

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 149**

51 Int. Cl.:

C12P 21/04 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2005** **E 10014128 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 2343380**

54 Título: **Intercambio de casetes de la región variable de la inmunoglobulina**

30 Prioridad:

16.11.2004 US 628581 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2020

73 Titular/es:

HUMANIGEN, INC. (100.0%)
533 Airport Boulevard, Suite 400
Burlingame, CA 94010, US

72 Inventor/es:

BEBBINGTON, CHRISTOPHER;
LUEHRSEN, KENNETH y
YARRANTON, GEOFFREY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 744 149 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

Intercambio de casetes de la región variable de la inmunoglobulina

Antecedentes de la invención

Los restos de anticuerpos de unión a antígenos comprenden normalmente dos dominios de inmunoglobulina: un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L). Cada dominio tiene tres bucles de secuencia variable que forman las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las seis CDR (tres procedentes del V_H y tres procedentes del V_L) se extienden desde una cara de la estructura de la región variable formando el sitio de unión al antígeno. En la mayoría de anticuerpos, se requiere la asociación apropiada de las dos cadenas para unirse al antígeno con afinidad significativa. Así, un dominio V_H y uno V_L forman juntos la unidad mínima de unión al antígeno.

Se ha hecho un uso generalizado de los anticuerpos monoclonales, en particular de los derivados de roedores, incluidos los ratones. Sin embargo, con frecuencia provocan una respuesta inmunitaria en el uso clínico en seres humanos (por ejemplo, Miller, R. A. *et al.*, *Blood* 62:988-995 (1983); Schroff, R. W. *et al.*, *Cancer Res.* 45:879-885 (1985)). La técnica ha intentado superar este problema construyendo anticuerpos "quiméricos" en los que un dominio variable animal de unión a antígeno está acoplado a un dominio constante humano (patente estadounidense nº 4.816.567; Morrison, S. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Boulianne, G. L. *et al.*, *Nature* 312:643-646 (1984); Neuberger, M. S. *et al.*, *Nature* 314:268-270 (1985)).

En un esfuerzo adicional por minimizar el uso de secuencias heterólogas en anticuerpos humanos, se han descrito varios planteamientos de humanización (por ejemplo, Jones, P. T. *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann, L. *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven, M. *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-33 (1989); patentes estadounidenses nºs 5.693.762 y 5.585.089). En tales técnicas, se insertan en un marco humano CDR de una inmunoglobulina del donante. Normalmente, también se sustituyen residuos adicionales en los marcos del anticuerpo aceptor humano con residuos de roedor para preservar la conformación nativa de las CDR de roedor necesarias para recuperar la plena actividad de unión. Así, los anticuerpos humanizados a menudo retienen seis CDR del anticuerpo de roedor y varios residuos adicionales de roedor en las regiones marco. Al transferir las seis CDR del anticuerpo de roedor a marcos humanos, normalmente se retiene la especificidad del anticuerpo de partida en el anticuerpo humanizado, pero la afinidad del anticuerpo humanizado, en muchos casos, se reduce con respecto al anticuerpo de partida. En consecuencia, pueden requerirse varias iteraciones de proceso de humanización, en las que se construyen y someten a ensayo combinaciones alternativas de retromutaciones en las regiones marco, para obtener afinidades de unión adecuadas. Incluso después de múltiples iteraciones, no siempre es posible identificar anticuerpos injertados con CDR con afinidades equivalentes a la del anticuerpo de partida.

También se han aislado *in vitro* anticuerpos humanos mediante la expresión de repertorios de genes de anticuerpos en sistemas microbianos de expresión. Existen varias tecnologías de visualización en las que los fragmentos de anticuerpo expresados se presentan como proteínas de fusión ligadas a la superficie de una célula microbiana o de un bacteriófago. El fago o célula anfitriona sirve de paquete de visualización genética duplicable (rgdp), y los rgdp que se unen a un antígeno específico pueden ser seleccionados y expandidos en cultivo para aislar los genes que codifican anticuerpos contra el antígeno seleccionado. Los fragmentos de antígeno pueden ser seleccionados de esta forma a partir de la expresión en la superficie de una levadura (Feldhaus *et al.*, *Nat Biotechnol.* 21:163-70, 2003), de células bacterianas (Daugherty *et al.*, *Protein Eng.* 12:613-21, 1999) o, más comúnmente, en un fago. La visualización en fagos permite el estudio de grandes bibliotecas combinatorias en busca de anticuerpos infrecuentes de unión a antígenos (Hoogenboom y Winter, *J Mol Biol.* 227:381, 1992; Marks *et al.*, *J Mol Biol.* 222:581, 1991; Winter *et al.*, *Annu Rev Immunol.* 12:433-55, 1994). Pueden crearse grandes bibliotecas combinatorias de ligantes potenciales a partir de dos bibliotecas menores para la selección de la combinación deseada. Por ejemplo, una primera biblioteca de 10^7 cadenas H puede ser creada y manifestada en un bacteriófago. Una segunda biblioteca de 10^7 cadenas L, encontrándose las secuencias codificantes para estas cadenas ligeras dentro de un vector plasmídico, se expresa en el espacio periplasmático de una bacteria anfitriona. Las bibliotecas de cadena H y cadena L se combinan, proporcionando 10^{14} combinaciones de cadenas H y L en la superficie del fago resultante en el sobrenadante bacteriano.

En la técnica se conocen métodos diversos de aumento de la diversidad en las bibliotecas de anticuerpos en fagos. Un método tal implica combinar colecciones aleatorias de secuencias de CDR codificadas por línea germinal en un conjunto de regiones marco humanas para generar bibliotecas artificiales de anticuerpos humanos ("mezcla de CDR") (véanse, por ejemplo, Jirholt *et al.*, *Gene* 215: 471, 1998; Soderlind *et al.*, *Nat Biotechnol.* 18:852-6, 2000).

