

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 401**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/74** (2006.01)

**C12N 15/76** (2006.01)

**C12N 15/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2013 PCT/US2013/049310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14008391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2013 E 13736741 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2870247**

54 Título: **Sistema de expresión y secreción**

30 Prioridad:

**05.07.2012 US 201261668397 P**

**15.03.2013 US 201361852483 P**

**03.05.2013 US 201361819063 P**

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

**19.02.2020**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**

**Grenzacherstrasse 124**

**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**TESAR, DEVIN;**

**CHEN, XIAOCHENG;**

**DENNIS, MARK y**

**HOTZEL, ISIDRO**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 743 401 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

Sistema de expresión y secreción

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un sistema de expresión y secreción, y a procedimientos para su uso, para la expresión y secreción de una proteína de fusión de Fab cuando el ácido nucleico se transforma en una célula procariota para la presentación en fagos y a una proteína de fusión de Fab distinta o idéntica cuando el ácido nucleico se transfecta en una célula eucariota para la expresión y purificación. En el presente documento también se proporcionan moléculas de ácido nucleico, vectores y células huésped que comprenden dichos vectores y moléculas de ácido nucleico.

## ANTECEDENTES

15 La presentación en fagos de péptidos o proteínas en partículas de fago filamentoso es una tecnología *in vitro* que permite la selección de péptidos o proteínas con propiedades deseadas de grandes conjuntos de péptidos o proteínas variantes (McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990); Sidhu *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 610-616 (2000); Smith *et al.*, *Science*, 228: 1315-1317 (1985)). La presentación en fagos se puede usar para presentar diversas colecciones de péptidos o proteínas, incluyendo fragmentos de anticuerpo, tales como Fab en el campo de descubrimiento de anticuerpos, en la superficie de una partícula de fago filamentoso que a continuación se seleccionan para su unión a un antígeno particular de interés. El fragmento de anticuerpo se puede presentar en la superficie de la partícula de fago filamentoso fusionando el gen del fragmento de anticuerpo con el de una proteína de la cubierta de fago, dando como resultado una partícula de fago que presenta el fragmento de anticuerpo codificado en su superficie. Esta tecnología permite el aislamiento de fragmentos de anticuerpo con la afinidad deseada por muchos antígenos de una gran colección de fagos.

Para el descubrimiento de anticuerpos basados en fagos, la evaluación de fragmentos de anticuerpo seleccionados y las propiedades de sus IgG análogas en ensayos funcionales (tales como unión a dianas, ensayos de actividad basados en células, semivida *in vivo*, etc.) requiere el reformateo de las secuencias de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) de Fab en una IgG de longitud completa subclonando las secuencias de ADN que codifican la HC y la LC fuera del vector usado para la presentación en fagos y en vectores de expresión de mamífero para la expresión de IgG. El laborioso procedimiento de subclonar docenas o cientos de pares de HC/LC seleccionados representa un importante cuello de botella en el procedimiento de descubrimiento de anticuerpos basados en fagos. Además, puesto que un porcentaje sustancial de los Fab seleccionados, una vez reformateados, no tienen un funcionamiento satisfactorio en los ensayos de cribado iniciales, el incremento del número de clones transportados a través de este procedimiento de reformateo/cribado incrementa en gran medida la probabilidad final de éxito.

40 Humphreys *et al.* en *Protein Expr. Purif.* (2000), vol. 20, n.º 2, pp. 252-264 investigaron la capacidad de los péptidos señal de origen eucariótico (humano, ratón y levadura) para dirigir eficazmente las proteínas modelo al periplasma de *Escherichia coli*. Johansson *et al* exploraron en *J. Immunol. Methods* (2007), vol. 318, n.º 1-2, pp. 37-44, la línea celular S2 de *Drosophila* para la expresión de moléculas de Ig aisladas como ADNc de Fab o scFv de colecciones presentadas en fagos. El documento WO2004/063343 describe un sistema de vector de expresión doble y sus usos. El documento WO2009/111183 describe un sistema de expresión de proteínas para levaduras y hongos filamentosos. El documento WO/2011/090762 proporciona proteínas heterodiméricas alternativas, así como procedimientos eficaces para producir las mismas. El documento WO/2001/000814 describe procedimientos para la identificación de polipéptidos heteroasociadores. El documento WO/2002/002746 describe proteínas de fusión que tienen dominios de heterodimerización de superhélice de alta afinidad sustituidos por dominios de unión a proteínas modulares y sus usos. Soltes *et al.* analizan en *J. Biotechnol.* (2007) vol. 127, n.º 4, pp. 626-637 cómo varias combinaciones de vectores afectan diferentes aspectos de la producción de viriones. Oh *et al* investigaron en *Gene* (2007) vol. 386, n.º 1-2, pp. 81-89 el uso del fago auxiliar Ex12 para mejorar la presentación en fagos de fragmentos de anticuerpo. El documento WO/2003/031611 proporciona un sistema de fagómidos que comprende un fago auxiliar y un fagómido para la presentación en fagos.

55 Aquí, se describe la generación de un sistema de expresión y secreción para impulsar la expresión de una fusión Fab-fago cuando se transforma en *E. coli*, y de impulsar la expresión de una IgG de longitud completa que porta el mismo fragmento Fab cuando se transfecta en células de mamífero. Se demuestra que una secuencia señal de mamífero de la proteína de inmunoglobulina de unión murina (mBiP) (Haas *et al.*, *Immunoglobulin heavy chain binding protein*, *Nature*, 306: 387-389 (1983); Munro *et al.*, *An Hsp70-like protein in the ER: identify with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein*, *Cell*, 4:291-300 (1986) puede impulsar la expresión de proteínas eficaz tanto en células procariotas como eucariotas. Usando el empalme de ARNm de mamífero para eliminar un intrón sintético que contiene un péptido de fusión de fago insertado dentro de la región bisagra de la HC de IgG<sub>1</sub> humana, se pueden generar dos proteínas distintas de una forma dependiente de la célula huésped: un fragmento Fab fusionado con un péptido adaptador para la presentación en fagos en *E. coli* e IgG<sub>1</sub> humana natural en células de mamífero. Esta tecnología permite la selección de fragmentos Fab que se unen a un antígeno de interés de una colección de presentación en fagos con la posterior expresión y purificación de

las IgG de longitud completa análogas en células de mamífero sin necesidad de subclonación.

## SUMARIO

5 En un aspecto, la invención se basa, en parte, en hallazgos experimentales que demuestran que (1) las secuencias señal de origen no procariótico funcionan en células procariotas y (2) diferentes proteínas de fusión de Fab se expresan a partir de la misma molécula de ácido nucleico de una manera dependiente de la célula huésped cuando el procesamiento del ARNm se produce en células eucariotas, pero no en células procariotas (proteínas de fusión de fago-Fab en células procariotas y proteínas de fusión Fc-Fab en células eucariotas). En consecuencia, en el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico para la expresión y secreción de un fragmento Fab fusionado con una proteína de partícula de fago, proteína de la cubierta o proteína adaptadora para la presentación en fagos en bacterias cuando el ácido nucleico se transforma en células huésped procariotas (por ejemplo, *E. coli*) y un fragmento Fab fusionado con Fc cuando el ácido nucleico se transforma en células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero), sin la necesidad de subclonación, y procedimientos de uso.

15 En un aspecto de la divulgación, la solicitud proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende VH-HVR1, VH-HVR2 y HVR3 de un dominio de la cadena pesada variable (VH) y/o un segundo polipéptido que comprende VL-HVR1, VL HVR2 y VL-HVR3 de un dominio de la cadena ligera variable, y en la que la molécula de ácido nucleico codifica además una secuencia señal que es funcional tanto en una célula procariota como en una eucariota y se codifica por una secuencia de ácido nucleico que está enlazada de forma funcional a la primera y/o segunda secuencia polipeptídica, y en la que un anticuerpo de longitud completa se expresa a partir del primer y/o segundo polipéptido de la molécula de ácido nucleico. En otro aspecto de la divulgación, el primer y/o segundo polipéptido comprende además un dominio de la cadena pesada variable (VH) y un dominio de la cadena ligera variable (VL). En otro aspecto de la divulgación, el dominio VH está enlazado a CH1 y el dominio VL está enlazado a CL.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, que codifica VH-HVR1, VH-HVR2 y VH-HVR3 de un dominio de la cadena pesada variable (VH) y VL-HVR1, VL-HVR2 y VL-HVR3 de un dominio de la cadena ligera variable (VL) y que comprende un activador procariótico y un activador eucariótico donde los activadores están enlazados de forma funcional a las HVR del VH y/o a las HVR del VL para permitir la expresión de las HVR del VH y de las HVR del VL en una célula procariota y una eucariota, y en la que las HVR del VH y/o el VL están enlazadas a un péptido de utilidad cuando se expresan por una célula eucariota y en la que el ácido nucleico codifica además una secuencia señal que es funcional tanto en una célula procariota como en una eucariota.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio de la cadena pesada variable (VH) y un dominio de la cadena ligera variable (VL) y que comprende un activador procariótico y un activador eucariótico donde los activadores están enlazados de forma funcional al dominio VH y/o el dominio VL para permitir la expresión de un dominio VH y/o un dominio VL en una célula procariota y una eucariota, y en la que el dominio VH y/o VL está enlazado a un péptido de utilidad cuando se expresa por una célula eucariota y en la que el ácido nucleico codifica además una secuencia señal que funciona tanto en una célula procariota como en una eucariota.

35 En un aspecto de la divulgación, el VL y el VH están enlazados a péptidos de utilidad. En otro aspecto de la divulgación, el VH está enlazado además a un CH1 y el VL está enlazado a una CL. El péptido de utilidad se selecciona del grupo que consiste en un Fc, una marca, un marcador y una proteína de control. En un aspecto de la divulgación, el VL está enlazado a una proteína de control y el VH está enlazado a un Fc. Por ejemplo, la proteína de control es una proteína gD, o un fragmento de la misma.

40 En incluso otro aspecto de la divulgación, el primer y/o segundo polipéptido de la invención se fusiona con una proteína de la cubierta (por ejemplo, pI, pII, pIII, pIV, pV, pVI, pVII, pVIII, pIX y pX del bacteriófago M13, f1 o fd, o un fragmento de los mismos, tales como los aminoácidos 267-421 o 262-418 de la proteína pIII ("pI", "pII", "pIII", "pIV", "pV", "pVI", "pVII", "pVIII", "pIX" y "pX" cuando se usan en el presente documento se refieren a la proteína de longitud completa o a fragmentos de la misma, a menos que se especifique de otro modo)) o una proteína adaptadora (por ejemplo, una proteína de cremallera de leucinas o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (cJUN(R): ASIARLEEKV KTLKAQNYEL ASTANMIREQ VAQIGGC) o SEQ ID NO: 13 (FosW(E): ASIDELQAEV EQLEERNYAL RKEVEDIQKQ AEKILGGC) o una variante de las mismas (los aminoácidos en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 que se pueden modificar incluyen, pero no se limitan a, los que están subrayados y en negrita), en la que la variante tiene una modificación de aminoácidos en la que la modificación mantiene o incrementa la afinidad de la proteína adaptadora por otra proteína adaptadora, o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 (ASIARLRERVKTLRARNYELRSRANMLRERVAQLGGC) o SEQ ID NO: 7 (ASLDELEAEIEQLEENYALEKEIEDELEKELEKILGGC) o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (GABA-R1: FFKSRLLEKEF NRELEKIIAE KEERVSELRH QLQSVGGC) o SEQ ID NO: 9 (GABA-R2: TSRLEGLQSE NHRLRMKITE LDKDLEEVTM QLQDVGGC) o SEQ ID NO: 14 (Cys: AGSC) o SEQ ID

NO: 15 (bisagra: CPPCPG). La molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de la cubierta o la proteína adaptadora está comprendida dentro de un intrón sintético. El intrón sintético está localizado entre el ácido nucleico que codifica el dominio VH y el ácido nucleico que codifica el Fc. El intrón sintético comprende además un ácido nucleico que codifica un intrón natural de IgG1 en el que el intrón natural se puede seleccionar del grupo que comprende el intrón 1, el intrón 2 o el intrón 3 de IgG1.

En un aspecto de la divulgación, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en la que en células procariotas, se expresa una primera proteína de fusión y en células eucariotas, se expresa una segunda proteína de fusión. La primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión pueden ser iguales o diferentes. En otro aspecto de la divulgación, la primera proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de fago-Fab (por ejemplo, la proteína de fusión de fago-Fab comprende VH/CH1 fusionado con la pIII) y la segunda fusión puede ser una proteína de fusión Fc-Fab o Fc-bisagra-Fab (por ejemplo, la proteína de fusión Fc-Fab o Fc-bisagra-Fab comprende VH/CH1 fusionado con Fc).

En un aspecto de la divulgación, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en la que la secuencia señal dirige la secreción de proteínas al retículo endoplásmico o fuera de la célula en células eucariotas y/o en la que la secuencia señal dirige la secreción de proteínas al periplasma o fuera de la célula en las células procariotas. Además, la secuencia señal se puede codificar por una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (XMKFTVVAAALLLLGAVRA, en la que X = 0 aminoácidos o 1 o 2 aminoácidos (por ejemplo, X = M (SEQ ID NO: 3; MMKFTVVAAALLLLGAVRA; mBIP natural) o X = MT (SEQ ID NO: 19; MTMKFTVVAAALLLLGAVRA) o X está ausente (SEQ ID NO: 20; MKFTVVAAALLLLGAVRA) o por una secuencia de ácido nucleico que codifica mBIP (SEQ ID NO: 4; ATG ATG AAA TTT ACC GTG GTG GCG GCG GCG CTG CTG CTG CTG GCG GCG GTC CGC GCG), y variantes de las mismas, o por una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos de mBIP), y en la que la secuencia señal funciona tanto en células procariotas como en eucariotas, o por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11 (secuencia consenso de mBIP, X ATG AAN TTN ACN GTN GTN GCN GCN GCN CTN CTN CTN CTN GGN GCN GTN CGN GCN, en la que N = A, T, C o G, en la que X = ATG (SEQ ID NO: 5; ATG ATG AAN TTN ACN GTN GTN GCN GCN GCN CTN CTN CTN CTN GGN GCN GTN CGN GCN), X = ATG ACC (SEQ ID NO: 21; ATG ACC ATG AAN TTN ACN GTN GTN GCN GCN GCN CTN CTN CTN CTN GGN GCN GTN CGN GCN) o X = está ausente (SEQ ID NO: 22; ATG AAN TTN ACN GTN GTN GCN GCN GCN CTN CTN CTN CTN GGN GCN GTN CGN GCN). o por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 16 (mBIP.Opt1: ATG ATG AAA TTT ACC GTT GTT GCT GCT GCT CTG CTA CTT CTT GGA GCG GTC CGC GCA), SEQ ID NO: 17 (mBIP.Opt2: ATG ATG AAA TTT ACT GTT GTT GCG GCT GCT CTT CTC CTT CTT GGA GCG GTC CGC GCA) y SEQ ID NO: 18 (mBIP.Opt3: ATG ATG AAA TTT ACT GTT GTC GCT GCT GCT CTT CTA CTT CTT GGA GCG GTC CGC GCA).

En otro aspecto de la divulgación, el intrón sintético en la molécula de ácido nucleico está flanqueado por el ácido nucleico que codifica el CH1 en su extremo 5' y el ácido nucleico que codifica el Fc en su extremo 3'. Además, el ácido nucleico que codifica el dominio CH1 comprende una porción de la secuencia donante de empalme natural y el ácido nucleico que codifica el Fc comprende una porción de la secuencia aceptora de empalme natural. De forma alternativa, el ácido nucleico que codifica el dominio CH1 comprende una porción de una secuencia donante de empalme modificada en la que la secuencia donante de empalme modificada comprende la modificación de al menos un residuo de ácido nucleico y en la que la modificación incrementa el empalme.

En un aspecto de la divulgación, el activador procariótico es el activador de PhoA, Tac, Tphac o Lac y/o el activador eucariótico es la secuencia del CMV o el SV40 o la región U3 del virus de la leucemia murina de Moloney o la región U3 del virus de la artritis-encefalitis caprina o la región U3 del virus de Visna o la región U3 retroviral. La expresión por el activador procariótico se produce en una célula de bacterias y la expresión por un activador eucariótico se produce en una célula de mamífero. En otro aspecto de la divulgación, la célula de bacterias es una célula de *E. coli* y la célula eucariota es una célula de levadura, célula CHO, célula 293 o célula NSO.

En otro aspecto de la divulgación, la presente invención proporciona un vector que comprende las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento y/o una célula huésped transformada con dichos vectores. La célula huésped puede ser una célula bacteriana (por ejemplo, una célula de *E. coli*) o una célula eucariota (por ejemplo, una célula de levadura, una célula CHO, una célula 293 o una célula NSO).

En otro aspecto de la divulgación, la presente solicitud proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped descrita en el presente documento de modo que se exprese el ácido nucleico. El procedimiento comprende además recuperar el anticuerpo expresado por la célula huésped y en el que el anticuerpo se recupera del medio de cultivo de la célula huésped.

En un aspecto, la divulgación proporciona una proteína adaptadora que comprende una modificación de al menos

un residuo de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, 12, 13, 14 o 15. En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 (ASIALRLRLRKYKTLRARNYELRSRANMLRERVAQLGGC) o SEQ ID NO: 7 (ASLDELEAEIEQLEENYALEKEIEDLEKELEKLGCC). En un modo de realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas adaptadoras.

En un aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de mBiP que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o variantes de la misma, que es funcional tanto en células procariontas como eucariotas, o un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con un 85 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para expresar un polipéptido de mBiP que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 tanto en células procariontas como eucariotas. En un modo de realización, la invención proporciona una célula bacteriana que expresa una secuencia de mBiP que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, la invención proporciona que el intrón sintético está localizado entre el ácido nucleico que codifica el dominio VH y el ácido nucleico que codifica el Fc o la bisagra del anticuerpo, entre el ácido nucleico que codifica el dominio CH2 y el CH3 del anticuerpo, entre el ácido nucleico que codifica la región bisagra y el dominio CH2 del anticuerpo.

