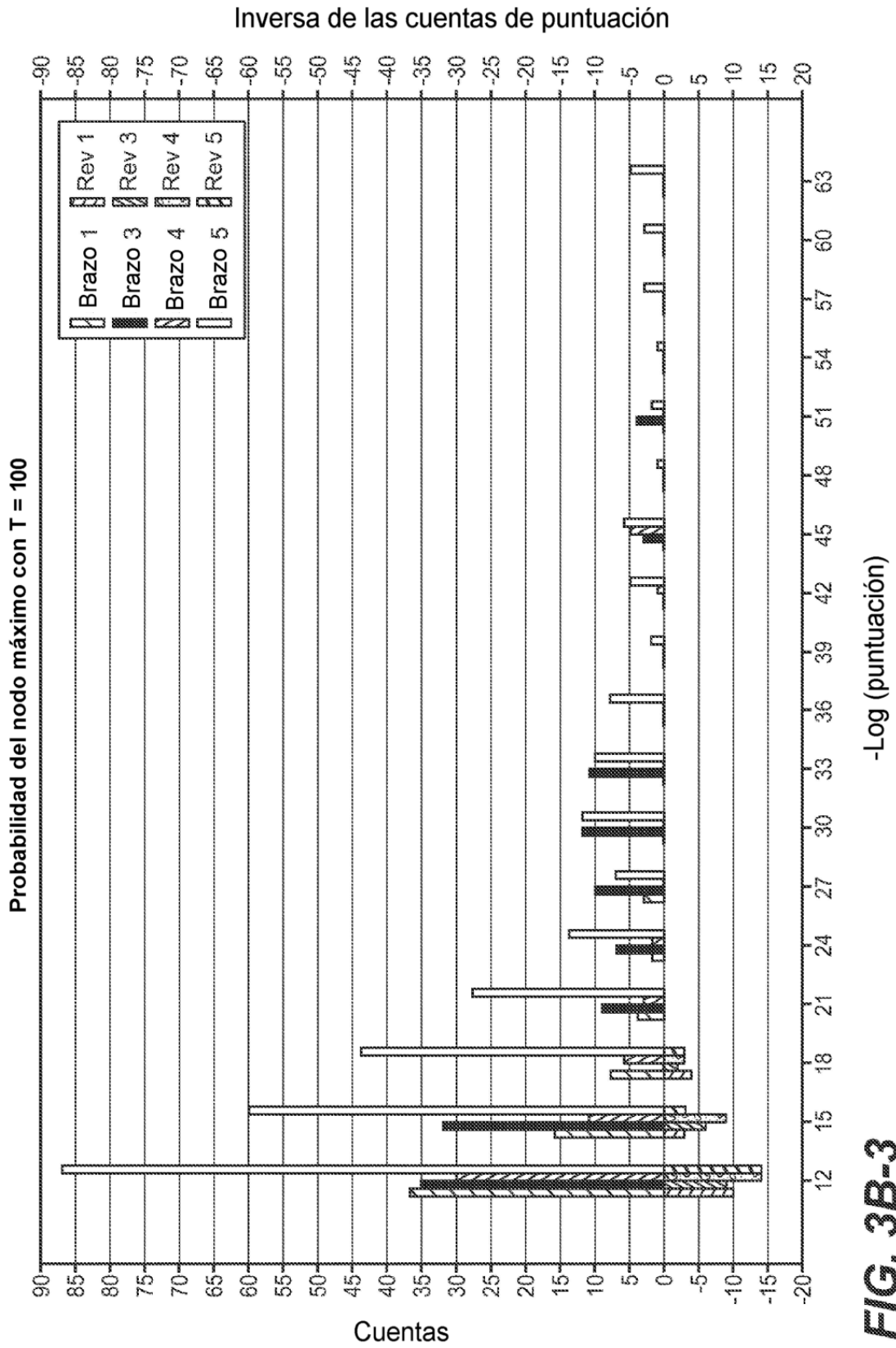


**FIG. 3B-1**

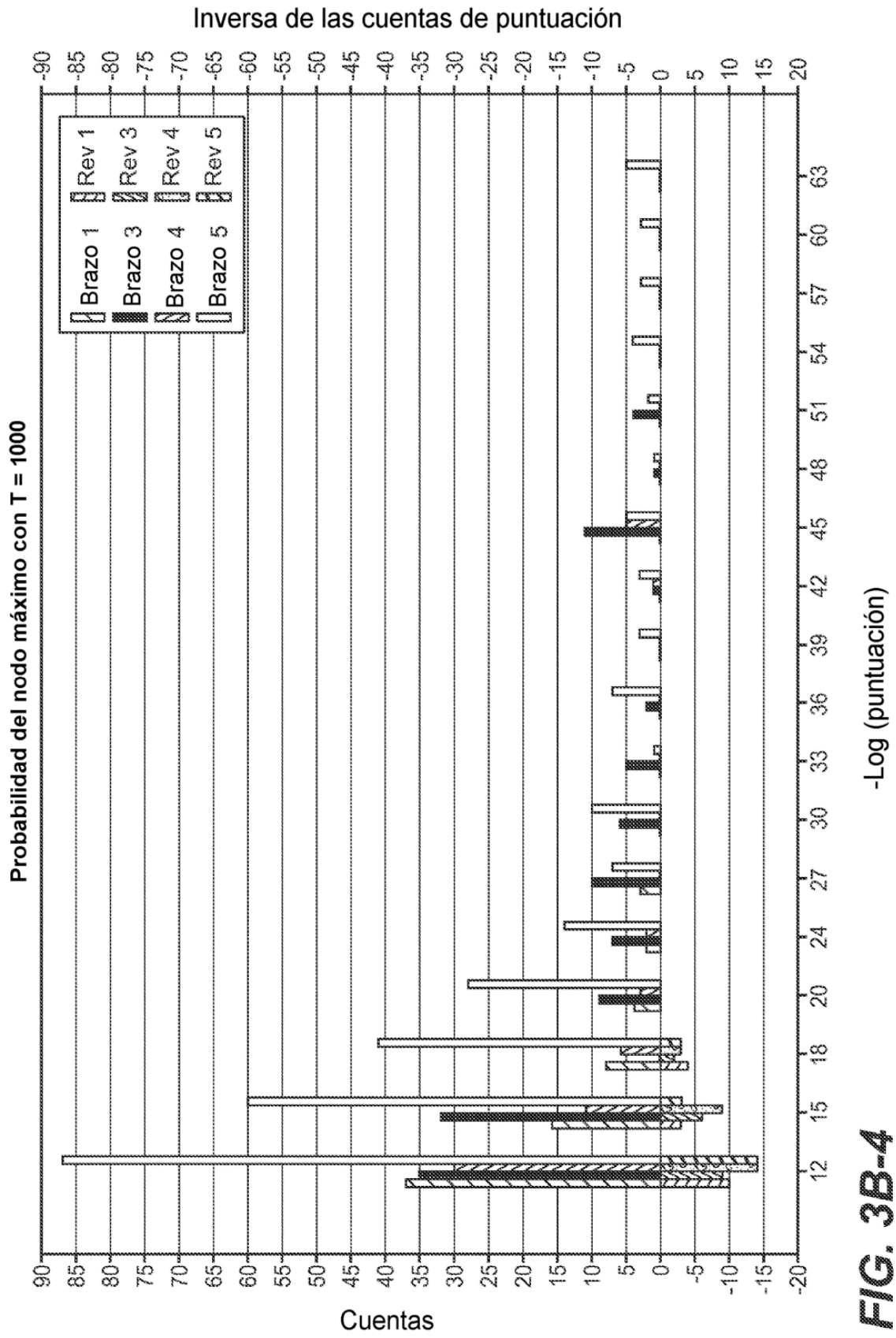


**FIG. 3B-2**





**FIG. 3B-3**



**FIG. 3B-4**

Figura 4