La visualización en fagos también puede ser usada para identificar anticuerpos humanos con la especificidad de unión de un anticuerpo de roedor mediante un proceso de selección guiada en la que una biblioteca de cadenas V_L humanas es emparejada con la cadena V_H del anticuerpo de roedor y se seleccionan anticuerpos semihumanos para la unión al antígeno. Las cadenas humanas identificadas son emparejadas entonces con una biblioteca de cadenas V_H humanas para identificar pares V_H - V_L humanos capaces de unirse al antígeno (por ejemplo, patente estadounidense 5.565.332; Jespers, *et al.*, *Bio/Technology* 12:899-903, 1994; Beiboer *et al.*, *J Mol Biol.* 296:833-49, 2000). En algunos casos, en la selección guiada se retiene la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo

de roedor (Klimka *et al.*, *Br J Cancer* 83:252-60, 2000). En otros casos, en el anticuerpo humanizado final, tras la selección guiada, se retienen tanto la CDRH3 como la CDRL3 del anticuerpo de roedor (por ejemplo, Rader *et al.*, *Proc Natl Acad Sci US A.* 95:8910-5, 1998).

En todos estos casos, normalmente se usan bibliotecas de diversidad elevada para identificar anticuerpos con altas afinidades. Por lo tanto, los anticuerpos humanos derivados de las tecnologías de la técnica tienden a tener un número significativo de diferencias en aminoácidos con respecto a la secuencia de línea germinal más cercana. Tal mutación somática contribuye a la generación de anticuerpos de alta afinidad en anticuerpos naturales (por ejemplo, England *et al.*, *J. Immunol.* 162:2129, 1999) y generalmente se la ha considerado importante para la generación de anticuerpos de alta afinidad en los anticuerpos generados a partir de bibliotecas *in vitro*. Sin embargo, tales mutaciones generan nuevas secuencias proteínicas que pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario del cuerpo. Cabe esperar que el sistema inmunitario no responda (que sea "tolerante") a inmunoglobulinas expresadas ampliamente durante el desarrollo —es decir, secuencias encontradas en la forma de línea germinal no mutada—, pero las mutaciones en estas secuencias pueden permitir que el sistema inmunitario distinga estas como proteínas extrañas. Así, cabe esperar que anticuerpos con numerosas diferencias con respecto a las secuencias de línea germinal sean inmunogénicos cuando se usan terapéuticamente en seres humanos.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos mejorados para humanizar anticuerpos de roedor para reducir más el potencial de inmunogenicidad a la vez que se retiene la especificidad y la afinidad de unión del anticuerpo de partida. También existe la necesidad de métodos para identificar anticuerpos humanos con la especificidad de un anticuerpo de referencia de partida —por ejemplo, un anticuerpo murino—, pero que utilicen secuencias de inmunoglobulina humana que sean de línea germinal o estén cercanas a la misma. La invención aborda esta necesidad.

La invención proporciona, además, soluciones a problemas de fiabilidad inherentes en las tecnologías de humanización de anticuerpos, incluyendo la selección guiada por cadenas y el injerto de CDR. Las tecnologías de injerto de CDR proporcionan anticuerpos con secuencias marco V_H y V_L humanas, pero que retienen porciones significativas de la región variable del anticuerpo de referencia. Estas pueden tener una afinidad reducida con respecto al anticuerpo de partida, y pueden ser laboriosas de producir por medio de múltiples etapas iterativas de ingeniería genética. La presente invención proporciona métodos de modificación genética de un anticuerpo de referencia para proporcionar un anticuerpo humanizado que retiene afinidad hacia el antígeno diana.

Chung *et al.* (2004) *The FASEB Journal*: 18; 361-363 da a conocer el uso de la visualización en fagos para seleccionar anticuerpos monoclonales específicos a la integrina $\alpha IIb\beta 3$ procedente de una biblioteca de anticuerpos humanos sintéticos basada en la secuencia de HCDR3 aleatorizada VGXXXRADXXXYAMDV.

El documento WO 2004/006955 da a conocer métodos para humanizar anticuerpos basados en la selección de secuencias marco de la región variable procedentes de genes de anticuerpos humanos comparando tipos de la estructura canónica de CDR para secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo no humano con tipos de la estructura canónica de CDR para CDR correspondientes provenientes de una biblioteca de secuencias de anticuerpos humanos, preferiblemente segmentos de genes de anticuerpos de línea germinal.

Rader *et al.* (1998) *PNAS*: 95; 8910-8915 da a conocer la incorporación de secuencias clave de reconocimiento procedentes del anticuerpo de roedor parental usando una estrategia de selección basada en una manifestación en fago. Se mantuvieron las secuencias originales de las terceras CDR de cadenas pesadas y ligeras, HCDR3 y LCDR3, y todas las demás secuencias fueron sustituidas por secuencias humanas seleccionadas de bibliotecas de anticuerpos manifestados en fagos.

El documento WO 97 /008320 da a conocer bibliotecas de anticuerpos sintéticos y genes artificiales que codifican anticuerpos sintéticos. Divulga que los "*genes completamente sintéticos*" se construyen a partir de módulos que representan de subelementos estructurales a escala de polipéptido. Los módulos se definen como compuestos por módulos marco y CDR y, para la creación de bibliotecas de anticuerpos, los polipéptidos son (o se derivan de) regiones variables de cadena pesada o ligera en las que los subelementos estructurales son las regiones marco 1, 2, 3 o 4 o las regiones determinantes complementarias 1, 2 o 3.

Breve compendio de la invención

La presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos modificados genéticamente con la especificidad de un anticuerpo de referencia mediante la sustitución de porciones de las secuencias V_H y V_L del anticuerpo de referencia con secuencias procedentes de repertorios de anticuerpos humanos. Se dan a conocer composiciones novedosas que comprenden dominios variable de inmunoglobulina híbrida que contienen una combinación de marcos (FR) y CDR procedentes de diferentes clones de anticuerpos. También se dan a conocer bibliotecas de regiones V híbridas.