En un aspecto, la invención comprende un polipéptido que comprende una secuencia señal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o variantes de la misma, un dominio de la cadena pesada variable (VH) y un dominio de la cadena ligera variable (VL) en el que el dominio VH está conectado al extremo N del dominio VL, o un polipéptido que comprende una secuencia señal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o variantes de la misma, un dominio de la cadena pesada variable (VH) y un dominio de la cadena ligera variable (VL) en el que el dominio VH está conectado al extremo C del dominio VL, o un polipéptido que comprende una secuencia señal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una VH-HVR1, VH-HVR2 y VH-HVR3 de un dominio de la cadena pesada variable (VH), o un polipéptido que comprende una secuencia señal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una VL-HVR1, VL-HVR2 y VL-HVR3 de un dominio de la cadena ligera variable (VL), o un polipéptido que comprende una secuencia señal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o variantes de la misma, una VH-HVR1, VH-HVR2 y VH-HVR3 de un dominio de la cadena pesada variable (VH) y una VL-HVR1, VL-HVR2 y VL-HVR3 de un dominio de la cadena ligera variable (VL). En un modo de realización, el polipéptido de la invención es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención se puede seleccionar del grupo que consiste en los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fv, diacuerpos y moléculas de anticuerpo monocatenario.

En un aspecto, la invención comprende un fago auxiliar mutante para potenciar la presentación en fagos de proteínas. En un aspecto de la divulgación, la secuencia de nucleótidos de un fago auxiliar que comprende una mutación ámbar en pIII en la que el fago auxiliar que comprende una mutación ámbar potencia la presentación de proteínas fusionadas con pIII en el fago. En otro aspecto de la divulgación, la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 70 en la que la mutación ámbar es una mutación en los nucleótidos 2613, 2614 y 2616 del ácido nucleico para M13KO7. En incluso otro aspecto de la divulgación, la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 71 en la que la mutación en los nucleótidos 2613, 2614 y 2616 del ácido nucleico para M13KO7 introduce un codón de parada ámbar.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. (A) ELISA del fago Her2 del fago purificado que presenta Fab anti-Her2 bajo el control de cuatro secuencias señal eucarióticas diferentes (mBiP, *Gaussia princeps*, yBGL2, hGH). La secuencia señal procarionta de enterotoxina II termoestable (STII) comúnmente usada en los fagómidos sirve como punto de referencia. (B) Presentación en fagos de Fab anti-Her2 fusionado con la secuencia señal de mBiP eucariótica natural (mBiP.wt) y las versiones optimizadas de codón obtenidas mediante la exploración de la colección de fagos (mBiP.Opt1, mBiP.Opt2 y mBiP.Opt3 (SEQ ID NO: 16-18)).

Figura 2. (A) Rendimientos de expresión de 30 ml de cultivos en suspensión de células 293 de clones individuales y (B) datos estadísticos agregados para los clones de hlgG1 expresados como fusiones con la mBiP eucariótica o bien la secuencia señal de HC (VHS) de IgG natural procarionta.

Figura 3. (A) Estructura genómica de la HC de IgG1 humana que contiene tres intrones naturales. El intrón 1 se produce inmediatamente antes de la región bisagra. (B) Construcción de HC que contiene un intrón sintético derivado del intrón 1 o 3 y que contiene un péptido de fusión adaptador de fago. El intrón sintético está flanqueado por el donante de empalme de intrón natural (D) y el aceptor (A) del intrón 1 o 3. (C) Construcción de HC que contiene un intrón sintético derivado del intrón 1 o 3 y que contiene una proteína de fusión de la cubierta de fago. El intrón sintético está flanqueado por el donante de empalme de intrón natural (D) y el aceptor (A) del intrón 1 o 3. Tanto la construcción (B) como la (C) contienen un codón de PARADA en el extremo 3' de la secuencia peptídica adaptadora o de proteína de la cubierta de fago.

- Figura 4. (A) Niveles de expresión de IgG h4D5 de construcciones que no contienen ningún intrón, contienen un intrón sintético que contiene un péptido adaptador de fago (véase la figura 3B), o bien contienen un intrón sintético que contiene una proteína de la cubierta de fago (gen III, véase la figura 3C). (B) RT-PCR de la HC de hlgG1 de células transfectadas. El tamaño predicho para un ARNm de HC apropiadamente empalmado es de 1.650 nt. La banda superior en la construcción de adaptador + intrón 1 representa un ARNm precursor no empalmado. La banda inferior en las construcciones que contienen el adaptador y el gen III se empalma incorrectamente por un donante de empalme encriptado en el VH.
- Figura 5. (A) Mutaciones puntuales generadas en el donante de empalme del intrón 1 natural para incrementar la conformidad con el donante de empalme de consenso para los ARNm de mamífero. (B) La optimización del donante de empalme del intrón elimina la acumulación de ARNm de la HC no empalmado e incorrectamente empalmado y (C) incrementa la expresión en células de mamífero hasta el nivel observado cuando no hay intrones presentes
- Figura 6. (A) Modulación de la presentación usando pDV.5.0 y KO7 natural (presentación monovalente) o bien KO7 adaptador (presentación polivalente). (B) Expresión de cuatro mAb diferentes de pDV.5.0 en tres líneas celulares de mamífero diferentes.
- Figura 7. Esquema del vector para la expresión y secreción de polipéptidos en células procariotas y eucariotas. El intrón sintético puede contener una secuencia adaptadora o bien una secuencia de proteína de la cubierta de fago junto con cualquiera de las secuencias de intrones naturales de hlgG1. Tanto la HC como la LC pueden tener: 1) activadores bacterianos Y de mamífero en dirección 5' del ORF, 2) un activador bacteriano SOLAMENTE en dirección 5' del ORF (véase también la figura 14), o bien 3) un activador de mamífero solo en dirección 5' del ORF. Se muestra una construcción en la que tanto la HC como la LC tienen ambos tipos de activadores. El casete que contiene el gen III con una fusión de péptido adaptador (pDV5.0, mostrada) solo está presente cuando el intrón sintético contiene una fusión de péptido adaptador, pero no cuando está presente una fusión de proteína de la cubierta de fago en el intrón sintético.
- Figura 8. Secuencia de nucleótidos de la pIII (nucleótidos 1579 a 2853 (SEQ ID NO: 24)) del fago auxiliar mutante KO7 ámbar para potenciar la presentación de proteínas fusionadas con pIII en el fago M13. KO7 ámbar tiene un codón ámbar introducido en el genoma del fago auxiliar M13KO7 por mutagénesis dirigida al sitio. Los residuos subrayados son mutaciones en los nucleótidos 2613, 2614 y 2616 (T2613C, C2614T y A2616G) que introducen una parada ámbar (MARCA) en el codón 346 y una mutación sinónima para un sitio de restricción AvrII en el codón 345 del gen III M13KO7. El nucleótido 1 de M13KO7 es el tercer residuo del sitio de restricción HpaI único.
- Figura 9. Presentación potenciada de fragmentos Fab en pIII del fago M13 mediante el uso del fago auxiliar KO7 ámbar. Un fagómido de alta presentación convencional con M13KO7 natural (rombos huecos) impulsa los niveles de presentación de Fab significativamente más alto que los obtenidos por un vector de fagómido de baja presentación (cuadrados sólidos) cuando se usa M13KO7 natural para la producción de fagos. El uso de un M13KO7 modificado que alberga una mutación ámbar en pIII (KO7 ámbar) incrementa el nivel de presentación del fagómido de baja presentación (triángulos sólidos) con respecto al del fagómido de alta presentación con M13KO7 natural (rombos huecos).
- La figura 10 es un gráfico de barras que muestra la unión (como se mide por ELISA de fagos) de clones seleccionados de la clasificación de la colección de fagos de una colección de Fab-fago de vectores dobles indiferenciados del ejemplo 5 frente al VEGF inmovilizado. Los clones individuales se escogieron después de cuatro rondas de selección y los sobrenadantes de fagos se sometieron a prueba para determinar la unión a antígeno (VEGF) inmovilizado y a una proteína irrelevante (Her2) para evaluar la especificidad de unión.
- La figura 11 muestra el cribado de clones de fagos seleccionados en formato de IgG por BIAcore para determinar la unión a antígeno con respecto al VEGF, como se mide por un ensayo de captura de Fc en un instrumento BIAcore T100. Los 96 clones que se escogieron para el análisis de secuencia y ELISA de fagos se transfectaron en células 293S (1 ml) y se cultivaron durante siete días para la expresión de IgG. Los sobrenadantes se filtraron en 0,2 µm y se usaron para evaluar la unión a antígeno VEGF mediante un ensayo de captura de Fc en un instrumento BIAcore T100.
- La figura 12 muestra las secuencias de fijadores positivos del experimento de exploración de VEGF en el ejemplo 5. Se muestra la secuencia de la CDR de la cadena pesada para ocho clones (VEGF50 (SEQ ID NO 25-27, respectivamente, en orden de aparición), VEGF51 (SEQ ID NO 28-30, respectivamente, en orden de aparición), VEGF 52 (SEQ ID NO 31-33, respectivamente, en orden de aparición), VEGF59 (SEQ ID NO 34-36, respectivamente, en orden de aparición), VEGF55 (SEQ ID NO 37-39, respectivamente, en orden de aparición), VEGF60 (SEQ ID NO 40-42, respectivamente, en orden de aparición), VEGF61 (SEQ ID NO 43-45, respectivamente, en orden de aparición) y VEGF64 (SEQ ID NO 46-48, respectivamente, en orden de aparición)). Todos los clones comparten la misma secuencia de la CDR de la cadena ligera.

La figura 13 muestra la capacidad de las IgG anti-VEGF seleccionadas de la clasificación de fagos frente a VEGF para inhibir la unión de VEGF a uno de sus receptores naturales, VEGF-R1. Los anticuerpos seleccionados de la clasificación frente a VEGF se expresaron en células CHO y se usó IgG purificada para medir la capacidad de los clones seleccionados para inhibir la unión de VEGF a VEGF-R1. Un clon (VEGF55) inhibió la unión de VEGF-R1 con una CI50 que estaba dentro de 3,5 veces de bevacizumab (Avastin).

La figura 14 muestra un esquema del vector para la expresión y secreción de polipéptidos en células procariotas y eucariotas, en el que el intrón sintético contiene pIII, junto con cualquiera de las secuencias de intrones naturales de hIgG1 y en el que la LC tiene un activador bacteriano en dirección 5' del ORF y la HC tiene un activador bacteriano y de mamífero en dirección 5' del ORF. A diferencia del vector mostrado en la figura 7, este vector (pDV6.5) no requiere un casete gIII adicional para la fusión con partículas de fago. Las proteínas resultantes de la expresión en células de *E. coli* y mamífero se muestran a continuación del esquema del vector. Las líneas discontinuas indican los intrones en el transcrito de la cadena pesada empalmado en células de mamífero. Téngase en cuenta que parte de la secuencia que codifica la bisagra de IgG1 se repite en el vector para permitir la inclusión tanto en proteínas expresadas en células de *E. coli* como de mamífero.

La figura 15 muestra las propiedades de IgG anti-VEGF de longitud completa expresadas de pDV6.5. Las IgG se expresaron en 100 ml de cultivos de células CHO transfectadas y se purificaron por cromatografía de proteína A. Los rendimientos finales de IgG purificada se indican junto con la puntuación en ELISA de baculovirus usado para medir la unión no específica. También se indica la unión positiva o negativa de cada clon en formato de fago (ELISA de fagos) o formato de IgG (BIAcore).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

### I. DEFINICIONES

El término "intrón sintético" en el presente documento se usa para definir un segmento de ácido nucleico que está situado entre el ácido nucleico que codifica el CH1 y el ácido nucleico que codifica la bisagra-Fc o Fc. El "intrón sintético" puede ser cualquier ácido nucleico que no codifique la síntesis de proteínas, cualquier ácido nucleico que codifique la síntesis de proteínas, tal como una proteína de la cubierta o una proteína de la partícula de fago (por ejemplo, pI, pII, pIII, pIV, pV, pVI, pVII, pVIII, pIX, pX), o una proteína adaptadora (por ejemplo, una cremallera de leucinas, etc.), o cualquier combinación de las mismas. En un aspecto de la divulgación, el "intrón sintético" comprende parte de una secuencia donante de empalme y una secuencia aceptora de empalme que permite un acontecimiento de empalme. Las secuencias donante de empalme y aceptora de empalme permiten el acontecimiento de empalme y pueden comprender secuencias de ácido nucleico naturales o sintéticas.

El término "polipéptido de utilidad" en el presente documento se usa para referirse a un polipéptido que es útil para una serie de actividades, tal como útil para la purificación de proteínas, marcaje de proteínas, marcado de proteínas (por ejemplo, marcado con un compuesto o composición detectable (por ejemplo, marcador radioactivo, marcador fluorescente o marcador enzimático). Un marcador se puede conjugar indirectamente con una cadena lateral de aminoácido, una cadena lateral de aminoácido activado, un anticuerpo genomanipulado con cisteína y similares. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres categorías amplias de marcadores mencionados anteriormente se puede conjugar con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la estreptavidina y, por tanto, el marcador se puede conjugar con el anticuerpo de esta manera indirecta. De forma alternativa, para lograr la conjugación indirecta del marcador con la variante polipeptídica, la variante polipeptídica se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con una variante polipeptídica antihapteno (por ejemplo, anticuerpo antidigoxina). Por tanto, se puede lograr la conjugación indirecta del marcador con la variante polipeptídica (Hermanson, G. (1996) en Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego).

El ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando está ubicado en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está enlazado de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un activador o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si se sitúa de manera que facilite la traducción. En general, "enlazado de forma funcional" significa que las secuencias de ADN enlazadas existen en una molécula de ácido nucleico de tal manera que tienen una relación funcional entre sí como ácidos nucleicos o como proteínas que se expresan por ellos. Pueden ser contiguas o no. En el caso de una secuencia líder secretora, a menudo son contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se consigue por fijación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se pueden usar los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos.

Los dominios VH o VL están "enlazados" a un fago cuando el ácido nucleico que codifica la secuencia de proteína heteróloga (por ejemplo, los dominios VH o VL) se inserta directamente en el ácido nucleico que codifica una proteína de la cubierta de fago (por ejemplo, pII, pVI, pVII, pVIII o pIX). Cuando se introduce en una célula procariota, se producirá un fago en el que la proteína de la cubierta puede presentar los dominios VH o VL. En un



divulgación, la "proteína adaptadora" comprende un dominio de heteromultimerización. En un aspecto de la divulgación, la proteína adaptadora es una proteína cJUN o una proteína Fos. En otro modo de realización, la proteína adaptadora comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6

5

(ASLARLRERVKTLRARNYELRSRANMLRERVAQLGGC) o SEQ ID NO: 7  
(ASLDELEAEIEQLEEEENYALEKEIEDLEKELEKLGCC).

10 Como se usa en el presente documento, "dominio de heteromultimerización" se refiere a alteraciones o adiciones a una molécula biológica de manera que se promueva la formación de heteromultímeros y se impida la formación de homomultímeros. Cualquier dominio de heterodimerización que tenga una preferencia fuerte para formar heterodímeros sobre homodímeros está dentro del alcance de la invención. Los ejemplos ilustrativos incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. 20030078385 (Arathoon *et al.* - Genentech; que describe botón en ojales); el documento WO2007147901 (Kjærsgaard *et al.* - Novo Nordisk; que describe interacciones iónicas); el documento WO 2009089004 (Kannan *et al.* - Amgen; que describe efectos de conducción electrostática); el documento WO 2011/034605 (Christensen *et al.* - Genentech; que describe superhélices). Véase también, por ejemplo, Pack, P. & Plueckthun, A., *Biochemistry* 31, 1579-1584 (1992) que describe la cremallera de leucinas o Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11, 1271-1277 (1993) que describe el motivo de hélice-giro-hélice. La frase "dominio de heteromultimerización" y "dominio de heterodimerización" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

15

20 El término "proteína de fusión de Fab" se usa en el presente documento para referirse a una proteína de fusión de fago-Fab en células procariotas y/o proteína de fusión Fc-Fab en células eucariotas. La fusión Fc-Fab también puede ser una fusión Fc-bisagra-Fab.

25

Se usa el término "anticuerpo" en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bispecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

30

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

35

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente.

40

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un aspecto de la divulgación, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

45

"Región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

50

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

55

Los términos "célula huésped", "línea celular huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que

60

65

incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede que no sea completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, residuos aminoacídicos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Los bucles hipervariables ejemplares se producen en los residuos aminoacídicos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos aminoacídicos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden en general los residuos aminoacídicos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de la especificidad" o "SDR", que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos aminoacídicos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados aspectos de la divulgación, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos aspectos de la divulgación, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para la evaluación de la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades insignificantes. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana; estando descritos en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no se conjuga con un resto heterólogo (por ejemplo,

un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen con enlaces disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural en general tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al. Kuby Immunology*, 6.<sup>a</sup> ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al., J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al., Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

## II. DESCRIPCIÓN DETALLADA

El procedimiento de descubrimiento de anticuerpos basados en fagos utiliza tecnología de presentación en fagos para seleccionar fragmentos Fab con especificidades de unión deseadas de grandes grupos de clones de fagos individuales<sup>1-3</sup>. En este enfoque, las colecciones de fagos comprendidas por fragmentos Fab fusionados con partículas de fago filamentoso M13, directa o bien indirectamente a través de una de las principales proteínas de la cubierta y que contienen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) diversificadas, se generan usando técnicas de biología molecular establecidas y vectores de presentación en fagos especializados (Tohidkia *et al., Journal of drug targeting*, 20: 195-208 (2012); Bradbury *et al., Nature biotechnology*, 29: 245-254 (2011); Qi *et al., Journal of molecular biology*, 417: 129-143 (2012)). Si bien la diversidad teórica de dichas colecciones puede superar fácilmente  $10^{25}$  secuencias únicas, limitaciones prácticas en la construcción de grupos de fagos típicamente restringe la diversidad real a  $\leq 10^{11}$  clones para una colección dada (Sidhu *et al., Methods in Enzymology*, 328: 333-363 (2000)).

Dado el número sustancial de secuencias únicas que puede contener una colección de partida, el rendimiento de cribado de los clones seleccionados es de crucial importancia. Para el descubrimiento de anticuerpos basados en fagos, una evaluación exhaustiva de los Fab seleccionados y las propiedades de sus IgG de longitud completa análogas en ensayos funcionales (unión a dianas, ensayos de actividad basados en células, semivida *in vivo*, etc.) requiere el reformateo de las secuencias de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) de Fab en una IgG de longitud completa subclonando las secuencias de ADN que codifican la HC y la LC fuera del vector fagómico usado para la presentación y en vectores de expresión de mamífero para la expresión de IgG. El laborioso procedimiento de subclonar docenas o cientos de pares de HC/LC seleccionados representa un importante cuello de botella en el procedimiento de descubrimiento de anticuerpos basados en fagos. Además, puesto que un porcentaje sustancial de los Fab seleccionados, una vez reformateados, no tienen un funcionamiento satisfactorio en los ensayos de cribado iniciales, el incremento del número de clones transportados a través de este procedimiento de reformateo/cribado incrementa en gran medida la probabilidad final de éxito.