Así, en un aspecto, la invención proporciona un método de modificación genética de un anticuerpo que retiene la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia hacia un antígeno diana, comprendiendo el método:

(a) obtener una región variable a partir del anticuerpo de referencia;

(b) sustituir al menos un casete de intercambio obtenido de un segmento V, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3, de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de los correspondientes casetes de intercambio provenientes de segmentos V humanos, generando con ello una biblioteca de regiones V híbridas que comprenden miembros en los que el al menos un casete de intercambio de la región variable del anticuerpo de referencia es sustituido con los correspondientes casetes de intercambio humanos codificados por diferentes genes, con la condición de que el al menos un casete de intercambio tenga menos de tres regiones marco (FR), en el que el al menos un casete de intercambio obtenido del segmento V de la región variable del anticuerpo de referencia incluye al menos una CDR intacta adjunta a al menos una FR intacta del segmento V que se dan juntas de forma natural;

(c) emparejar la biblioteca de regiones V híbridas de (b) con una región V complementaria; y

(d) seleccionar un anticuerpo que comprende una región V híbrida que tiene al menos un casete intercambiado generado en la etapa (b) que tiene una afinidad de unión con el antígeno diana. El casete de intercambio se selecciona generalmente del grupo constituido por FR1-CDR1, FR1-CDR1-FR2, FR2-CDR2-FR3, CDR2-FR3, CDR1-FR2, CDR1-FR2-CDR2, CDR1-FR2-CDR2-FR3, FR1-CDR1-FR2-CDR2 y FR2-CDR2. A menudo, el casete de intercambio se selecciona del grupo constituido por FR1-CDR1, FR1-CDR1-FR2, FR2-CDR2-FR3 y CDR2-FR3. Además, al menos uno de los casetes humanos de intercambio puede ser una secuencia de línea germinal humana. El anticuerpo que se selecciona puede ser un fragmento Fv, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un scFv, u otro fragmento de una inmunoglobulina, tal como un fragmento que está borrado en CH2 o CH3.

El método también puede comprender etapas adicionales de:

(e) sustituir un segundo casete de intercambio, que comprende al menos una CDR intacta unida a al menos una FR intacta, que se dan juntas de forma natural, de la región V del anticuerpo de referencia con una biblioteca de los correspondientes casetes de intercambio provenientes de segmentos V humanos para crear una segunda biblioteca híbrida de regiones V híbridas;

(f) emparejar la segunda biblioteca de regiones V híbridas con una región V complementaria;

(g) seleccionar un anticuerpo que comprende una segunda región V híbrida, anticuerpo que tiene una afinidad de unión con el antígeno diana; y

(h) combinar el casete humano de intercambio del anticuerpo de (d) con el segundo casete humano de intercambio del anticuerpo de (g), para obtener un anticuerpo con la especificidad de unión del anticuerpo de referencia que tiene una región V híbrida que comprende al menos dos casetes humanos de intercambio.

Estas etapas se pueden llevar a cabo de forma concurrente con (b) a (d); o de forma secuencial, en cualquier orden con respecto a las etapas (b) a (d).

En algunas realizaciones, el método comprende, además, una etapa de sustitución del CDR3-FR4 de una región V híbrida con una biblioteca de regiones CDR3-FR4, emparejando la región variable con una región variable complementaria, y seleccionando un anticuerpo que tenga alta especificidad de unión con el antígeno diana.

La región V complementaria de (c) o (f) puede ser, por ejemplo, una región V que comprende un segmento V que se da de forma natural, una región V híbrida, o una región V híbrida que sea miembro de una biblioteca que comprende diferentes regiones V híbridas.

En algunas realizaciones de la invención, se expresan y secretan anticuerpos que comprende una o más regiones V híbridas en forma soluble procedentes de una célula anfitriona —por ejemplo, una célula procariota, una levadura o una célula de mamífero—, y se unen a un antígeno.

En realizaciones alternativas, se manifiesta en una célula, una espora o un virus un anticuerpo que comprende una región V híbrida.

En un procedimiento ejemplar de intercambio de casetes, la invención proporciona un método de modificación genética de un anticuerpo que comprende: (a) obtener una región variable (una región variable ya sea de cadena pesada o de cadena ligera) de un anticuerpo de referencia que tenga una especificidad deseada de unión; (b) sustituir el FR1-CDR1-FR2 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR1-CDR1-FR2 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejando las regiones variables híbridas con una región variable complementaria, y seleccionando un anticuerpo que tenga una afinidad detectable por el antígeno diana; (c) sustituir el FR2-CDR2-FR3 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR2-CDR2-FR3 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejando las regiones variables híbridas con una región variable complementaria, y seleccionando un anticuerpo que tenga una afinidad por el antígeno diana; (d) combinar el FR1-CDR1-FR2 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (b) con el FR2-CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (c) para obtener un anticuerpo con un segmento de la región V variable humana, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia.

En realizaciones adicionales, el FR1-CDR1-FR2 y/o el FR2-CDR2-FR3 proceden de una biblioteca de secuencias de línea germinales humanas.

Las etapas del método pueden ejecutarse de forma concurrente o secuencial. Además, cuando se llevan a cabo secuencialmente, las etapas (b) y (c) pueden realizarse en cualquier orden.

- 5 La región V complementaria de (b) o (c) puede ser, por ejemplo, una región V que comprende un segmento V que se da de forma natural, una región V híbrida o una región V híbrida que es miembro de una biblioteca que comprende diferentes regiones V híbridas.

En una realización, la etapa de combinación del FR1-CDR1-FR2 con el FR2-CDR2-FR3 comprende combinar las regiones FR2 en una región de homología; es decir, el FR1-CDR1-FR2 y el FR2-CDR2-FR3 se combinan en un área
10 que tiene una identidad de secuencias, por ejemplo, de al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 90% o mayor en la región FR2. La "combinación" puede tener lugar, por ejemplo, mediante recombinación.

Alternativamente, la combinación del FR1-CDR1-FR2 con el FR2-CDR2-FR3 comprende sustituir la FR2 del FR1-CDR1-FR2 con la FR2 del FR2-CDR2-FR3, o sustituir la FR2 del FR2-CDR2-FR3 con la FR2 del FR1-CDR1-FR2.

- 15 El método anteriormente definido también puede comprender una etapa adicional de sustitución del CDR3-FR4 de una región variable híbrida que comprende al menos un segmento V humano, *supra*, con una biblioteca de regiones CDR3-FR4 humanas, de emparejamiento de la región variable con una región variable complementaria, y de selección de un anticuerpo que se una al antígeno diana.

En otra realización, el método puede comprender la sustitución del FR3-CDR3-FR4 de una región variable híbrida que comprende al menos un segmento V humano, *supra*, con una biblioteca de regiones FR3-CDR3-FR4, el
20 emparejamiento de la región variable con una región variable complementaria, y la selección de un anticuerpo que tenga una afinidad detectable por el antígeno diana. La realización comprende, además, la combinación del FR3-CDR4-FR4 de la región variable híbrida del anticuerpo anteriormente seleccionado con el FR2-CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (d) para obtener un anticuerpo con estos segmentos de la región V variable humana, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia.

- 25 Se divulga que un procedimiento de modificación genética de anticuerpos comprende:

- (a) obtener una región variable de un anticuerpo de referencia que tiene una especificidad deseada de unión;
- (b) sustituir el FR1-CDR1-FR2 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones FR1-CDR1-FR2 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, emparejando las regiones variables
30 híbridas con una región variable complementaria, y seleccionando un anticuerpo que tenga una afinidad detectable por el antígeno diana;
- (c) sustituir el CDR2-FR3 de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones CDR2-FR3 humanas para crear una biblioteca de regiones variables híbridas, en la que la CDR2 del CDR2-FR3 del anticuerpo de referencia es una CDR2 parcial y la biblioteca de secuencias CDR2-FR3 humanas comprende
35 correspondientes secuencias CDR2-FR3 parciales, emparejando las regiones variables híbridas con una región variable complementaria, y seleccionando un anticuerpo que tenga una afinidad detectable por el antígeno diana, y
- (d) combinar el FR1-CDR1-FR2 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (b) con el CDR2-FR3 de la región variable híbrida del anticuerpo seleccionado en (c) para obtener un anticuerpo con un segmento de la
40 región V variable humana, anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia.

En algunas realizaciones, el método también comprende una etapa de sustitución del CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia con una biblioteca de regiones CDR3-FR4 humanas, de emparejamiento de la región variable con una
45 región variable complementaria, y de selección de un anticuerpo que se una al antígeno diana. Las regiones CDR3 de la biblioteca del CDR3-FR4 humano pueden ser regiones CDR3 completas o regiones CDR3 parciales.

En realizaciones alternativas, el método ejemplar comprende, además: (e) sustituir el FR4 de la región variable del anticuerpo de referencia de referencia o del anticuerpo modificado genéticamente con una biblioteca de regiones FR4, emparejando la región variable con una región variable complementaria, y seleccionado un anticuerpo que tenga una
50 afinidad detectable por el antígeno diana.

También se divulga un anticuerpo modificado genéticamente que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia —por ejemplo, un anticuerpo no humano—, comprendiendo el anticuerpo modificado genéticamente: un dominio variable que comprende un segmento génico V que tiene un casete humano de intercambio procedente de un gen de anticuerpo humano y un segundo casete de intercambio procedente de un gen de anticuerpo diferente;
55 teniendo cada uno de los casetes de intercambio primero y segundo al menos un marco unido en el orden natural a una CDR, con la condición de que el casete de intercambio tenga menos de tres regiones marco; y una CDR3 y una FR4 procedentes de un anticuerpo de referencia. Los casetes de intercambio primero y/o segundo pueden ser una

secuencia de línea germinal humana.

En la presente memoria también se da a conocer un anticuerpo modificado genéticamente en el cual al menos una FR3 de un anticuerpo de referencia ha sido sustituida con una FR3 humana. La FR3 puede ser la FR3 de cadena pesada o ligera. Pueden sustituirse las regiones FR3 de cadena tanto pesada como ligera.

- 5 Además, se dan a conocer bibliotecas de regiones V híbridas. Una biblioteca de regiones V híbridas dada a conocer en la presente memoria comprende miembros que tienen regiones V diferentes. Una región V híbrida en la biblioteca tiene una CDR —por ejemplo, un MEBSD— procedente de un anticuerpo de referencia y al menos un casete de intercambio procedente de un repertorio humano, con la condición de que el casete de intercambio tenga menos de tres regiones marco. El casete de intercambio puede ser, por ejemplo, FR1-CDR1, FR1-CDR1-FR2, FR2-CDR2-FR3 o CDR2-FR3. El casete de intercambio puede ser una secuencia de línea germinal humana.

El miembro de la biblioteca puede tener al menos dos casetes de intercambio provenientes de un repertorio humano.

Normalmente, la CDR del anticuerpo de referencia que está presente en los miembros de la biblioteca es una secuencia CDR3. Además, los miembros de la biblioteca tienen a menudo una secuencia FR4 humana, que puede ser la misma secuencia o diferentes secuencias en diversos miembros de la biblioteca.