Aquí, se describe la generación de un sistema de expresión y secreción para la expresión y secreción de una proteína de fusión de Fab en células procariotas y una de fusión de Fab distinta (o idéntica) en células eucariotas. Por ejemplo, el sistema de expresión y secreción impulsa la expresión de una fusión Fab-fago cuando se transforma en *E. coli*, e impulsa la expresión de una IgG de longitud completa que porta el mismo fragmento Fab cuando se transfecta a células de mamífero. Se demuestra que una secuencia señal de mamífero de la proteína de inmunoglobulina de

unión murina (mBiP)<sup>8 9</sup> puede impulsar la expresión de proteína eficaz tanto en células procariotas como eucariotas. Usando el empalme de ARNm de mamífero para eliminar un intrón sintético que contiene un péptido de fusión de fago insertado dentro de la región bisagra de la HC de IgG<sub>1</sub> humana, se pueden generar dos proteínas distintas de una forma dependiente de la célula huésped: un fragmento Fab fusionado con un péptido adaptador para la presentación en fagos en *E. coli* e IgG<sub>1</sub> humana natural en células de mamífero. Esta tecnología permite la selección de fragmentos Fab que se unen a un antígeno de interés de una colección de presentación en fagos con la posterior expresión y purificación de las IgG de longitud completa análogas en células de mamífero sin necesidad de subclonación.

La invención se basa, en parte, en hallazgos experimentales que demuestran que (1) las secuencias señal de origen no bacteriano funcionan en células procariotas a niveles suficientes para la clasificación de colecciones de fagos sin comprometer la expresión de IgG en células eucariotas, y (2) diferentes proteínas de fusión de Fab se expresan a partir de la misma molécula de ácido nucleico de manera dependiente de la célula huésped cuando el procesamiento del ARNm se produce en células eucariotas, pero no en células procariotas (proteínas de fusión de fago-Fab en células procariotas y proteínas de fusión Fc-Fab en células eucariotas). Por consiguiente, en el presente documento se describe un sistema de expresión y secreción para la expresión y secreción de un fragmento Fab fusionado con una proteína de partícula de fago, proteína de la cubierta o proteína adaptadora para presentación en fagos en células huésped procariotas (por ejemplo, *E. coli*) y un fragmento Fab fusionado con Fc en células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero), sin necesidad de subclonación, y procedimientos relacionados con la construcción y el uso del sistema de expresión y secreción. En particular, en el presente documento se describen los vectores para la expresión y secreción de una proteína de fusión de fago-Fab en células procariotas y una proteína de fusión Fc-Fab en células eucariotas, las moléculas de ácido nucleico para la expresión y secreción o las proteínas o los péptidos en células procariotas y eucariotas, y las células huésped que comprenden dichos vectores. Además, en el presente documento se describen los procedimientos de uso del sistema de expresión y secreción, incluyendo los procedimientos de uso del sistema de expresión y secreción para cribado y selección de anticuerpos novedosos frente a proteínas de interés.

#### Modos de llevar a cabo la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican con detalle en la literatura, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2.<sup>a</sup> edición (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology", 4.<sup>a</sup> edición (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994); y "Current Protocols in Immunology" (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991).

#### Sistema de expresión y secreción para células procariotas y eucariotas

El sistema de expresión y secreción para células procariotas y eucariotas implica un vector que contiene las secuencias reguladoras y codificantes para una proteína de interés (por ejemplo, las cadenas pesadas o ligeras de una molécula de IgG), en el que los activadores procarióticos y eucarióticos (por ejemplo, CMV (eucariótico) y PhoA (procariótico)) se organizan en tándem en dirección 5' del/de los gen(es) de interés, y una única secuencia señal impulsa la expresión de la proteína de interés en células procariotas y eucariotas. La presente invención proporciona un medio para que este vector genere dos formas de fusión diferentes de la proteína de interés de una manera dependiente de la célula huésped usando un intrón sintético localizado entre el VH/CH1 y la región bisagra-Fc de IgG<sub>1</sub>, en el que el intrón sintético se empalma durante el procesamiento de ARNm en células eucariotas.

#### A. Secuencia señal que funciona tanto en células procariotas como en células eucariotas

Un desafío en la construcción de un vector que pueda expresar proteínas de interés tanto en células procariotas (*E. coli*) como eucariotas (de mamífero) surge de las diferencias en las secuencias señal encontradas en estos tipos de células. Si bien determinadas características de las secuencias señal se conservan en general tanto en células procariotas como en eucariotas (por ejemplo, un parche de residuos hidrófobos localizados en la mitad de la secuencia y residuos polares/cargados adyacentes al sitio de escisión en el extremo N del polipéptido maduro), otras son más características de un tipo de célula que las otras. Además, se sabe en la técnica que diferentes secuencias señal pueden tener un impacto significativo en los niveles de expresión en células de mamífero, incluso si las secuencias son todas de origen mamífero (Hall *et al.*, *J of Biological Chemistry*, 265: 19996-19999 (1990); Humphreys *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 20: 252-264 (2000)). Por ejemplo, las secuencias señal bacterianas típicamente tienen residuos cargados positivamente (más comúnmente lisina) directamente después de la metionina de inicio, mientras que estos no siempre están presentes en las secuencias señal de mamífero. Si bien existen secuencias señal conocidas que pueden dirigir la secreción en ambos tipos de células, dichas secuencias señal típicamente dirigen altos niveles de secreción de proteínas en un solo tipo de célula o en el otro.

Si bien se ha demostrado muy raramente que las secuencias señal bacterianas presentan alguna funcionalidad en las células de mamífero, ha habido informes de que las secuencias señal de origen mamífero pueden impulsar la translocación al periplasma de bacterias (Humphreys *et al.*, *The Protein Expression and Purification*, 20: 252-264 (2000)). Sin embargo, la mera funcionalidad de la secuencia señal no es adecuada para un sistema de expresión doble consistente que se va a usar para la presentación en fagos y la expresión de IgG. Más bien, la secuencia señal seleccionada debe funcionar bien en ambos sistemas de expresión, en particular para la presentación en fagos donde los niveles bajos de presentación comprometerían la capacidad del sistema para realizar experimentos de exploración de fagos.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que las secuencias señal de origen no bacteriano funcionan en células procariotas a niveles suficientes para clasificar colecciones de fagos sin comprometer la expresión de IgG en células eucariotas.

La presente invención proporciona que se puede usar cualquier secuencia señal (incluyendo las secuencias señal de consenso) que dirige al polipéptido de interés hacia el periplasma en procariotas y hacia el endoplasma/retículo en eucariotas. Las secuencias señal que se pueden usar incluyen pero no se limitan a la secuencia señal de la proteína de inmunoglobulina de unión murina (mBiP) (UniProtKB: acceso P20029), secuencias señal de la hormona del crecimiento humana (hGH) (UniProtKB: acceso BIA4G6), luciferasa de *Gaussia princeps* (UniProtKB: acceso Q9BLZ2), endo-1,3-glucanasa de levadura (yBGL2) (UniProtKB: acceso P15703). En un aspecto de la divulgación, la secuencia señal es una secuencia señal natural o sintética. En otro aspecto de la divulgación, la secuencia señal sintética es una secuencia de secreción señal optimizada que impulsa los niveles de presentación a un nivel optimizado en comparación con su secuencia señal natural no optimizada.

Un ensayo adecuado para determinar la capacidad de las secuencias señal para impulsar la presentación de polipéptidos de interés en células procariotas, incluye, por ejemplo, ELISA de fagos, como se describe en el presente documento.

Un ensayo adecuado para determinar la capacidad de las secuencias señal para impulsar la expresión de polipéptidos de interés en células eucariotas incluye, por ejemplo, la transfección de vectores de expresión de mamífero que codifican los polipéptidos de interés con la señal de interés en células de mamífero cultivadas, haciendo crecer las células durante un período de tiempo, recogiendo los sobrenadantes de las células cultivadas y purificando la IgG de los sobrenadantes por cromatografía de afinidad, como se describe en el presente documento.

#### B. Intrón sintético que da como resultado la expresión de proteínas de fusión dependientes del huésped del mismo ácido nucleico

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que diferentes proteínas de fusión de Fab se pueden expresar a partir de la misma molécula de ácido nucleico de una manera dependiente de la célula huésped aprovechando el proceso natural de empalme de intrones que se produce durante el procesamiento del ARNm en células eucariotas, pero no procariotas.

La secuencia genómica de la región constante de la HC de hIgG1 contiene tres intrones naturales (figura 3A), el intrón 1, el intrón 2 y el intrón 3. El intrón 1 es un intrón de 391 pares de bases situado entre el dominio variable de la HC/CH1 (VH/CH1) y la región bisagra. El intrón 2 es un intrón de 118 pares de bases situado entre la región bisagra y CH2. El intrón 3 es un intrón de 97 pares de bases situado entre CH2 y CH3.

La presente invención proporciona un vector que comprende el intrón 1 situado entre el VH/CH1 y la región bisagra. Otros ejemplos, incluyen el intrón 2 o el intrón 3 situado entre el VH/CH1 y la región bisagra. Para algunos vectores, el ácido nucleico que codifica una proteína de la cubierta o una proteína adaptadora se inserta en el intrón situado entre VH/CH1 y la región bisagra con el donante de empalme natural para el intrón en su extremo 5' y el aceptor de empalme natural en su extremo 3'.

Otros ejemplos, incluyen un donante de empalme mutante con sustituciones en las posiciones 1 y 5 de las 8 posiciones del donante de empalme.

Por ejemplo, se puede usar ELISA de fagos para analizar el sistema de expresión y secreción en células procariotas.

Por ejemplo, se puede usar purificación de IgG de sobrenadantes de cultivo usando cromatografía de filtración en gel y proteína A para analizar el sistema de expresión y secreción en células eucariotas. Además, se puede usar RT-PCR para analizar el empalme del casete de HC que contiene el intrón sintético en células eucariotas.

#### C. Vector para la expresión y secreción de polipéptidos en células procariotas y eucariotas

El sistema de expresión y secreción para la expresión y secreción de proteínas de fusión de Fab en células procariotas y eucariotas se puede construir usando una variedad de técnicas que están dentro de la experiencia de la técnica.

5 En un aspecto, el sistema de expresión y secreción comprende un vector que comprende: (1) un activador de mamífero, (2) el casete de LC, que comprende (en orden de 5' a 3') un activador bacteriano, una secuencia señal, una secuencia de cadena ligera de anticuerpo, una proteína de control (gD); (3) el casete sintético que comprende (en orden de 5' a 3') una poliadenilación de mamífero/señal de parada de la transcripción, una secuencia finalizadora de la transcripción para detener la transcripción en células procariotas, un activador de mamífero y un  
10 activador bacteriano para impulsar la expresión de la HC; (4) el casete de HC, que comprende una secuencia señal y una secuencia de cadena pesada de anticuerpo; y (5) el segundo casete sintético que comprende una poliadenilación de mamífero/señal de parada de la transcripción y una secuencia finalizadora de la transcripción para detener la transcripción en células procariotas. La secuencia señal de secreción que precede a la LC y HC puede ser la misma secuencia señal que funciona tanto en células procariotas como en células eucariotas (por ejemplo, la secuencia señal de mBiP de mamífero). En un modo de realización, la secuencia de cadena pesada del anticuerpo comprende un intrón sintético. El intrón sintético se sitúa con el dominio VH/CH1 (en su extremo 5') y la región bisagra (en su extremo 3'). En un aspecto de la divulgación, el intrón sintético está flanqueado por una secuencia donante de empalme optimizada en el extremo 5' y la secuencia aceptora de empalme del intrón 1 natural en el extremo 3'. En un aspecto de la divulgación, el intrón sintético comprende una secuencia de  
20 nucleótidos que codifica una proteína de la cubierta de fago (por ejemplo, pIII) para la presentación de fusión directa (véase la figura 14), o una proteína adaptadora fusionada a nivel nucleotídico con el intrón 1 para la presentación de fusión indirecta (véase la figura 7). Para la presentación de fusión indirecta, el vector comprende además un casete de expresión bacteriano separado que comprende (en orden de 5' a 3') el activador bacteriano, una secuencia señal bacteriana, una proteína de la cubierta de fago (por ejemplo, pIII) con un péptido adaptador compañero fusionado a nivel nucleotídico con el extremo N de la proteína de la cubierta y una secuencia finalizadora de la transcripción (véase la figura 7). Además, son posibles diferentes aspectos de la divulgación de las construcciones anteriores en los que tanto la HC como la LC están controladas por un activador de mamífero y bacteriano en tándem (véase la figura 7) o solo un casete (por ejemplo, la HC) está controlado por los activadores de mamífero y bacteriano en tándem, mientras que el otro casete (por ejemplo, la LC) está controlado solo por un  
30 activador bacteriano (véase la figura 14).

Además, el vector incluye un origen de replicación bacteriano, un origen de replicación de mamífero, ácido nucleico que codifica polipéptidos útiles como control (por ejemplo, la proteína gD) o útiles para actividades tales como una purificación de proteínas, marcaje de proteínas, marcado de proteínas (por ejemplo, marcado con un compuesto o composición detectable (por ejemplo, marcador radiactivo, marcador fluorescente o marcador enzimático).  
35

En un aspecto de la divulgación, los activadores de mamífero y bacteriano y las secuencias señal están enlazados de forma funcional a la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo y los activadores de mamífero y bacteriano y las secuencias señal están enlazados de forma funcional a la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo.  
40

#### D. Selección y cribado de anticuerpos frente a antígenos de interés

La presente invención proporciona un procedimiento para cribar y seleccionar anticuerpos frente a proteínas de interés mediante la presentación en fagos o bacterias de colecciones basadas en Fab o para optimizar anticuerpos existentes mediante procedimientos similares. El uso del vector doble descrito anteriormente se puede usar para cribar y seleccionar fragmentos Fab en células procariotas, y la selección de Fab que se pueden expresar fácilmente como moléculas de IgG de longitud completa para pruebas adicionales sin necesidad de subclonación.  
45

#### Anticuerpos de la invención

50 En otro aspecto de la invención, un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un modo de realización, un anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')<sub>2</sub>. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.  
55

En otro aspecto, un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 1-7 a continuación:  
60

#### **1. Afinidad de anticuerpos**

65 En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$  o  $\leq 0.001 \text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ).

En un aspecto de la divulgación, se mide la Kd mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. Se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando los Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (<sup>125</sup>I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando a continuación el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquea con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [<sup>125</sup>I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se retira la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos que o igual a un 20 % de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se mide la Kd usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con micromatrices de CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan micromatrices de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación ( $k_{aso}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{dis}$ ) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensores de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción  $k_{dis}/k_{aso}$ . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

## 2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una recapitulación de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una recapitulación de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un único dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo mediante diversas técnicas que incluyen, pero no se limitan a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

### 3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenia en los seres humanos, mientras que se retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de fabricarlos se recapitulan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen con más detalle, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describen el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "rebornizado"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de la "selección guiada" al reordenamiento de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento del "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las regiones variables de la cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones estructurales de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

### 4. Anticuerpos humanos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígeno. Dichos animales típicamente contienen todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que remplazan a los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para una recapitulación de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véase también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HuMab®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos mediante procedimientos basados en hibridoma. Se han

descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromiéloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridomas de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. A continuación, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

### 5. Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar los anticuerpos de la invención cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o las actividades deseada(s). Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se recapitulan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen con más detalle, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que a continuación se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y también no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar de manera sintética colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

### 6. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es para un primer antígeno y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, se pueden unir anticuerpos biespecíficos a dos epítopos diferentes del primer antígeno. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan el primer antígeno. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan especificidades diferentes (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829, y Trauneker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y la genomanipulación de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º

5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas con Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un primer antígeno así como a otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

### 7. Variantes de anticuerpos

En determinados modos de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

#### a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones conservadoras". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares" y como se describe con más detalle a continuación en referencia a las clases de cadena lateral de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenia disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

**TABLA 1**

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

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

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

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenia reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Se pueden realizar dichas alteraciones en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), sometiendo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar su afinidad de unión. La maduración de la afinidad mediante construcción y reselección de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunos modos de realización de la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. A menudo se seleccionan en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de la HVR o los SDR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina

de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar o eliminar como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

5 Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que  
10 incremente la semivida en suero del anticuerpo.

### **b) Variantes de glucosilación**

15 En determinados modos de realización, se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o deleción de sitios de glucosilación a un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o retire uno o más sitios de glucosilación.

20 Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que se une, en general, mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización, se pueden realizar  
25 modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

30 En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura glucídica que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en  
35 aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente  $\pm$  3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilados" o "deficitarios en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los  
45 ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0157108 A1, Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11), y líneas celulares desactivadas, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO desactivadas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

50 A las variantes de anticuerpo además se les proporcionan oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está bisegmentado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.);  
60 y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

### **c) Variantes de la región Fc**

65 En determinados modos de realización, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una

región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que sea probable que carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan Fc(RIII), mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII) y Fc(RIII). La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al., J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa se pueden emplear procedimientos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al., Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden realizar determinaciones de la unión a FcRn y del aclaramiento/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B., *et al., Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al., J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunos modos de realización, las alteraciones se hacen en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o bien disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al., J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al., J. Immunol.* 24: 249 (1994)), en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

#### **d) Variantes de anticuerpos genomanipulados con cisteína**

En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo.

Sustituyendo esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe con más detalle en el presente documento. En determinados modos de realización, se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomodificados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

#### e) Derivados de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

#### Procedimientos y composiciones recombinantes

Se pueden producir anticuerpos usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo). En otro modo de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos modos de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo

en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

5 Además de los procariontes, los microbios eucariotes, tales como los hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras en las que sus vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

10 Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar junto con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

15 También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

20 También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4, como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO DHFR<sup>-</sup> (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una recapitulación de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

### 35 Ensayos

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

#### 40 **1. Ensayos de unión y otros ensayos**

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, etc.