- 15 También se da a conocer un método de modificación genética de un anticuerpo que comprende un dímero V_H que retiene la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia. Tales métodos emplean casetes de intercambio descritos en la presente memoria; sin embargo, durante la generación del anticuerpo, no hay etapa alguna de emparejamiento de la región V_H híbrida con una región V_L complementaria. Así, el método, normalmente, comprende (a) obtener una región variable de cadena pesada del anticuerpo de referencia —por ejemplo, un anticuerpo camélido de referencia—; (b) sustituir al menos un casete de intercambio de un segmento génico V de la región variable con una biblioteca de los correspondientes casetes de intercambio procedentes de segmentos génicos V humanos, generando con ello una biblioteca de regiones V híbridas, con la condición de que el casete de intercambio tenga menos de tres regiones marco, y (d) seleccionar un anticuerpo que comprende una región V híbrida que tiene afinidad de unión con el antígeno diana. El casete de intercambio se selecciona generalmente del grupo constituido por FR1-CDR1, FR1-CDR1-FR2, FR2-CDR2-FR3, CDR2-FR3, CDR1-FR2, CDR1-FR2-CDR2, CDR1-FR2-CDR2-FR3, FR1-CDR1-FR2-CDR2 y FR2-CDR2. A menudo, el casete de intercambio se selecciona del grupo constituido por FR1-CDR1, FR1-CDR1-FR2, FR2-CDR2-FR3 y CDR2-FR3. Tal anticuerpo puede ser expresado, por ejemplo, en una célula anfitriona, tal como una célula procariota, una levadura o una célula de mamífero, o puede manifestarse en la superficie de una célula, de una espora o de un virus.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1a-1c proporciona un esquema que muestra una sustitución del casete de intercambio de un casete FR1-CDR1-FR2 en un anticuerpo de referencia.

La Figura 2a-2c proporciona un esquema que muestra una sustitución del casete de intercambio de un casete FR2-CDR2-FR3 en un anticuerpo de referencia.

- 35 La Figura 3a-3c proporciona un esquema que muestra una sustitución de un FR3-CDR3-FR4 en un anticuerpo de referencia.

La Figura 4a-4c proporciona un esquema que muestra una sustitución de una región CDR3-FR4 de un anticuerpo de referencia.

- 40 La Figura 5 proporciona un esquema que muestra una sustitución del casete de intercambio de un casete CDR2-FR3 en un anticuerpo de referencia, en la que la CDR2 del anticuerpo de referencia retiene el determinante de especificidad esencial mínima de unión.

La Figura 6a-6c proporciona un esquema que muestra una construcción de casete de intercambio iterativo.

La Figura 7a-7c proporciona un esquema que muestra una reconstrucción de casete.

Descripción detallada de la invención

45 **Definiciones**

Según se usa en la presente memoria, “anticuerpo” se refiere a una proteína funcionalmente definida como una proteína de unión y estructuralmente definida por comprender una secuencia de aminoácidos que un experto en la técnica reconoce que se deriva de la región marco de un gen codificante de inmunoglobulina de un animal que produce anticuerpos. Un anticuerpo puede consistir en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como miles de genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, las cuales, a su vez, definen las clases de inmunoglobulina, IgG,

IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente.

Es sabido que una unidad estructural típica de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kD) y una “pesada” (de aproximadamente 50-70 kD). El terminal N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos fundamentalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Las expresiones cadena variable ligera (V_L) y cadena variable pesada (V_H) se refieren, respectivamente, a estas cadenas ligera y pesada.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo bajo los enlaces disulfuro de la región bisagra, produciendo $F(ab')_2$, un dímero de Fab que es él mismo una cadena ligera unida al V_H -CH1 por un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ puede reducirse en condiciones moderadas para romper el enlace disulfuro de la región bisagra, convirtiendo con ello el dímero $F(ab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo, véase *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed., Raven Press, Nueva York (1993)). Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la técnica apreciará que los fragmentos pueden ser sintetizados *de novo* ya sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Así, el término anticuerpo, según se lo usa en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpo, ya sean productos por la modificación de los anticuerpos enteros o sintetizados usando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos preferidos incluyen los dímeros V_H - V_L , incluyendo anticuerpos monocatenarios (anticuerpos que existen como una cadena individual de polipéptidos), como anticuerpos Fv monocatenarios (sFv o scFv) en los que se unen entre sí las regiones variables pesada y ligera (directamente o a través de un conector de péptidos) formando un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv monocatenario es un heterodímero V_H - V_L unido covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluya secuencias codificantes de V_H y V_L ya sea unidas directamente o unidas por un conector codificante de péptidos (por ejemplo, Huston, *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, 1988). Aunque el V_H y el V_L están conectados entre sí como una sola cadena polipeptídica, los dominios V_H y V_L se asocian de forma no covalente. Alternativamente, el anticuerpo puede ser otro fragmento. También pueden generarse otros fragmentos, incluyendo el uso de técnicas recombinantes. Por ejemplo, pueden manifestarse moléculas Fab en un fago si una de las cadenas (pesada o ligera) se fusiona a una proteína capsídica g3 y la cadena complementaria se exporta al periplasma como una molécula soluble. Las dos cadenas pueden estar codificadas en el mismo replicón o en replicones diferentes; las dos cadenas del anticuerpo en cada molécula Fab se ensamblan después de la traducción y el dímero es incorporado en la partícula del fago mediante enlace de una de las cadenas a la g3p (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n° 5733743). Los expertos en la técnica conocen (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n°s 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778) los anticuerpos scFv y varias estructuras adicionales que convierten las cadenas polipeptídicas ligera y pesada —agregadas de forma natural, pero químicamente separadas— de una región V de anticuerpo en una molécula que se pliega forman una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Anticuerpos particularmente preferidos incluyen todos aquellos que se hayan manifestado en un fago o hayan sido generados por tecnología recombinante usando vectores en los que las cadenas son secretadas como proteínas solubles; por ejemplo, scFv, Fv, Fab, $(Fab')_2$. Los anticuerpos también pueden incluir dianticuerpos y minianticuerpos.