45 En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo de la invención por la unión a un antígeno de interés. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que se une mediante un anticuerpo de la invención. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

50 En un ensayo de competencia ejemplar, se incuba un antígeno de interés inmovilizado en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une al antígeno de interés (por ejemplo, un anticuerpo de la invención) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo por la unión al antígeno de interés. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba un antígeno de interés inmovilizado en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo al antígeno de interés, se retira el exceso de anticuerpo no unido, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno de interés inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociado con el antígeno de interés inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión al antígeno de interés. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

#### 65 **2. Ensayos de actividad**

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos de los mismos que tengan actividad biológica. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

- 5 En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar dicha actividad biológica.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo para propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

10

### III. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica otros aspectos de la divulgación diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

15

El fago auxiliar M13KO7 era de New England Biolabs. La seroalbúmina bovina (BSA) y Tween 20 eran de Sigma. La caseína era de Pierce. La peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con anti-M13 era de Amersham Pharmacia. Las inmunoplasmas Maxisorp eran de NUNC. El sustrato tetrametilbenzidina (TMB) era de Kirkegaard and Perry Laboratories. Todos los demás antígenos proteicos se generaron por grupos de investigación en Genentech, Inc.

20

#### Ejemplo 1: selección de la secuencia señal para la expresión en células procariotas y eucariotas

Para abordar si un vector puede expresar proteínas de interés tanto en *Escherichia coli* como en células eucariotas (de mamífero), se seleccionaron cuatro secuencias señal de origen no bacteriano para las que había evidencia anecdótica que apoya la idea de que podrían funcionar en células de mamífero. Se sometieron a prueba estas secuencias señal para determinar su capacidad para impulsar la presentación de un Fab anti-Her2 (h4D5) en el fago M13 usando ELISA para fagos (figura 1A). Los niveles de presentación se evaluaron en relación con la secuencia señal de enterotoxina II (STII) termoestable bacteriana. La capacidad de las secuencias señal para impulsar la presentación en fagos de Fab varió enormemente, y una secuencia señal de la proteína de inmunoglobulina de unión murina (mBiP) impulsó niveles de presentación que posiblemente podrían permitir niveles eficaces de presentación de Fab.

25

Para mejorar adicionalmente el funcionamiento de la secuencia señal de mBiP, se utilizó un enfoque de optimización de codones basado en fagos, ya que se ha demostrado previamente que la función de las secuencias señal eucariotas en bacterias se ve enormemente afectada por el uso de codones (Humphreys *et al.*, *The Protein Expression and Purification*, 20: 252-264 (2000)). Se construyó una colección de fagos en la que la secuencia señal de mBiP se fusionó con el extremo N de la HC de Fab h4D5 en un vector fagómico estándar. La secuencia de ADN del péptido señal de mBiP se diversificó en la tercera base de cada codón después de las dos primeras metioninas permitiendo solo mutaciones sinónimas. Después de cuatro rondas de exploración en fase sólida frente a Her2 inmovilizado, se escogieron y secuenciaron clones individuales. Se encontró que la secuencia consenso de los clones seleccionados favorecía fuertemente una adenina o timina en las posiciones aleatorizadas en lugar de una guanina o citosina. Este resultado se destaca por el hecho de que 15 de los 17 codones en la secuencia de mBiP natural contienen una guanina o citosina en la posición de la tercera base, pero cada uno de los 17 codones en la colección clasificada contenía adenina o timina en estas posiciones un 60-90 % del tiempo. Cuando se somete a prueba en ELISA de fagos, la secuencia señal de mBiP optimizada impulsa la presentación de Fab h4D5 a niveles comparables a la secuencia señal de STII procariótica, lo que sugiere que la secuencia señal de mBiP se puede utilizar para experimentos de exploración y presentación en fagos en lugar de la secuencia señal de STII procariótica sin ninguna reducción aparente en el funcionamiento (figura 1B).

35

A continuación, se evaluó la capacidad de la secuencia señal de mBiP para apoyar la expresión y la secreción de IgG en células de mamífero. Los vectores de expresión de mamífero que codifican la HC y la LC de hIgG<sub>1</sub> h4D5, cada uno con la secuencia señal de mBiP fusionada con el extremo N, se cotransfectaron en células 293S en suspensión y se cultivaron durante cinco días, después de los que se recogieron los sobrenadantes y se purificó la IgG por cromatografía de afinidad. El rendimiento de IgG de un cultivo de 30 ml fue de forma rutinaria ~2,0 mg, comparable a los rendimientos obtenidos usando una señal de HC natural (VHS) en ambas cadenas (datos no mostrados). Curiosamente, el uso de la forma natural frente a la de codón optimizado de la secuencia señal de mBiP no tuvo un efecto discernible en los niveles de expresión de IgG (datos no mostrados). La cromatografía de filtración en gel y la espectrometría de masas confirmaron que la proteína purificada era >90 % monomérica en solución y que la secuencia señal de mBiP se escindió completamente en la posición apropiada tanto en la HC como en la LC (datos no mostrados). Debido a que se conoce que h4D5 es un buen expresador, se sometió a prueba el funcionamiento de mBiP en relación con VHS en un grupo de clones no caracterizados seleccionados arbitrariamente de un experimento de exploración de fagos. El rendimiento medio de estos clones fue de ~1,0 mg de un cultivo en suspensión de 30 ml, y no se observaron diferencias significativas entre las dos secuencias señal (figura 2A y B).

40

En resumen, la secuencia señal de secreción de mamífero de mBiP pudo expresar la IgG en células de mamífero

45

en niveles suficientes para el cribado, y una vez que se optimizó el codón, también pudo impulsar la presentación de Fab consistente en fagos sin comprometer los niveles de expresión de IgG.

#### Ejemplo 2: Expresión de fusiones de Fab alternas en células procariotas y eucariotas

5 Para generar diferentes proteínas de fusión de Fab de una manera dependiente de la célula huésped, se buscó aprovechar el proceso natural de empalme de intrones que se produce durante el procesamiento del ARNm en células eucariotas, pero no procariotas. La secuencia genómica de la región constante de la HC de hlgG<sub>1</sub> contiene tres intrones naturales (figura 3A). El primero de estos (intrón 1) es un intrón de 384 pares de bases situado entre el dominio variable de la HC (V<sub>H</sub>) y la región bisagra. Un vector de expresión de la HC que contiene el intrón 1 y una secuencia donante de empalme optimizada expresó ARNm completamente empalmado como se evalúa mediante RT-PCR y la secuenciación de los transcritos y, cuando se cotransfectó con un vector de la LC, expresó la IgG<sub>1</sub> en niveles comparables con un vector sin el intrón (figura 5).

15 Para determinar si el fragmento Fab con respecto a un péptido adaptador de fagos integrado dentro de la secuencia de intrón 1 permite tanto la presentación en fagos como la expresión de IgG en células bacterianas y de mamífero, respectivamente, un péptido adaptador (figura 3B) o la proteína de la cubierta de fago gen-III (figura 3C) se insertó en la construcción HC.intrón 1 de h4D5 en el extremo 5' del intrón 1 o el intrón 3. El donante de empalme natural del intrón 1 o 3 se movió inmediatamente en dirección 5' del péptido adaptador. Cuando la construcción HC-adaptador.intrón 1 se coexpresó con la LC de h4D5 en células de mamífero, la expresión de IgG h4D5 fue de aproximadamente un 40 % (para el intrón que contiene el adaptador) o de un 5 % (para el intrón que contiene el gen III) que la de la construcción de control sin intrón (figura 4A). La RT-PCR demostró que, si bien una fracción del ARNm de HC-adaptador estaba empalmado apropiadamente (figura 4B, banda media), una cantidad significativa del ARNm no estaba empalmado (figura 4B, banda superior) o bien estaba empalmado incorrectamente de un donante de empalme encriptado en la región V<sub>H</sub> (figura 4B, banda inferior). El ARNm de HC-gen-III estaba casi completamente empalmado del donante de empalme encriptado. La mutación sinónima de la secuencia donante de empalme encriptada dio como resultado la acumulación de solo ARNm no empalmado (no mostrado).

30 A la luz de la falla del intrón para empalmar eficazmente cuando se insertó la secuencia adaptadora, se comparó la secuencia del donante de empalme natural con la secuencia consenso conocida de donantes de empalme para los ARNm de mamífero (Stephens *et al.*, *J of Molecular Biology*, 228: 1124-1136 (1992)). Como se muestra en la figura 5, el donante de empalme natural del intrón 1 de hlgG<sub>1</sub> difiere de la secuencia donante consenso en tres de las ocho posiciones. Las sustituciones en las posiciones 1 y 5 se analizaron con más detalle, ya que estas posiciones están más conservadas que la posición 8.

35 Se generó un donante de empalme mutante (donante 1) en el que las bases en las posiciones 1 y 5 se cambiaron para coincidir con la secuencia consenso (figura 5A) y se sometió a prueba la capacidad de estos donantes modificados para mediar el empalme del intrón sintético en la HC. Este donante de empalme optimizado restauró completamente el empalme del intrón sintético (figura 5B) con un incremento simultáneo en la expresión de IgG h4D5 en un nivel que coincidía con el de la construcción de control que no contenía intrón (figura 5C). La mejora en el empalme y la expresión de IgG se observó independientemente de que el intrón sintético contenga el péptido adaptador o el gen III y también independientemente de que el intrón sintético se base en el intrón 1 o el intrón 3 de hlgG<sub>1</sub>.

#### Ejemplo 3: Generación del sistema de expresión y secreción para células procariotas y eucariotas

50 Para la generación del plásmido de vector doble, se usó el vector fagómico derivado de pBR322 actualmente usado para la presentación en fagos, pRS. Este vector bicistrónico consiste en un activador de PhoA bacteriano que impulsa la expresión de un casete de cadena ligera de anticuerpo con su secuencia señal de STII asociada, seguido del casete de cadena pesada de anticuerpo con su secuencia señal de STII asociada. Al final de la secuencia de la cadena ligera, hay una marca epitópica gD para la detección de presentación de Fab en partículas de fago. En los fagómicos convencionales, la secuencia de la cadena pesada consiste solo en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1 de hlgG y se fusiona a nivel nucleotídico con un péptido de utilidad, tal como una proteína de fusión de fagos, más a menudo el gen III, que codifica la proteína de la cubierta de fago pIII o un péptido adaptador. El extremo 3' de los casetes de cadena ligera y cadena pesada contiene una secuencia finalizadora de la transcripción lambda para detener la transcripción en *E. coli*. Debido a que este vector produce pIII de cadena ligera y cadena pesada a partir de un único transcrito de ARNm, no existen elementos reguladores de la transcripción entre las secuencias de la LC y la HC. El vector también contiene el gen de betalactamasa (*bla*) para conferir resistencia a la ampicilina, el origen de pMB1 para la replicación en *E. coli*, y un origen f1 para la expresión de fimbrias en la superficie bacteriana, permitiendo la infección por el fago M13. Otra forma de este vector también incluye el origen de replicación de SV40 para la replicación episómica del plásmido en cepas apropiadas de células de mamífero.

65 Para la construcción del vector doble inicial (denominado en el presente documento "pDV.6.0"), en primer lugar se insertó el activador de CMV de mamífero de pRK (un vector de expresión de mamífero usado para la expresión de IgG y otras proteínas) en dirección 5' del activador de PhoA que impulsa el cistron de LC-HC. Al final de la

secuencia codificante del anticuerpo de LC, se insertó un codón de parada ámbar seguido de una marca epitópica gD, que permite la detección de LC marcadas en el fago cuando se presenta en una cepa de *E. coli* supresora ámbar. El marcador epitópico está ausente cuando el vector se expresa en células de mamífero. Por tanto, el casete de LC comprende (en orden de 5' a 3') un activador eucariótico, un activador bacteriano, una secuencia señal, una secuencia codificante de cadena ligera (LC) del anticuerpo y una marca epitópica (gD).

A continuación, entre los casetes de HC y LC se insertó un casete sintético que comprende (en orden de 5' a 3') una señal de parada de la transcripción/poliadenilación de mamífero de SV40, una secuencia finalizadora lambda para la finalización de la transcripción en *E. coli*, un activador de CMV y un activador de PhoA.

A continuación, se insertaron una señal de parada de la transcripción/poliadenilación de mamífero de SV40 y una secuencia finalizadora lambda después del casete de HC. El casete de HC comprende una secuencia señal y una secuencia codificante de cadena pesada (HC) de anticuerpo.

Para permitir la secreción de la(s) proteína(s) de fusión de interés tanto en células procariotas como en eucariotas, se reemplazaron las secuencias señal de STII que preceden a la LC y la HC con la secuencia señal de la proteína de inmunoglobulina de unión murina eucariótica (mBiP). El cribado de varias secuencias señal candidatas da lugar a descubrir que esta secuencia señal podía funcionar en aplicaciones que requieren expresión procariótica (es decir, presentación en fagos) y/o expresión eucariótica (es decir, expresión de IgG en células de mamífero), y que mBiP funcionó en ambos de estos contextos tan bien como lo hicieron las secuencias señal respectivas que se emplearon antes de este trabajo.

Para permitir la expresión de Fab-fago en *E. coli* e IgG en células de mamífero, se generó un intrón sintético en el casete de HC. Se modificó un intrón natural del intrón 1 o intrón 3 de IgG1 humana para crear un intrón sintético que contiene una proteína de fusión (gen III) para la presentación en las partículas de fago. La secuencia genómica del intrón 1 (o intrón 3) de IgG1 humana se insertó inmediatamente después de que la secuencia del gen III se separara mediante un codón de parada para producir fusiones HC-p3 de Fab en *E. coli*. La colocación del octanucleótido donante de empalme natural en la región flanqueante 5' del intrón sintético requirió dos mutaciones de aminoácidos en la región bisagra cuando se expresó en *E. coli* (E212G y P213K, numeración de Kabat), y las mutaciones para crear el donante de empalme optimizado da como resultado que ambos de estos residuos se muten a lisina. Estas mutaciones no afectan los niveles de presentación en fagos (no mostrado) y, a medida que la región bisagra del fago se elimina durante el proceso de empalme, estarían ausentes en la IgG de longitud completa expresada en células de mamífero.

De forma alternativa, para la utilización de presentación en fagos adaptadores, se generó un vector similar al vector pDV6.0 descrito anteriormente con un intrón sintético diferente (denominado en el presente documento pDV5.0, mostrado en la figura 7). La secuencia del gen III se reemplazó con uno de dos miembros de un par de cremalleras de leucinas (llamado en el presente documento "adaptador"). En este intrón sintético, la secuencia peptídica adaptadora va seguida de un codón de parada y la secuencia genómica del intrón 1 o 3. En esta construcción, también se insertó un casete de expresión bacteriano separado que consiste en un gen III fusionado con el miembro análogo del par de cremalleras de leucinas. Este casete de expresión bacteriano separado se introdujo en dirección 5' del activador de CMV de LC y está controlado por un activador de PhoA, contiene la secuencia señal de STII para restringir la expresión del adaptador-gen III con respecto a *E. coli* y contiene un terminador lambda inmediatamente en dirección 3'. Cuando se expresan en *E. coli*, las cadenas pesadas y ligeras se ensamblan en el periplasma para formar Fab, y el adaptador fusionado con la cadena pesada se une de manera estable al adaptador análogo en la proteína adaptadora pIII. El empaquetamiento de este complejo Fab-adaptador-pIII ensamblado en partículas de fago producirá fagos que presentan el Fab de interés. Además, se generó un mutante personalizado del fago auxiliar KO7 en el que el adaptador compañero se fusiona con el extremo N del gen III (adaptador-KO7). La infección de *E. coli* que alberga pDV.5.0 con el adaptador-KO7 da como resultado que todas las copias de pIII presentes en el fagócito maduro se fusionen con el adaptador. Como resultado, todas las copias de pIII están disponibles para asociarse con el Fab-adaptador, en lugar de solo aquellas copias de pIII que se originaron a partir de pDV5. En algunos casos, sin embargo, un nivel de presentación inferior puede ser deseable cuando se buscan clones de alta afinidad raros (por ejemplo, en aplicaciones de maduración de la afinidad). En este caso, la infección de *E. coli* que alberga pDV.5.0 con el fago auxiliar KO7 convencional dará como resultado una mezcla de adaptador-pIII (de pDV.5.0) y pIII natural (del fago auxiliar KO7) que se presentan en las partículas de fago. En esta situación, puesto que solo un subconjunto del grupo de pIII global se puede asociar con el adaptador-Fab, los niveles de presentación resultantes serán más bajos que cuando se usa el adaptador-KO7. Esta capacidad para modular los niveles de presentación simplemente eligiendo el fago auxiliar apropiado es una ventaja única de la presente invención.

Se evaluó la capacidad de pDV5.0 para expresar diferentes IgG en células de mamífero. Las HC y las LC de cuatro IgG humanas diferentes se subclonaron en pDV5.0 y se expresaron en células 293. De manera un tanto sorprendente, los rendimientos globales de pDV fueron consistentemente ~10 veces más bajos que en un sistema de dos plásmidos. Sin embargo, los rendimientos son todavía del orden de ~0,1-0,4 mg por 30 ml de cultivo (figura 6B). Esta cantidad de material es más que adecuada para los ensayos de cribado de rutina, y se puede aumentar fácilmente hasta 0,1-1 l o más si se requieren cantidades mayores de material. Se demostró que las IgG eran

>90 % monoméricas en solución mediante cromatografía de filtración en gel.

Ejemplo 4: Construcción de fago auxiliar mutante, M13KO7 con mutación ámbar en el gen III (KO7 ámbar)

5 Para potenciar la presentación de proteínas fusionadas con pIII en el fago M13, se generó un fago auxiliar mutante, KO7 ámbar, usando mutagénesis dirigida al sitio. KO7 ámbar tiene un codón ámbar introducido en el genoma del fago auxiliar M13KO7 mediante mutagénesis dirigida al sitio. La secuencia de nucleótidos de la pIII (nucleótidos 1579 a 2853 del fago auxiliar mutante KO7 ámbar se muestra en la figura 8.