Los anticuerpos también pueden incluir dímeros de cadena pesada, como los anticuerpos provenientes de camélidos. Dado que la región V_H de una IgG dimerica de cadena pesada en un camélido no tiene que realizar interacciones hidrófobas con una cadena ligera, la región de la cadena pesada que normalmente entra en contacto con una cadena ligera cambia a residuos de aminoácidos hidrófilos en un camélido. Los dominios V_H de las IgG dimericas de cadena pesada se denominan dominios VHH.

En los camélidos, la diversidad del repertorio de anticuerpos se determina por las regiones determinantes complementarias (CDR) 1, 2 y 3 en las regiones V_H o VHH. La CDR3 en la región VHH del camello se caracteriza por su longitud relativamente grande de 16 aminoácidos de promedio (Muyldermans *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7 (9): 1129). Esto contrasta con las regiones CDR3 de anticuerpos de muchas otras especies. Por ejemplo, la CDR3 del V_H murino tiene 9 aminoácidos de promedio.

Pueden crearse bibliotecas de regiones variables de anticuerpos derivados de camélidos que mantienen diversidad *in vivo* de las regiones variables de un camélido, por ejemplo, mediante los métodos dados a conocer en la solicitud de patente estadounidense con n° de serie 20050037421, publicada el 17 de febrero de 2005.

“Región V” se refiere a un dominio de región variable de anticuerpo que comprende los segmentos de Marco 1, CDR1, Marco 2, CDR2, y Marco 3, incluyendo CDR3 y Marco 4, segmentos que son añadidos al segmento V como consecuencia del reordenamiento de los genes de la región V de cadena pesada y cadena ligera durante la diferenciación de los linfocitos B.

“Región variable complementaria” se refiere a una región que puede dimerizarse con una región V para producir un fragmento funcional de unión que se une específicamente a un antígeno de interés. Una región variable complementaria es normalmente una región V_L , siendo la región variable una región V_H ; o es una región V_H , siendo la región variable una región V_L . La región variable complementaria comprende a menudo una CDR3 proveniente de un

anticuerpo de referencia que se une al antígeno de interés.

El término "segmento V" se refiere a la región de la región V (cadena pesada o ligera) que está codificada por un gen V. "Segmento D" se refiere a la región de una región V (en este caso, una CDR3 en la región V) que está codificada por un gen D. De manera similar, "segmento J" se refiere a una región codificada por un gen J. Estos términos incluyen modificaciones, adiciones, deleciones y mutaciones somáticas diversas, que pueden producirse durante la maduración.

"Casete de intercambio", según se usa en la presente memoria, se refiere normalmente a al menos una CDR intacta adjunta a al menos una región marco intacta que se dan juntas de forma natural. Un "casete de intercambio" puede ser aislado de una biblioteca sintética en la que una o más de las CDR han mutado. En este caso, la CDR anterior a la mutagénesis y la región marco se dan de forma natural conjuntamente.

"Casete extendido", según se usa en la presente memoria, se refiere a un casete de intercambio que comprende una región marco adicional. Así, aquí un "casete extendido" es un casete de intercambio que tiene al menos una CDR y al menos dos regiones marco que se dan de forma natural conjuntamente. Un "casete extendido" también puede ser aislado de una biblioteca sintética en la que una o más de las CDR han mutado. En este caso, la CDR anterior a la mutagénesis y la región marco se dan de forma natural conjuntamente.

"Darse de forma natural", según se usa en el contexto de casetes de intercambio y extendidos significa que los componentes están codificados por un único gen que no fue alterado por medios recombinantes y que preexiste en una biblioteca de anticuerpos que fue creada a partir de células no modificadas o de células que fueron expuestas a un antígeno.

Un casete de intercambio "correspondiente" se refiere a una CDR y a una región marco que están codificadas por un gen de anticuerpo o un segmento de gen diferente (con respecto a un anticuerpo que ha de ser objeto de intercambio), pero que es, en términos de la estructura general del anticuerpo, la misma CDR y la misma región marco del anticuerpo. Por ejemplo, un casete CDR1-FR1 de intercambio es sustituido por un casete CDR1-FR1 "correspondiente" que está codificado por un gen de anticuerpo diferente con respecto al CDR1-FR1 de referencia.

"Región V híbrida" se refiere a una región V en la que al menos un casete de intercambio ha sido sustituido por un correspondiente casete de intercambio procedente de un gen de anticuerpo o segmento de gen diferente.

"Antígeno" se refiere a sustancias que son capaces, en condiciones apropiadas, de inducir una respuesta inmunitaria específica y de reaccionar con los productos de esa respuesta; es decir, con anticuerpos específicos o con linfocitos T específicamente sensibilizados, o con ambos. Los antígenos pueden ser sustancias solubles, como las toxinas y las proteínas extrañas, o particuladas, como las bacterias y las células de tejidos; sin embargo, únicamente la porción de la molécula proteínica o de polisacáridos denominada determinante antigénico (epítomos) se combina con el anticuerpo o con un receptor específico en un linfocito. De forma más general, el término "antígeno" puede ser usado para referirse a cualquier sustancia a la que se une un anticuerpo, o para la cual se deseen anticuerpos, con independencia de si la sustancia es inmunogénica. Para tales antígenos, los anticuerpos pueden ser identificados por métodos recombinantes, con independencia de cualquier respuesta inmunitaria.

La "especificidad de unión" de un anticuerpo se refiere a la identidad del antígeno al que se une el anticuerpo, preferiblemente a la identidad del epítomo al que se une el anticuerpo.

"Polinucleótido quimérico" significa que el polinucleótido comprende regiones que tienen la forma natural y regiones que están mutadas. También puede significar que el polinucleótido comprende regiones que tienen la forma natural procedentes de un polinucleótido y regiones que tienen la forma natural procedentes de otro polinucleótido relacionado.