10 Para generar KO7 ámbar, se usó el fago auxiliar M13KO7 para infectar la cepa CJ236 de *Escherichia coli* (genotipo *dut/lung*) y los viriones de la progenie se recogieron para purificar el ADNss usando un kit de purificación de ADNss (QIAGEN). Un oligonucleótido sintético (secuencia 5'-  
15 GTGAATTATCACCGTCACCGACCTAGGCCATTTGGGAATTAGAGCCA -3') (SEQ ID NO: 23) se usó para mutar el gen III en M13KO7 mediante mutagénesis dirigida al sitio por oligonucleótidos. Se usó ADN mutagenizado para transformar células XL1-Blue de *E. coli* (Agilent Technologies) y se sembró en un césped de células XL1-Blue no infectadas en placas de agar blando. Las placas se escogieron individualmente y las células se cultivaron en medio LB que contenía 50 µg/ml de canamicina. El ADN de forma replicativa (RF) bicatenario se extrajo con un kit de minipreparación de ADN y se secuenció para confirmar la presencia de la mutación de parada ámbar. La  
20 homogeneidad de la población se confirmó mediante digestión con endonucleasas de restricción AvrII y electroforesis en gel de agar de ADN de RF. Todas las etapas de manipulación de ADN recombinante se realizaron como se describe (Sambrook, J. *et al.*, A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

25 El nivel de presentación de Fab en las partículas de fago producidas usando KO7 ámbar se midió mediante ELISA de fagos. El antígeno (Her2) se inmovilizó en inmunoplasmas y se produjeron el fago portador y Fab anti-Her2 en células XL1-Blue usando KO7 natural (WT KO7) o bien un M13KO7 modificado que alberga una mutación ámbar en el fago auxiliar de pIII (KO7 ámbar). La unión se detectó incubando con un conjugado anti-M13-HRP de ratón seguido de una medición de DO del sustrato TMB a 450 nm. El uso de KO7 ámbar dio como resultado niveles de presentación más altos de un fagómido de baja presentación (triángulos sólidos) en comparación con los niveles alcanzados por el mismo fagómido cuando se usó WT KO7 para la producción de fagos (cuadrados sólidos) (figura 9). El nivel de presentación de Fab con el fagómido de baja presentación que usa KO7 ámbar (triángulos sólidos) también fue similar al nivel de presentación de Fab observado cuando se usa un fagómido de alta presentación con WT KO7 (rombos huecos) (figura 9).

35 Ejemplo 5: Generación de un sistema de expresión y secreción para células procariotas y eucariotas para la generación de colecciones de solo HC indiferenciadas y uso del sistema para la exploración de fagos

Además de los vectores de fusión directa e indirecta que presentan activadores procarióticos y eucarióticos tanto en la HC como en la LC (pDV5.0 y pDV6.0) descritos en el ejemplo 3, se generó una construcción de vector doble de fusión directa modificado (pDV.6.5 mostrado en la figura 14) en la que la LC de Fab se fusiona con la secuencia señal de STII y se impulsa solo por un activador de PhoA bacteriano, mientras que la HC de Fab (que contiene el gen III-intrón sintético) y las secuencias de Fc de hIgG para la expresión de una HC de hIgG1 de longitud completa en células de mamífero) se impulsó tanto por un activador de CMV eucariótico como por un activador de PhoA procariótico. Esta construcción se usó para recapitular una colección de Fab humano sintético descrito previamente (Lee, *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, 340. 1073-1093 (2004)), en la que la diversidad se introduce en la HC solo. La expresión de IgG de longitud completa a partir de este vector requiere la cotransfección de un vector de expresión de mamífero que codifica una LC.

50 Las colecciones presentadas en fagos se generaron usando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Kunkel) y versiones de "molde de parada" de pDV.6.5 en las que los codones de parada (TAA) se colocaron en las tres CDR de cadena pesada. Estas paradas se repararon durante la reacción de mutagénesis mediante una mezcla de oligonucleótidos que hibridaron en las regiones que codifican CDRH1, H2 y H3 y reemplazaron los codones en las posiciones elegidas para la aleatorización con codones degenerados. Las reacciones de mutagénesis se sometieron a electroporación en células XL1-Blue y los cultivos se hicieron crecer usando un protocolo de cambio de temperatura (37 °C durante 4 horas seguido de 36 horas a 30 °C) en un caldo 2YT complementado con fago auxiliar ámbar.KO7, 50 µg/ml de carbenicilina y 25 µg/ml de canamicina. Los fagos se recogieron del medio de cultivo mediante precipitación con PEG/NaCl. Cada reacción de electroporación usó ~5 µg de ADN y dio como resultado  $1 \times 10^8$ - $7 \times 10^8$  transformantes.

60 La exploración de una colección de fagos indiferenciados generada en este vector se realizó frente al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) humano. Para la clasificación de la colecciones de fagos, los antígenos proteicos se inmovilizaron en inmunoplasmas Maxisorp y las colecciones se sometieron a cuatro a cinco rondas de selecciones de unión. Los pocillos se bloquearon de forma alternativa usando BSA o caseína en rondas alternas. Los clones aleatorios seleccionados de las rondas 3 a 5 se sometieron a ensayo usando ELISA de fagos para comparar la unión con el antígeno diana (VEGF) y una proteína irrelevante (Her2) para verificar la unión no específica. En resumen, los clones de fagos se hicieron crecer durante la noche en 1,6 ml de caldo 2YT

65

complementado con fago auxiliar ámbar.KO7 (ejemplo 4). Los sobrenadantes se unieron a antígeno inmovilizado o placas recubiertas de proteína irrelevante durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se detectó el fago unido usando un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (20 minutos a temperatura ambiente) seguido de detección con sustrato TMB. Se aislaron múltiples clones que fueron positivos para ELISA para VEGF, pero no para una proteína de control irrelevante (Her2) (figura 10 - gráfico de barras).

El ADN de estos clones que demostró especificidad por VEGF se usó a continuación para expresar IgG de longitud completa mediante la cotransfección con un vector de expresión de mamífero que codifica la LC común en células 293 en cultivos en suspensión a pequeña escala para la expresión de hlgG1 de longitud completa. Se transfectó 1 ml de cultivos usando Expifectamine o JetPEI de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubaron a 37 grados C/8 % de CO<sub>2</sub> durante 5-7 días. Las transfecciones aumentadas se realizaron en 30 ml de células 293.

Los sobrenadantes de cultivo se usaron a continuación para cribar las IgG para determinar la unión de VEGF en un ensayo de captura de Fc en un instrumento BIAcore T100 (figura 11). Se usaron sobrenadantes de IgG de cultivos de 1 ml para cribar la unión a antígeno. Se inmovilizó un anticuerpo de captura de Fc antihumano en una micromatriz de sensor de la serie S CM5 (~10.000 UR). Los sobrenadantes se hicieron fluir secuencialmente sobre las cubetas de lectura 2, 3 y 4 (5 µl/min durante 4 minutos) para permitir la captura de IgG del sobrenadante (50-150 UR), después de lo cual se hizo fluir el antígeno (100-1000 nM) sobre las IgG inmovilizadas (30 µl/min durante 2 minutos) para medir la respuesta de unión.

La secuenciación de los fijadores positivos muestra ocho secuencias únicas (las secuencias de CDR de cadena pesada se muestran en la figura 12) con propiedades de unión positiva (figura 12). Los datos de secuenciación (figura 12) combinados con ELISA de fagos (figura 10) y los datos de BiaCore (figura 11) se usaron para seleccionar un grupo de ocho clones anti-VEGF para un análisis adicional.

La expresión de estos ocho clones se aumentó hasta 100 ml de cultivos de células de hámster chino (CHO) (véase la figura 15) y se usó material purificado para evaluar la capacidad de los clones anti-VEGF para bloquear la unión de VEGF a uno de sus receptores análogos (VEGFR1) por medio de ELISA de bloqueo de receptores. El hVEGF165 biotinilado (2 nM) se incubó con anticuerpos anti-VEGF diluidos en serie 3 veces (concentración máxima 200 nM) en PBS/BSA al 0,5 %/Tween-20 al 0,05 %. Después de 1-2 horas de incubación a temperatura ambiente, las mezclas se transfirieron a la placa con VEGFR1 inmovilizado y se incubó durante 15 minutos. El VEGF unido a VEGFR-1 se detectó a continuación mediante estreptavidina-HRP durante 30 minutos seguido de desarrollo con sustrato TMB y se midió el valor de CI50.

Se identificó un clon (VEGF55) con una CI<sub>50</sub> comparable a la de bevizumab, un anticuerpo anti-VEGF comercial (figura 13). De esta manera, se pudo pasar directamente de la exploración de fagos a la expresión de IgG y triar un grupo de clones hasta obtener un único candidato, todo sin el requisito de subclonar.

En resumen, este vector doble de fusión directa modificado (pDV.6.5) se pudo usar para la construcción de colecciones de presentación en fagos con cadenas pesadas aleatorizadas y cadenas ligeras constantes en *E. coli* y también se pudo usar para expresar posteriormente los clones seleccionados como IgG1 natural en células de mamífero sin subclonación cuando se complementa con un vector de expresión de cadena ligera. Debido a que el activador de CMV de mamífero está presente en dirección 5' de la HC solo, el pDV expresó tanto LC de Fab como HC-pIII de Fab en *E. coli*, pero expresó solo HC de hlgG1 en células de mamífero. Este vector se usó para seleccionar fragmentos Fab de una colección de Fab sintético indiferenciado que se une a múltiples antígenos, y a continuación para expresar hlgG1 natural de longitud completa de los clones seleccionados en células 293 de mamífero y CHO cotransfectando los clones de vectores dobles de fusión directa modificados con un vector de expresión de mamífero que codifica una LC común. Se obtuvo IgG1 natural de estos experimentos de expresión para llevar a cabo varios ensayos, de modo que de un grupo de 8 clones anti-VEGF únicos que muestran actividad de unión mediante ELISA y BIAcore, se pudo triar hasta obtener un único candidato evaluando el comportamiento en solución, unión inespecífica y actividad biológica de los candidatos en formato de IgG sin necesidad de subclonar secuencias de HC de los clones de vectores de fago original.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo, para los propósitos de claridad de comprensión, no se deben interpretar las descripciones y ejemplos como limitantes del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. *ET AL.*

<120> SISTEMA DE EXPRESIÓN Y SECRECIÓN

<130> P4825R1-WO

5 <140>  
<141>

<150> 61/819.063  
<151> 03/05/2013

10 <150> 61/852.483  
<151> 15/03/2013

<150> 61/668.397  
<151> 05/07/2012

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
<211> 418  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 1

Ala Glu Asp Ile Glu Phe Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ala Glu Thr  
1 5 10 15

Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu Asn Ser Phe Thr Asn  
20 25 30

Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly  
35 40 45

Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr Gly Asp Glu Thr  
50 55 60

Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala Ile Pro Glu Asn  
65 70 75 80

Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu  
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr Pro Ile Pro Gly  
100 105 110

ES 2 743 401 T3

Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Gly Thr Glu  
 115 120 125

Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu Ser Gln Pro Leu  
 130 135 140

Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn Arg Gln Gly Ala  
 145 150 155 160

Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr Asp Pro Val Lys  
 165 170 175

Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala Met Tyr Asp Ala  
 180 185 190

Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe His Ser Gly Phe Asn  
 195 200 205

Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro  
 210 215 220

Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 225 230 235 240

Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly  
 245 250 255

Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp  
 260 265 270

Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala  
 275 280 285

Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val  
 290 295 300

Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser  
 305 310 315 320

Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn  
 325 330 335

Ser Gln Met Ala Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn  
 340 345 350

Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro  
 355 360 365

ES 2 743 401 T3

Phe Val Phe Ser Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp  
 370 375 380

Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala  
 385 390 395 400

Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys  
 405 410 415

Glu Ser

<210> 2

<211> 158

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 2

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala  
 1 5 10 15

Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu  
 20 25 30

Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly  
 35 40 45

Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly  
 50 55 60

Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln  
 65 70 75 80

Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr  
 85 90 95

Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly  
 100 105 110

10

Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu  
 115 120 125

Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr  
 130 135 140

Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser  
 145 150 155

<210> 3

ES 2 743 401 T3

<211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<400> 3  
 Met Met Lys Phe Thr Val Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

5 Val Arg Ala

<210> 4  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 4  
 atgatgaaat ttaccgtggt ggcgggcggt ctgctgctgc tgggcgcggt ccgcgcg 57

15 <210> 5  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (9)..(9)  
 <223> a, c, t o g

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (12)..(12)  
 <223> a, c, t o g

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (15)..(15)  
 <223> a, c, t o g

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (18)..(18)  
 <223> a, c, t o g

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (21)..(21)  
 <223> a, c, t o g

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (24)..(24)  
 <223> a, c, t o g

<220>

	<221>	base_modificada	
	<222>	(27)..(27)	
	<223>	a, c, t o g	
5	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(30)..(30)	
	<223>	a, c, t o g	
10	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(33)..(33)	
	<223>	a, c, t o g	
15	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(36)..(36)	
	<223>	a, c, t o g	
20	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(39)..(39)	
	<223>	a, c, t o g	
25	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(42)..(42)	
	<223>	a, c, t o g	
30	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(45)..(45)	
	<223>	a, c, t o g	
35	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(48)..(48)	
	<223>	a, c, t o g	
40	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(51)..(51)	
	<223>	a, c, t o g	
45	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(54)..(54)	
	<223>	a, c, t o g	
50	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(57)..(57)	
	<223>	a, c, t o g	
	<400>	5	
		<b>atgatgaant tnacngtngt ngngngngn etnetnetnc tngngngngt noingngn</b>	<b>57</b>
	<210>	6	
	<211>	37	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	

ES 2 743 401 T3

<221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 6  
 Ala Ser Ile Ala Arg Leu Arg Glu Arg Val Lys Thr Leu Arg Ala Arg  
 1 5 10 15

Asn Tyr Glu Leu Arg Ser Arg Ala Asn Met Leu Arg Glu Arg Val Ala  
 20 25 30

Gln Leu Gly Gly Cys  
 35

5

<210> 7  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 7  
 Ala Ser Leu Asp Glu Leu Glu Ala Glu Ile Glu Gln Leu Glu Glu Glu  
 1 5 10 15

Asn Tyr Ala Leu Glu Lys Glu Ile Glu Asp Leu Glu Lys Glu Leu Glu  
 20 25 30

Lys Leu Gly Gly Cys  
 35

15

<210> 8  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 8  
 Glu Glu Lys Ser Arg Leu Leu Glu Lys Glu Asn Arg Glu Leu Glu Lys  
 1 5 10 15

Ile Ile Ala Glu Lys Glu Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Gln Leu  
 20 25 30

Gln Ser Val Gly Gly Cys  
 35

25

<210> 9  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente

ES 2 743 401 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 9

Thr Ser Arg Leu Glu Gly Leu Gln Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met  
1 5 10 15

Lys Ile Thr Glu Leu Asp Lys Asp Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu  
20 25 30

Gln Asp Val Gly Gly Cys  
35

- 5 <210> 10
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)..(2)
- <223> /reemplazar=" "
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(2)
- <223> /nota="Esta región puede englobar 'Met' o 'Met-Thr' o estar ausente"
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(2)
- <223> /nota="Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de la anotación para la posición variante"
- <400> 10
- Met Thr Met Lys Phe Thr Val Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Gly  
1 5 10 15
- 25 Ala Val Arg Ala  
20
- <210> 11
- <211> 60
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
- <220>
- 35 <221> variación
- <222> (1)..(6)
- <223> /reemplazar=" "
- <220>
- <221> misc\_feature

## ES 2 743 401 T3

```

<222> (1)..(6)
<223> /nota="Esta región puede englobar 'ATG' o 'ATGACC' o estar ausente"

<220>
<221> misc_feature
5 <222> (1)..(6)
   <223> /nota="Los nucleótidos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de la
   anotación para la posición de variación"

<220>
<221> base_modificada
10 <222> (12)..(12)
   <223> a, c, t o g

<220>
<221> base_modificada
15 <222> (15)..(15)
   <223> a, c, t o g

<220>
<221> base_modificada
<222> (18)..(18)
<223> a, c, t o g

20 <220>
   <221> base_modificada
   <222> (21)..(21)
   <223> a, c, t o g

25 <220>
   <221> base_modificada
   <222> (24)..(24)
   <223> a, c, t o g

<220>
<221> base_modificada
30 <222> (27)..(27)
   <223> a, c, t o g

<220>
<221> base_modificada
35 <222> (30)..(30)
   <223> a, c, t o g

<220>
<221> base_modificada
<222> (33)..(33)
<223> a, c, t o g

40 <220>
   <221> base_modificada
   <222> (36)..(36)
   <223> a, c, t o g

<220>
45 <221> base_modificada
   <222> (39)..(39)
   <223> a, c, t o g

<220>
50 <221> base_modificada
   <222> (42)..(42)
   <223> a, c, t o g

```

ES 2 743 401 T3

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (45)..(45)  
 <223> a, c, t o g

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (48)..(48)  
 <223> a, c, t o g

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (51)..(51)  
 <223> a, c, t o g

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (54)..(54)  
 <223> a, c, t o g

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (57)..(57)  
 <223> a, c, t o g

25

<400> 11  
**atgaccatga anttnacngt ngtngengen genctnctnc tnetngnggc ngtnegngen** 60

30

<210> 12  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 12  
**Ala Ser Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln**  
**1 5 10 15**

**Asn Tyr Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala**  
**20 25 30**

35

**Gln Leu Gly Gly Cys**  
**35**

40

<210> 13  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

ES 2 743 401 T3

<400> 13  
**Ala Ser Ile Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val Glu Gln Leu Glu Glu Arg**  
 1 5 10 15

**Asn Tyr Ala Leu Arg Lys Glu Val Glu Asp Leu Gln Lys Gln Ala Glu**  
 20 25 30

**Lys Leu Gly Gly Cys**  
 35

5 <210> 14  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 14  
**Ala Gly Ser Cys**  
 1

<210> 15  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 15  
**Cys Pro Pro Cys Pro Gly**  
 1 5

<210> 16  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

30 <400> 16  
**atgatgaaat ttaccgttgt tgctgctgct ctgctacttc ttggagcggc ccgcgca** 57

<210> 17  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 17  
**atgatgaaat ttactgttgt tgcggctgct attctacttc ttggagcggc ccgcgca** 57

40 <210> 18

ES 2 743 401 T3

<211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 18  
**atgatgaaat ttactgtttgt cgctgctgct attctacttc ttggagcggg ccgcgca** 57

<210> 19  
 10 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 19  
**Met Thr Met Lys Phe Thr Val Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Gly**  
 1 5 10 15

**Ala Val Arg Ala**  
 20

<210> 20  
 <211> 18  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 20  
**Met Lys Phe Thr Val Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ala Val**  
 1 5 10 15

**Arg Ala**

<210> 21  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> (12)..(12)  
 <223> a, c, t o g

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> (15)..(15)  
 <223> a, c, t o g

	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(18)..(18)
	<223>	a, c, t o g
5	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(21)..(21)
	<223>	a, c, t o g
10	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(24)..(24)
	<223>	a, c, t o g
15	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(27)..(27)
	<223>	a, c, t o g
20	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(30)..(30)
	<223>	a, c, t o g
25	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(33)..(33)
	<223>	a, c, t o g
30	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(36)..(36)
	<223>	a, c, t o g
35	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(39)..(39)
	<223>	a, c, t o g
40	<220>	
	<221>	bas_modificada
	<222>	(42)..(42)
	<223>	a, c, t o g
45	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(45)..(45)
	<223>	a, c, t o g
50	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(48)..(48)
	<223>	a, c, t o g
55	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(51)..(51)
	<223>	a, c, t o g
60	<220>	
	<221>	base_modificada
	<222>	(54)..(54)
	<223>	a, c, t o g

ES 2 743 401 T3

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (57)..(57)  
 <223> a, c, t o g

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (60)..(60)  
 <223> a, c, t o g

10

<400> 21  
**atgaccatga anttnacngt ngtngcngcn gcncctnctnc tncctnggngc ngtncgngcn** 60

<210> 22  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6)..(6)  
 <223> a, c, t o g

25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (9)..(9)  
 <223> a, c, t o g

30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (15)..(15)  
 <223> a, c, t o g

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (18)..(18)  
 <223> a, c, t o g

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (21)..(21)  
 <223> a, c, t o g

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (24)..(24)  
 <223> a, c, t o g

50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (27)..(27)  
 <223> a, c, t o g

50

<220>  
 <221> base\_modificada

	<222> (30)..(30)	
	<223> a, c, t o g	
	<220>	
5	<221> base_modificada	
	<222> (33)..(33)	
	<223> a, c, t o g	
	<220>	
10	<221> base_modificada	
	<222> (36)..(36)	
	<223> a, c, t o g	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (39)..(39)	
	<223> a, c, t o g	
15	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (42)..(42)	
	<223> a, c, t o g	
20	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (45)..(45)	
	<223> a, c, t o g	
25	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (48)..(48)	
	<223> a, c, t o g	
30	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (51)..(51)	
	<223> a, c, t o g	
35	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (54)..(54)	
	<223> a, c, t o g	
	<400> 22	
	<b>atgaanttna cngtngtngc ngngcnctn ctncctncng gngcngtncg ngen</b>	<b>54</b>
40	<210> 23	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"	
45	<400> 23	
	<b>gtgaattatc accgtcacgg acctaggcca ttgggaatt agagcca</b>	<b>47</b>
	<210> 24	
	<211> 1275	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 743 401 T3

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 24  
 gtgaaaaaat tattattogc agttccttta gttgttcott tctattctca ctacagctgag 60  
 actggtgaaa gttgttttagc aaaaccccat acagaaaatt catttactaa cgtctggaaa 120  
 gacgacaaaa ctttagatcg ttaogctaac tatgaggggt gtctgtggaa tgctacaggc 180  
 gttgtagttt gtactggtga cgaactcag tgttacggta catgggttcc tattgggctt 240  
 gctatccctg aaaatgaggg tgggtggctct gaggggtggcg gttctgaggg tggeggttct 300  
 gaggggtggcg gtactaaacc tctgagtac ggtgatacac ctattccggg ctatacttat 360  
 atcaaccctc tcgacggcac ttatccgctt ggtactgagc aaaaccccgc taatcctaata 420  
 ccttctcttg aggagtctca gctcttaata actttcatgt ttcagaataa taggttccga 480  
 aataggcagg gggcattaac tgtttatacg ggcactgtta ctcaaggcac tgaccccggt 540  
 aaaacttatt accagtacac tctgtatca tcaaaagcca tgtatgagc ttactggaac 600  
 ggtaaattca gagactgccc tttccattct ggctttaatg aggatccatt cgtttgtgaa 660  
 tatcaaggcc aatcgtctga cctgcctcaa cctcctgtca atgctggcgg cggctctggt 720  
 ggtggttctg gtggcggctc tgaggggtgt ggctctgagc gtggcggctc tgaggggtggc 780  
 ggctctgagg gaggcggctc cgggtggtggc tctggttccg gtgattttga ttatgaaaag 840  
 atggcaaacg ctaataaggc ggctatgacc gaaaatgccc atgaaaacgc gctacagtct 900  
 gacgctaaag gcaaacctga ttctgtcgtc actgattaac gtgctgctat cgtatggttc 960  
 5 attggtgacg tttccggcct tgctaattgt aatggtgcta ctggtgattt tgctggctct 1020  
 aattcccaaa tggcctaggt cgggtgacggc gataattcac ctttaatgaa taatttccgt 1080  
 caatatttac ctccctccc tcaatcgggt gaatgtccc cttttgtctt tagcgtggt 1140  
 aaaccatag aattttctat tgattgtgac aaaataaact tattccgtgg tgtctttgag 1200  
 tttcttttat atggtgccc ctttatgtat gtattttcta cgtttgctaa catactgct 1260  
 aataaggagt cttaa 1275

<210> 25  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 25  
 Thr Ser Tyr Ala  
 1

15

<210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 26  
**Gly Gly Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Asn Thr Tyr**  
 1 5 10

10 <210> 27  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 27  
**Ala Arg Pro Gly Pro Gly Gly Gly Phe Asp Ser Tyr Tyr Tyr Gly Met**  
 1 5 10 15

**Asp Tyr**

20 <210> 28  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 28  
**Thr Asp Tyr Ala**  
 1

<210> 29  
 <211> 11  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 29  
**Gly Phe Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Tyr**  
 1 5 10

<210> 30  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente

ES 2 743 401 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 30  
**Ala Arg Glu Val His Phe Trp Tyr Tyr Ser Val Met Asp Tyr**  
 1 5 10

5 <210> 31  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 31  
**Ser Ser Tyr Gly**  
 1

15 <210> 32  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 32  
**Gly Trp Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Tyr**  
 1 5 10

25 <210> 33  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

30 <400> 33  
**Ala Arg Phe Gly Tyr Asp Val Leu Arg Tyr Trp Asp Tyr Tyr Tyr Gly**  
 1 5 10 15  
**Met Ala Tyr**

35 <210> 34  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 34  
**Ser Asn Thr Ser**  
 1

<210> 35  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 35  
**Gly Trp Ile Tyr Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Asn**  
 5 1 5 10

<210> 36  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 36  
**Ala Arg Phe Gly Tyr Gln His Glu Val Gln Phe Ser Asp His Tyr Tyr**  
 1 5 10 15

**Ala Met Asp Tyr**  
 20

15 <210> 37  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 37  
**Ser Gly Thr Tyr**  
 1

25 <210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 38  
**Gly Phe Ile Ser Pro Tyr Asp Gly Tyr Thr Asp**  
 1 5 10

35 <210> 39  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 39  
**Ala Arg Leu Gln Phe Asn Thr Met Trp Val Met Asp Tyr**  
 1 5 10

ES 2 743 401 T3

<210> 40  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 40  
**Ser Ser Tyr Ala**  
 1

10 <210> 41  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 41  
**Gly Ser Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asn**  
 1 5 10

20 <210> 42  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 42  
**Ala Arg Ile Gly Phe Gly Ser Leu Cys Phe Asp Cys Asn Leu Tyr Tyr**  
 1 5 10 15

**Gly Met Asp Tyr**  
 20

30 <210> 43  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 43  
**Ser Ser Thr Ala**  
 1

40 <210> 44  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 44  
**Ala Gly Ile Thr Pro Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr**  
**1 5 10**

5 <210> 45  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 45  
**Ala Arg Ile Gly Ser Gly Ser His Trp Ser Ala Phe Asp His Tyr Tyr**  
**1 5 10 15**

**Ala Met Asp Tyr**  
**20**

15 <210> 46  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 46  
**Ser Ser Tyr Ala**  
**1**

25 <210> 47  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

30 <400> 47  
**Gly Ser Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asn**  
**1 5 10**

<210> 48  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 48

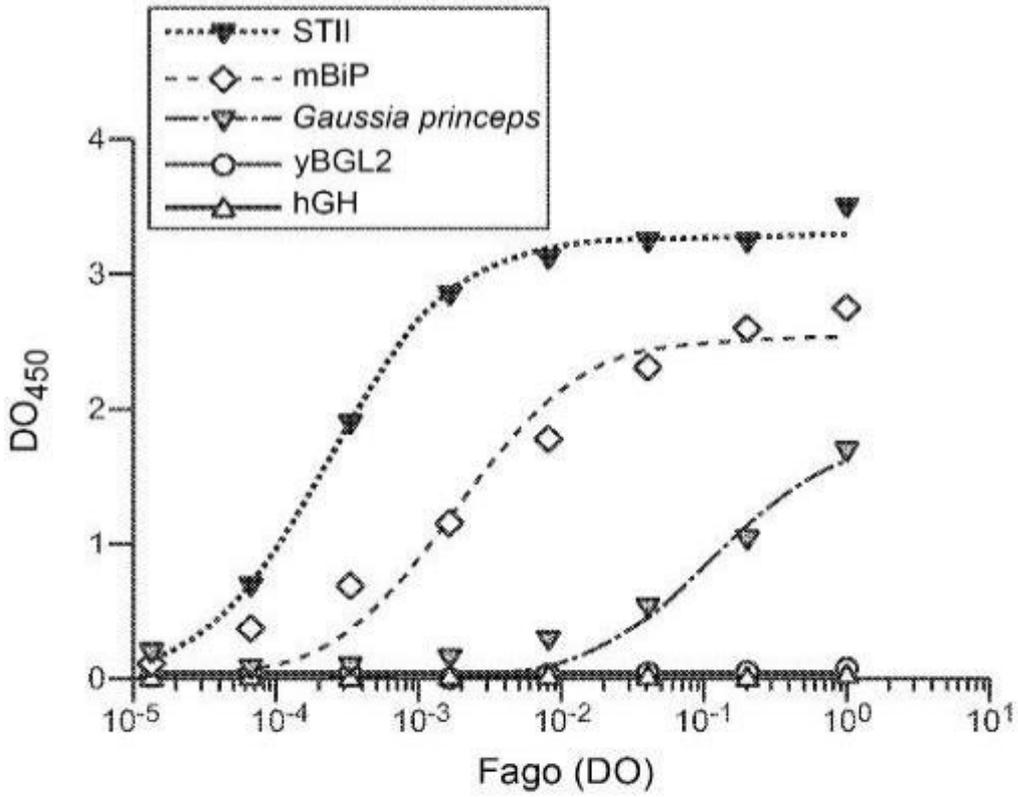
ES 2 743 401 T3

Ala Arg Thr Gly Phe Gly Gly Ile Val Val Asp Trp Ser Leu Tyr Tyr  
1                    5                                    10                                    15

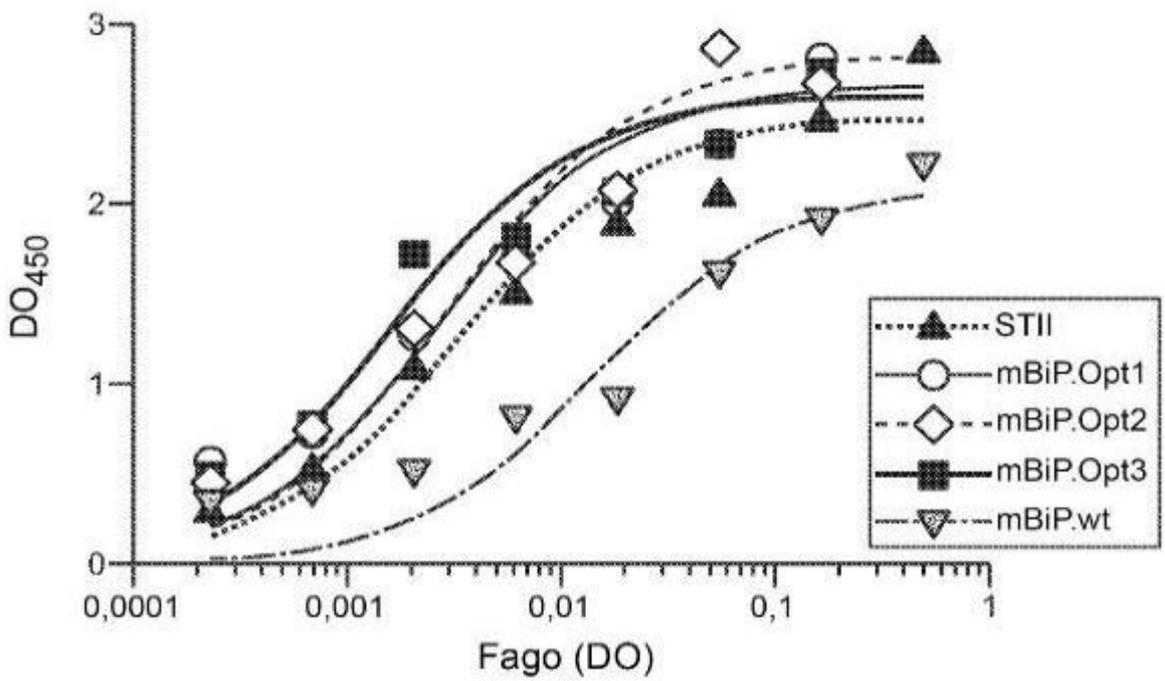
Gly Met Asp Tyr  
                  20

**REIVINDICACIONES**

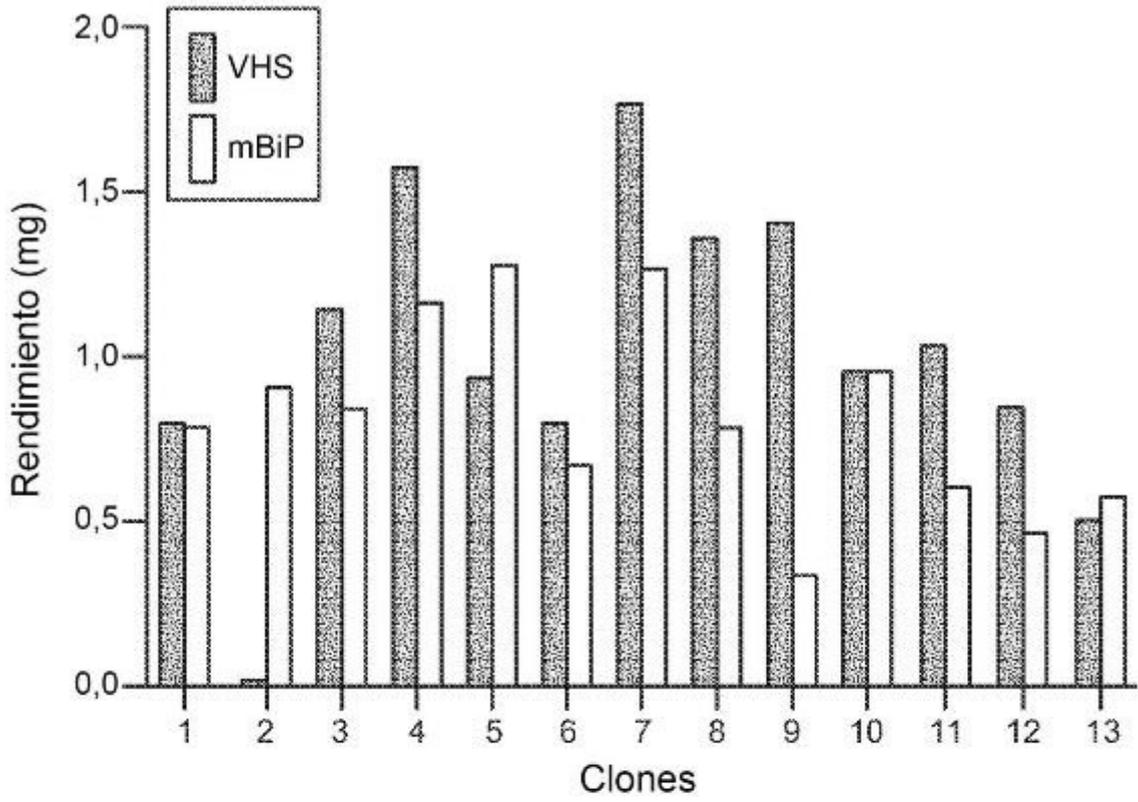
- 5 1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido y un segundo polipéptido, enlazada de forma funcional a una secuencia señal que codifica mBiP, en la que:
- (a) el primer polipéptido comprende un dominio de la cadena pesada variable (VH) que comprende una VH-HVR1, una VH-HVR2 y una VH-VHR3;
- 10 (b) el segundo polipéptido comprende un dominio de la cadena ligera variable (VL) que comprende una VL-HVR1, una VL-HVR2 y una VL-HVR3;
- (c) la secuencia señal se codifica por una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 3
- 15 (d) el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un fragmento Fab, y
- (e) en la que el primer y/o segundo polipéptido cuando se expresa en una célula procariota se fusiona con una proteína de la cubierta seleccionada del grupo que consiste en pI, pII, pIII, pIV, pV, pVI, pVII, pVIII, pIX y pX del bacteriófago M13, f1 o fd o una proteína adaptadora seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 y 7.
- 20 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que el VL y el VH están enlazados a un Fc, marca y/o marcador.
- 25 3. La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el VL está enlazado a una marca y el VH está enlazado a un Fc.
4. La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-3, en la que el ácido nucleico que codifica la proteína de la cubierta está comprendido dentro de un intrón sintético, en la que el intrón sintético es un ácido nucleico que está situado entre el ácido nucleico que codifica el CH1 y el ácido nucleico que codifica una bisagra-Fc o Fc.
- 30 5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4, en la que el intrón sintético está localizado entre el ácido nucleico que codifica el dominio CH2 y el CH3 del anticuerpo o en la que el intrón sintético está localizado entre el ácido nucleico que codifica la región bisagra y el dominio CH2 del anticuerpo.
- 35 6. La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-5, en la que la secuencia señal se codifica por la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.
- 40 7. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 7.
- 45 9. Un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 de modo que se exprese el ácido nucleico.