"Región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere al término conocido en la técnica ejemplificado por Kabat y Chothia. Generalmente también es sabido que las CDR son regiones hipervariables o bucles hipervariables (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901; Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877; E. A. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) (1987); y Tramontano et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 175). "Región marco" o "FR" se refiere a la región del dominio V que flanquea las CDR. Las posiciones de las CDR y de las regiones marco pueden determinarse usando diversas definiciones muy conocidas en la técnica; por ejemplo, de Kabat, Chothia, la base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) y AbM (véanse, por ejemplo, Johnson et al., *supra*; Chothia y Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917; Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883; Chothia C. et al., 1992, Structural repertoire of the human VH segments *J. Mol. Biol.* 227, 799-817; Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 1997, 273(4)). Las definiciones de sitios de combinación de antígenos también se describen en los siguientes: Ruiz et al., IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.*, 28, 219-221 (2000); y Lefranc, M.-P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 1 de enero, 29(1):207-9 (2001); MacCallum et al, Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, *J. Mol. Biol.*, 262 (5), 732-745 (1996); y Martin et al, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272 (1989); Martin, et al, *Methods Enzymol.*, 203, 121-153, (1991); Pedersen et al, *Immunomethods*, 1, 126, (1992); y Rees et al, en Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172 1996).

“Epítipo” se refiere a la porción de un antígeno o de otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión que interactúa con el receptáculo de unión de la región variable de un anticuerpo. Normalmente, tal interacción de unión se manifiesta como un contacto intermolecular con uno o más residuos de aminoácidos de una CDR. A menudo, la unión implica una CDR3 o un par de CDR3.

“Vector de expresión” incluye vectores que son capaces de expresar secuencias de ácido nucleico contenidas en los mismos; es decir, cualquier secuencia de ácido nucleico que sea capaz de efectuar la expresión de un código de ácido nucleico especificado dispuesto en la misma (las secuencias codificantes están operativamente ligadas a otras secuencias capaces de efectuar su expresión). Algunos vectores de expresión son duplicables en el organismo anfitrión, ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Un elemento útil, pero necesario, de un vector de expresión efectivo es una secuencia codificante marcadora; es decir, una secuencia que codifica una proteína que da como resultado una propiedad fenotípica (por ejemplo, resistencia a la tetraciclina) de las células que contienen la proteína que permite que esas células sean fácilmente identificadas. Los vectores de expresión tienen frecuentemente forma de plásmidos o virus. Sin embargo, se prevé que la invención incluya otras formas tales de vectores de expresión que tengan funciones equivalentes y que puedan, de tanto en tanto, llegar a ser conocidas en la técnica.

“Homólogos” significa polipéptidos que tienen residuos iguales o conservados en una correspondiente posición en su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término también se extiende a dos o más secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos homólogos. Los isotipos de inmunoglobulina son péptidos homólogos ejemplares.

“Célula anfitriona” se refiere a una célula procariota o eucariota en la que pueden introducirse, expresarse y/o propagarse vectores de la invención. Una célula anfitriona microbiana es una célula de un microorganismo procariota o eucariota, incluyendo bacterias, levaduras, hongos microscópicos y fases microscópicas en el ciclo vital de los hongos y mohos del limo. Células anfitrionas procariotas típicas incluyen diversas cepas de *E. coli*. Células anfitrionas eucariotas típicas son la levadura u hongos filamentosos, o células de mamífero, como las células de ovario de hámster chino, fibroblastos NIH 3T3 murinos, células 193 de riñón embrionario humano, o células de mieloma o hibridoma de roedor.

“Aislado” se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido separado no solo de otros ácidos nucleicos o polipéptidos que estén presentes en la fuente natural del ácido nucleico o el polipéptido, sino también de polipéptidos, y preferiblemente se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido hallado (de estarlo) en presencia únicamente de un disolvente, un tampón, un ion u otro componente normalmente presente en una solución de los mismos. Los términos “aislado” y “purificado” no abarcan ácidos nucleicos o polipéptidos presentes en su fuente natural.

“Purificado” significa que el ácido nucleico o el polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas; por ejemplo, polinucleótidos, proteínas y similares. En una realización, el polinucleótido o polipéptido es purificado de modo que constituya al menos el 95% en peso, más preferiblemente al menos el 99,8% en peso, de las macromoléculas biológicas indicadas presentes (pero puede haber presentes agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tengan un peso molecular inferior a 1000 daltones).

“Ácido nucleico recombinante” se refiere a un ácido nucleico en una forma normalmente no hallada en la naturaleza. Es decir, un ácido nucleico recombinante está flanqueado por una secuencia de nucleótidos que no flanquea de forma natural el ácido nucleico o tiene una secuencia que no se halla normalmente en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes pueden formarse en origen *in vitro* a través de la manipulación de ácidos nucleicos mediante endonucleasas de restricción o, alternativamente, usando técnicas tales como la reacción en cadena de la polimerasa. Se entiende que, una vez que se crea y reintroduce un ácido nucleico recombinante en un organismo o célula anfitrión, se duplicará de forma no recombinante; es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula anfitriona, no manipulaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque posteriormente se dupliquen de forma no recombinante, siguen siendo considerados recombinantes para los fines de la invención.

“Polipéptido recombinante” se refiere a un polipéptido expresado a partir de un ácido nucleico recombinante, o a un polipéptido que es sintetizado químicamente *in vitro*.

“Variante recombinante” se refiere a cualquier polipéptido que difiera de los polipéptidos que se dan de forma natural por inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos, creado usando técnicas de ADN recombinante. Se puede encontrar orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, añadidos o deleccionados sin abolir actividades de interés, como las actividades enzimáticas o de unión, comparando la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología.

Preferiblemente, las “sustituciones” de aminoácidos son el resultado de sustituir un aminoácido con otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares; es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en función de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o a la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los

aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

- 5 Las “inserciones” o las “deleciones” están normalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente realizando sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en una molécula polipeptídica usando técnicas de ADN recombinante y examinando las variantes recombinantes resultantes para encontrar su actividad.