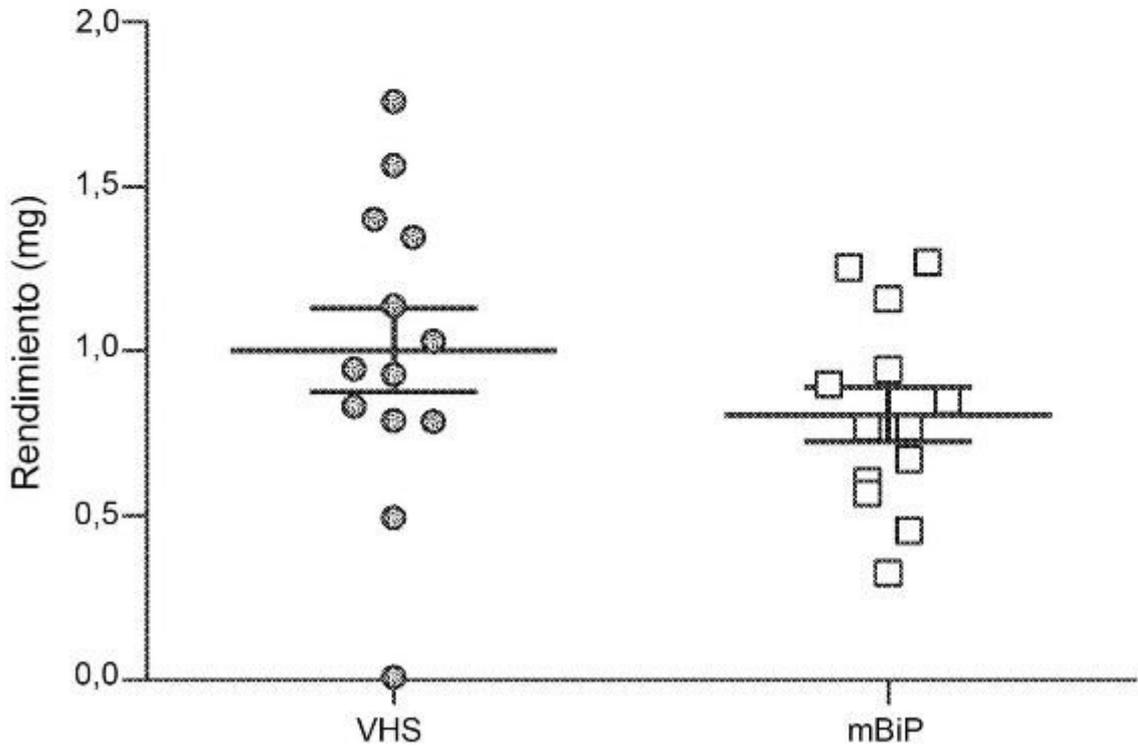
**FIG. 1A**



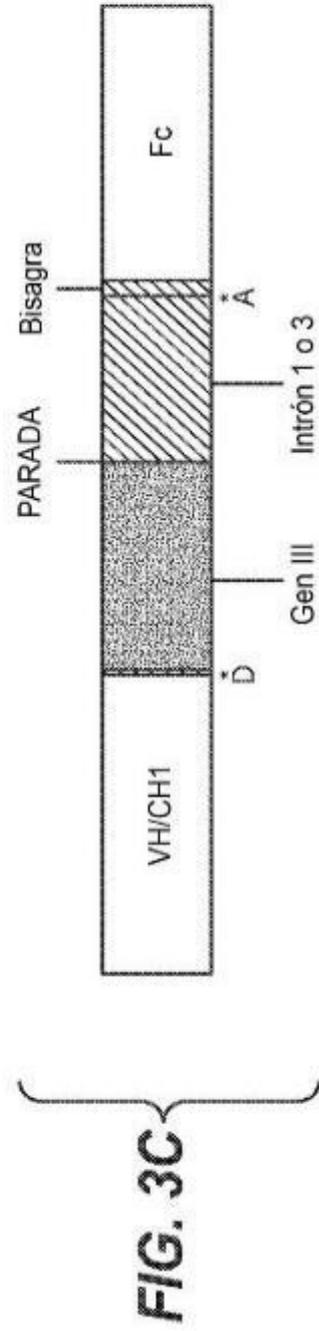
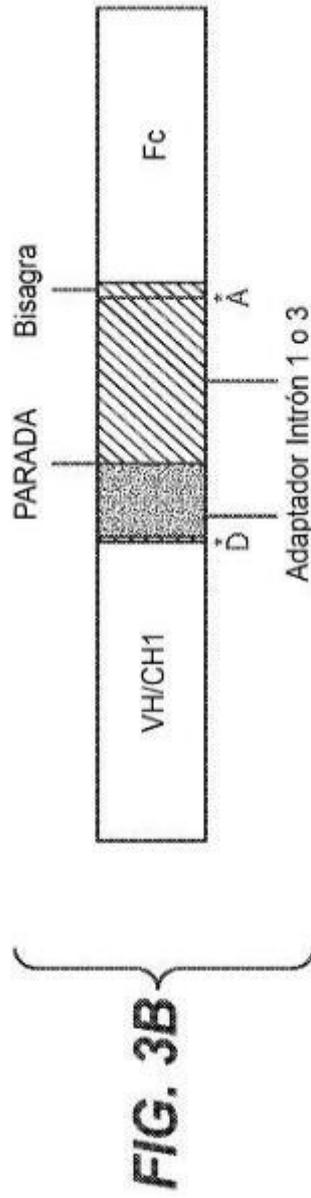
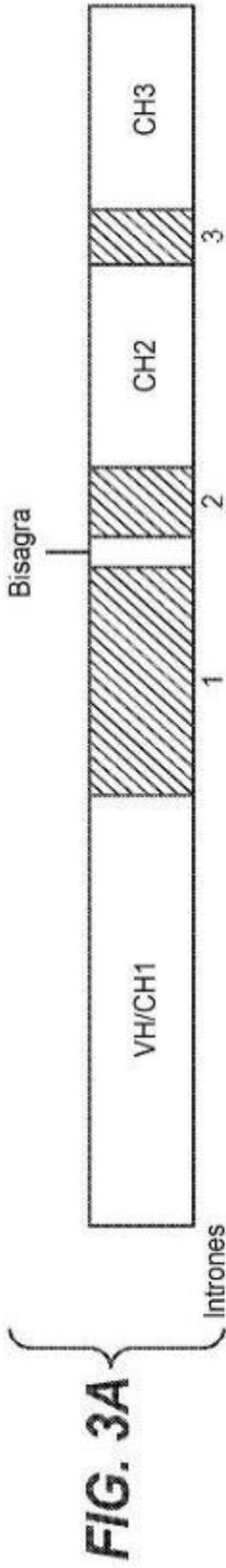
**FIG. 1B**

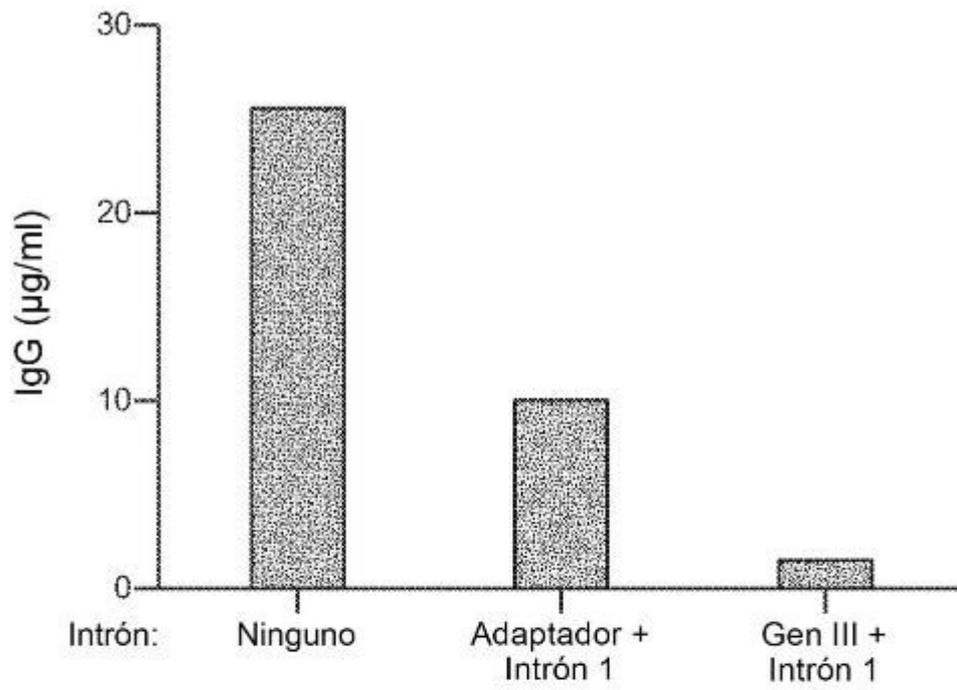


**FIG. 2A**

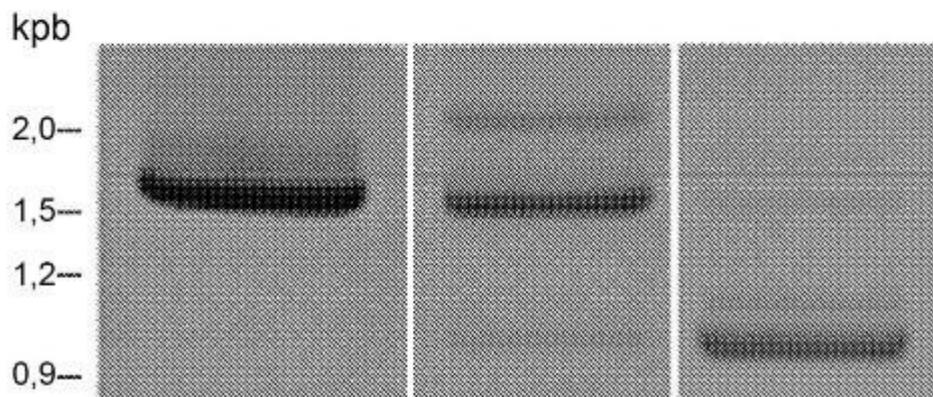


**FIG. 2B**





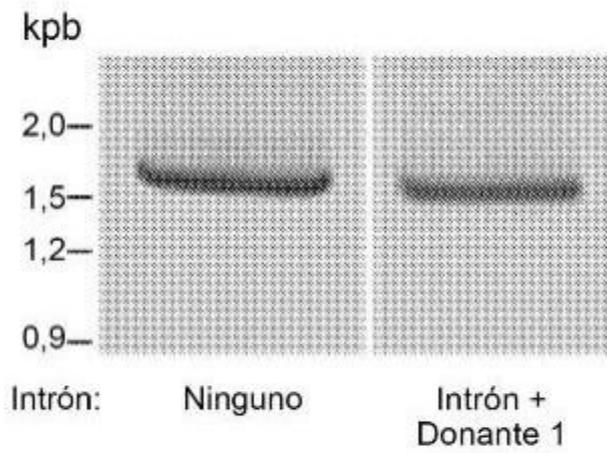
**FIG. 4A**



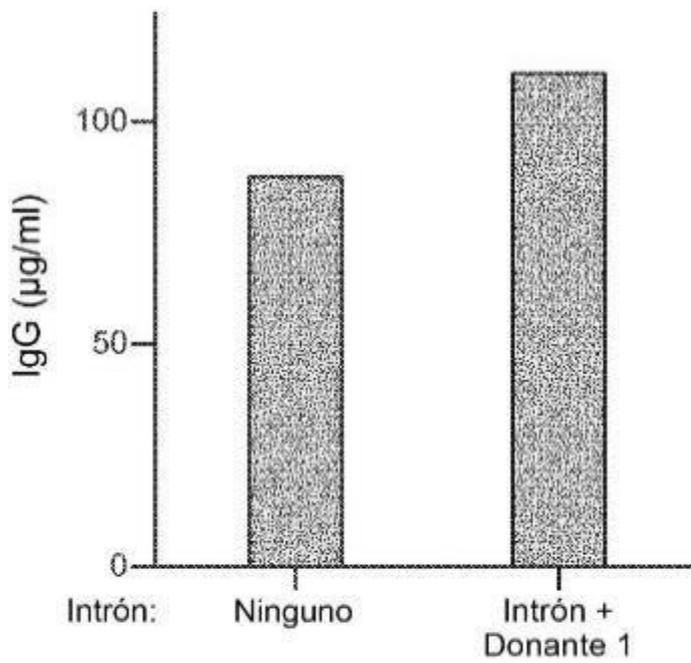
**FIG. 4B**

Donante natural (Intrón 1): T G G T G A G A  
Donante de empalme en 5' consenso: A G G T A A G T  
Donante 1: A G G T A A G A

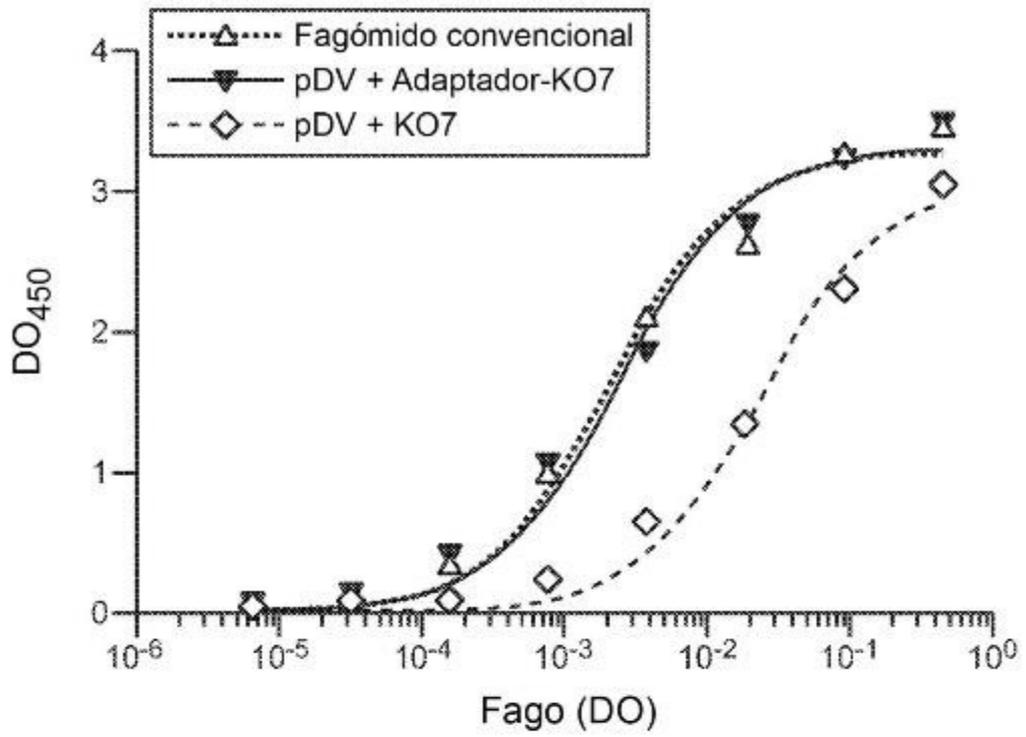
**FIG. 5A**



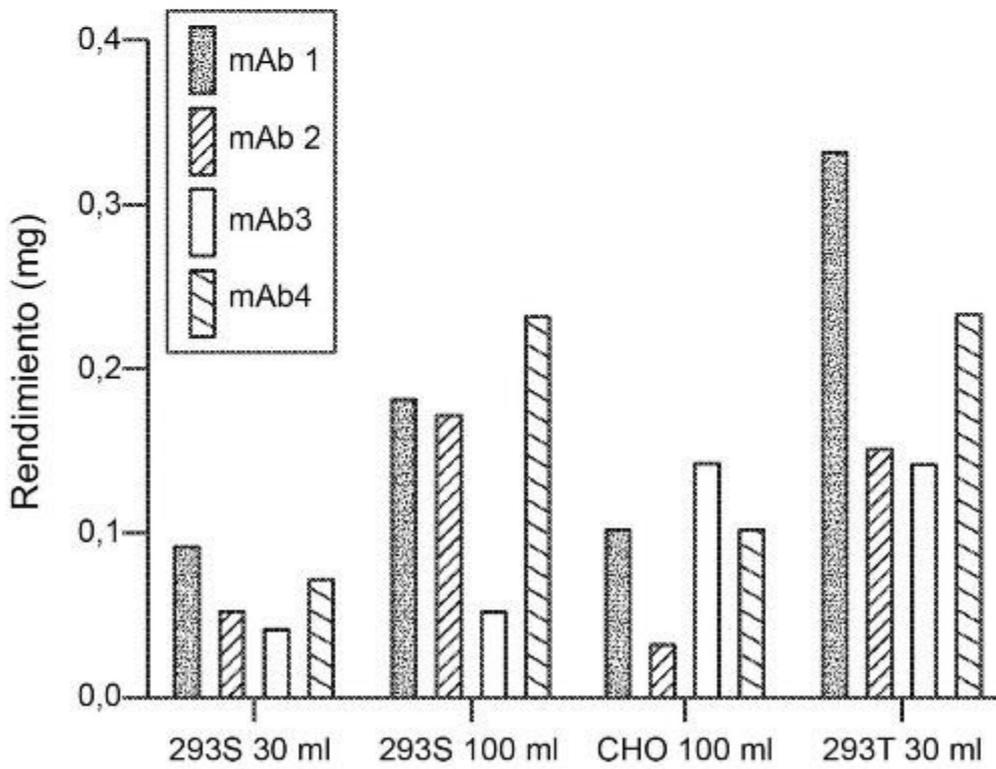
**FIG. 5B**



**FIG. 5C**

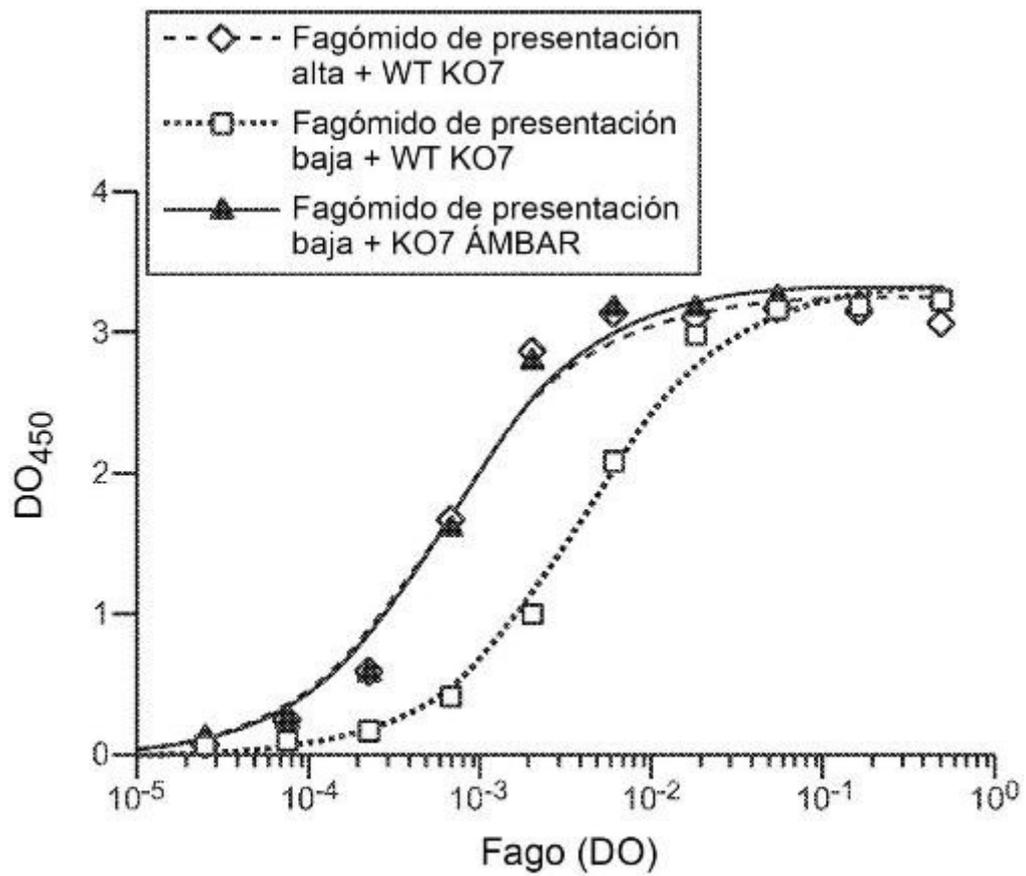


**FIG. 6A**



**FIG. 6B**





**FIG. 9**

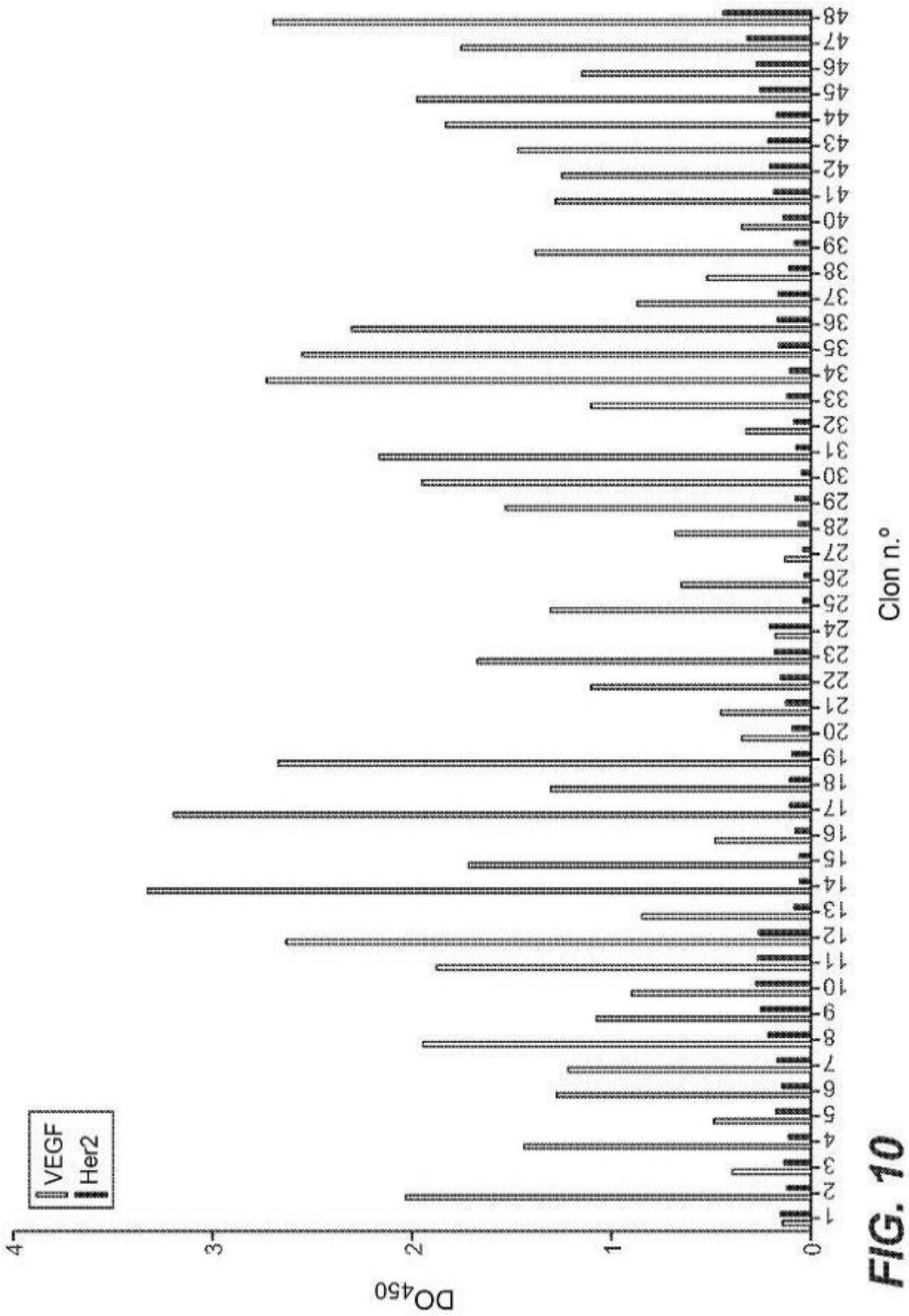
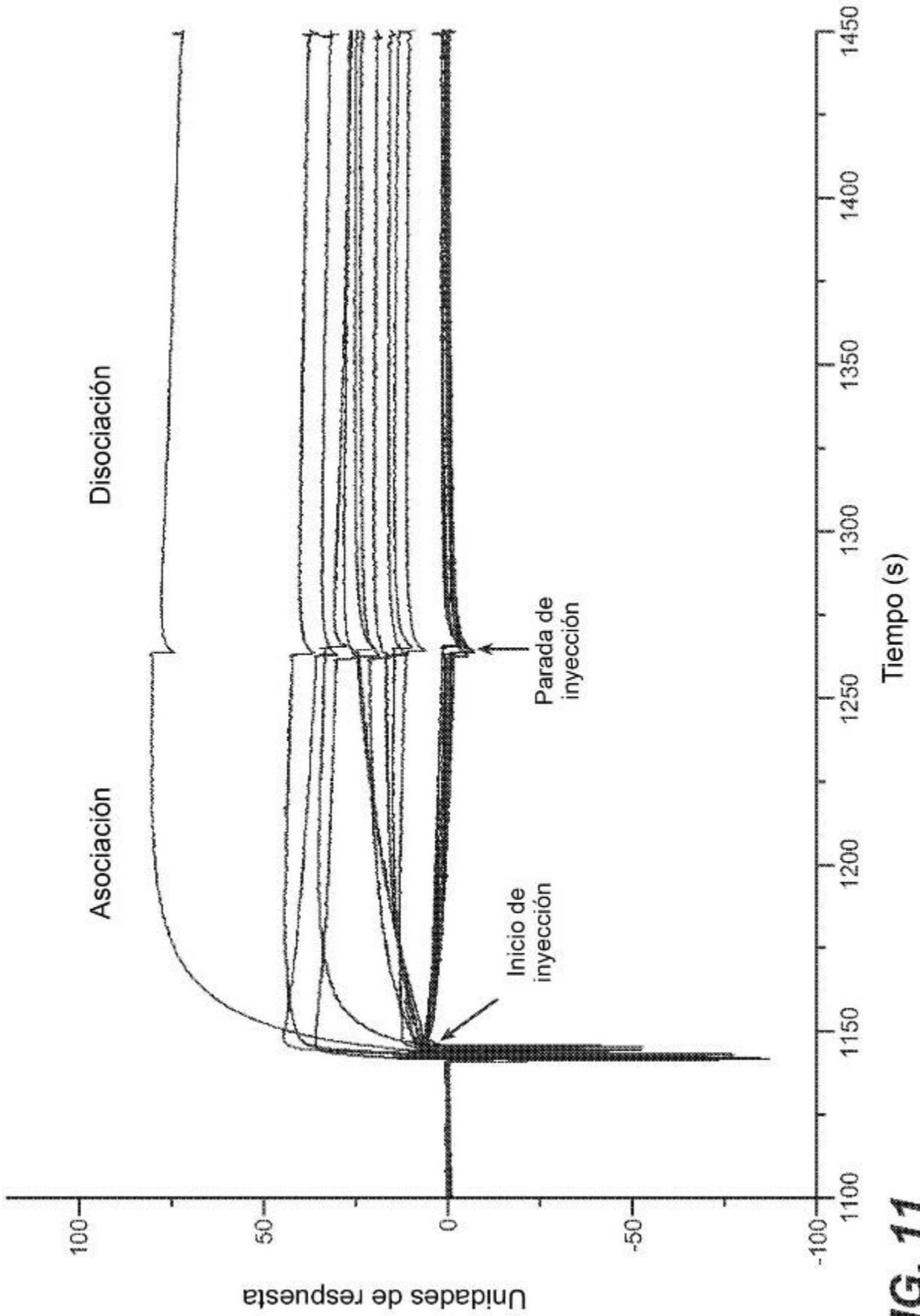


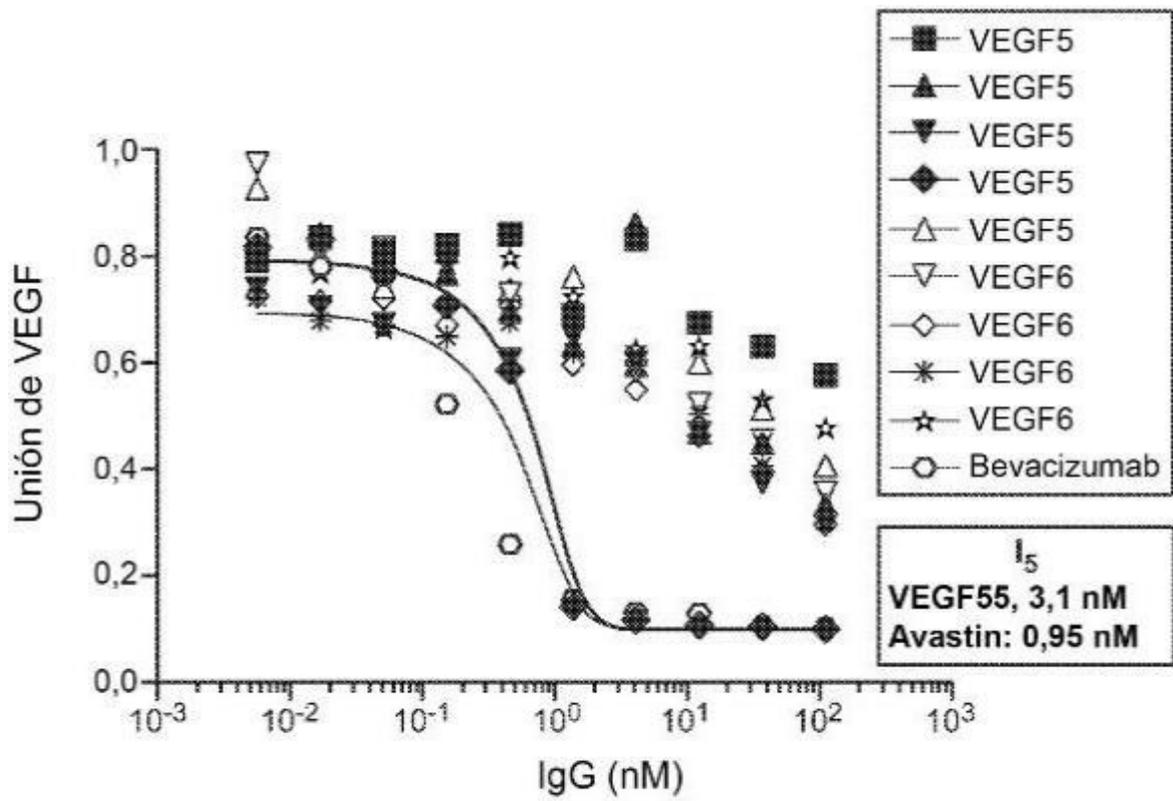
FIG. 10



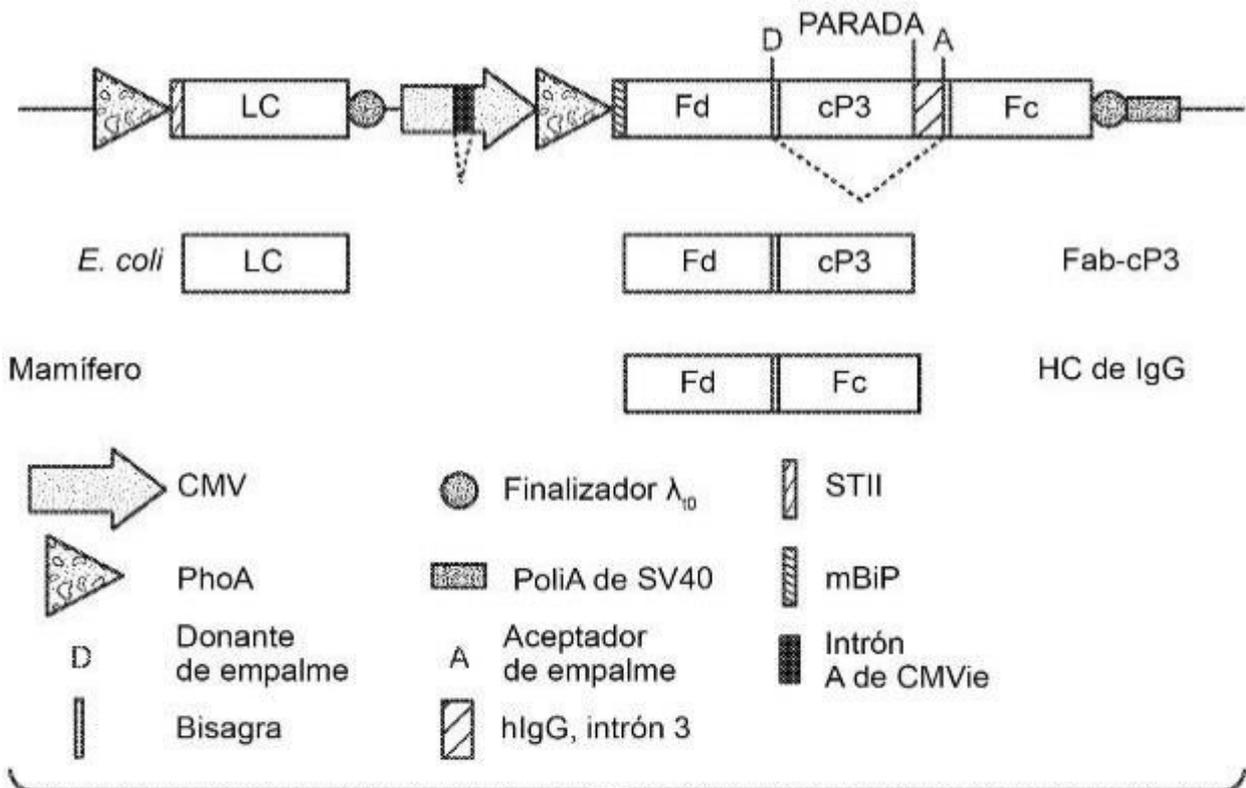
**FIG. 11**

Clon	CDR-H1										CDR-H2										CDR-H3										CDR-H3 101 102 Longitud									
	30	31	32	33	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	93	94	95	96	97	98	101	102	103	104	105	106	107	108	109		110	111	112	113	114	115	116	117	118
VEGF50	T	S	Y	A	G	G	I	S	P	Y	G	G	N	T	Y	A	R	P	G	P	G	G	G	F	D	S	Y	Y	Y	G	. . .	M	D	Y	16					
VEGF51	T	D	Y	A	G	F	I	Y	P	Y	S	G	D	T	Y	A	R	E	V	H	F	W	Y	Y	S	V	. . .	M	D	Y	12									
VEGF52	S	S	Y	G	G	W	I	Y	P	N	S	G	N	T	Y	A	R	F	G	Y	D	V	L	R	Y	W	D	Y	Y	G	. . .	M	A	Y	17					
VEGF59	S	N	T	S	G	W	I	Y	P	Y	G	G	S	T	N	A	R	F	G	Y	Q	H	E	V	Q	F	S	D	H	Y	Y	A	.	M	D	Y	18			
VEGF55	S	G	T	Y	G	F	I	S	P	Y	D	G	Y	T	D	A	R	L	Q	F	N	T	M	W	V	. . .	M	D	Y	11										
VEGF60	S	S	Y	A	G	S	I	N	P	N	S	G	Y	T	N	A	R	I	G	F	G	S	L	C	F	D	C	N	L	Y	Y	G	.	M	D	Y	18			
VEGF61	S	S	T	A	A	G	I	T	P	Y	S	G	N	T	Y	A	R	I	G	S	G	S	H	W	S	A	F	D	H	Y	Y	A	.	M	D	Y	18			
VEGF64	S	S	Y	A	G	S	I	N	P	N	S	G	Y	T	N	A	R	T	G	F	G	G	I	V	V	D	H	N	S	L	Y	Y	G	.	M	D	Y	18		

FIG. 12



**FIG. 13**



**FIG. 14**

Clones de las propiedades de expresión y unión de IgG seleccionados con hVEGF

Nombre del clon	ELISA de fagos	Expresión de IgG (mg) <sup>a</sup>	BIAcore (IgG) <sup>b</sup>	BV ELISA Puntuación	VEGF-R1 $CI_{50}$ (nM)
VEGF50	+	0,15	+	0,22	>10
VEGF51	+	0,22	+	0,28	>10
VEGF52	+	0,21	+	0,32	>10
VEGF55	+	0,24	+	0,40	0,6
VEGF59	+	0,06	+	0,29	>10
VEGF60	+	0,15	+	0,24	>10
VEGF61	+	0,12	+	0,23	>10
VEGF64	+	0,20	+	0,21	>10

<sup>a</sup> Se indican los rendimientos de expresión de 100 ml de cultivos de células CHO.

<sup>b</sup> El ensayo BIAcore se ejecutó usando sobrenadante bruto de 1 ml de cultivos de células 293T, mientras que los ensayos de bloqueo de BV ELISA y VEGF-R1 se realizaron usando material purificado de cultivos de CHO.

**FIG. 15**