- 10 Alternativamente, cuando se desea la alteración de la función, pueden diseñarse deleciones o alteraciones no conservadoras para producir polipéptidos alterados. Tal alteraciones pueden alterar, por ejemplo, una o más de las funciones biológicas o de las características bioquímicas de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, tales alteraciones pueden cambiar características del polipéptido tales como afinidades de unión a ligandos, afinidades entre cadenas o tasa de degradación/rotación. Además, tales alteraciones pueden ser seleccionadas para generar polipéptidos que sean más aptos para la expresión, el aumento de escala y similares en las células anfitrionas elegidas para la expresión. Por ejemplo, pueden deleccionarse residuos de cisteína o sustituirse con otro residuo de
- 15 aminoácido para eliminar los puentes de disulfuro.

- 20 Alternativamente, variantes recombinantes que codifican estos mismos polipéptidos o similares pueden ser sintetizadas o seleccionadas haciendo uso de la “redundancia” del código genético. Pueden introducirse diversas sustituciones de codones, como los cambios silentes que producen diversos sitios de restricción, para optimizar la clonación en un vector plasmídico o viral en un sistema procariota o eucariota particular. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótidos pueden reflejarse en el polipéptido o en dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar características tales como afinidades de unión a ligandos, afinidades entre cadenas o tasa de degradación/rotación.

- 25 “Repertorio” o “biblioteca” se refiere a una biblioteca de genes que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos como Fab, scFv, Fd, LC, V_H o V_L, o un subfragmento de una región variable, por ejemplo, un casete de intercambio que se obtiene de un conjunto o “repertorio” natural de genes de anticuerpos presentes, por ejemplo, en donantes humanos, y obtenida, fundamentalmente, de las células de la sangre periférica y el bazo. En algunas realizaciones, los donantes humanos son “no inmunes”; es decir, no presentan síntomas de infección. En la presente invención, una biblioteca o repertorio a menudo comprende miembros que son un casete de intercambio de una porción dada de una región V.

- 30 “Biblioteca de anticuerpos sintéticos” se refiere a una biblioteca de genes que codifican uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos como as Fab, scFv, Fd, LC, V_H o V_L, o un subfragmento de una región variable, por ejemplo, un casete de intercambio en el cual una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) han sido alteradas parcial o completamente; por ejemplo, por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.

- 35 “Aleatorizado” significa que parte o la totalidad de la secuencia que codifica la CDR ha sido sustituida por una secuencia que codifica aleatoriamente los veinte aminoácidos o algún subconjunto de los aminoácidos.

“Diana” puede usarse para referirse a la molécula a la que se une un anticuerpo de referencia, siendo el “anticuerpo de referencia” un anticuerpo para el cual el profesional quiere obtener una variante con características “mejoradas”. Así, “diana” puede usarse en la presente memoria como sinónimo de “antígeno”.

- 40 “Vector” se refiere a un plásmido o fago o virus o vector para expresar un polipéptido a partir de una secuencia de ADN (ARN). EL vector puede comprender una unidad de transcripción que comprende un conjunto de (1) uno o más elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica —por ejemplo, promotores o potenciadores—, (2) una secuencia estructural o codificante que es transcrita al ARNm y traducida formando una proteína, y (3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de la traducción. Las unidades estructurales para su uso en sistemas de expresión en levaduras o procariotas pueden incluir una secuencia guía que permita la secreción
- 45 extracelular de la proteína traducida por parte de una célula anfitriona.

Introducción

La presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos modificados genéticamente con la especificidad de un anticuerpo de referencia mediante la sustitución de porciones de las secuencias V_H y V_L del anticuerpo de referencia con secuencias procedentes de repertorios de anticuerpos humanos.

- 50 El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo humano de afinidad subóptima, en cuyo caso pueden usarse los métodos de la invención para aumentar la afinidad o para reducir adicionalmente el potencial de inmunogenicidad. Alternativamente, el anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo no humano —por ejemplo, un anticuerpo murino—, y los métodos de la invención se usan para producir un anticuerpo humano o humanizado con la especificidad del anticuerpo no humano. Los anticuerpos producidos usando los métodos de la presente invención son aislados rápidamente a partir de bibliotecas de secuencias de anticuerpos, retienen la afinidad del anticuerpo de referencia y tienen un grado elevado de homología con las regiones V de anticuerpos humanos. A menudo, un anticuerpo producido usando los métodos de la invención retiene una CDR3, o el MEBSD de una CDR3, procedente
- 55

del anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones el anticuerpo puede comprender un par de CDR3 (es decir, la CDR3 V_H y la CDR3 V_L), procedentes del anticuerpo de referencia.

Bibliotecas de casetes génicos V

Se puede considerar que el segmento génico V tanto de la cadena pesada como de la ligera comprende varios casetes formados por segmentos de marco y CDR. Así, cada uno de los segmentos génicos V_H y V_L comprende 5 “casetes mínimos” (CDR1, CDR2, FR1, FR2 y FR3). En la presente invención, se considera que las regiones V están compuestas de “casetes de intercambio” que comprenden dos o más casetes mínimos, incluyendo el casete de intercambio al menos una CDR y al menos una FR unidas en el orden natural. Así, por ejemplo, un casete de intercambio relativo a CDR1 puede consistir en FR1-CDR1 o FR1-CDR1-FR2. Hay nueve casetes de intercambio tales en cada segmento génico V, consistentes en al menos un marco y una CDR (y menos de tres marcos) en el orden apropiado.

La región V completa incluye dos casetes mínimos adicionales, CDR3 y FR4, que se forman por reordenación somática y mutagénesis de segmentos génicos de línea germinal diferenciados adicionales (el segmento D en V_H y un segmento J tanto en V_H como en V_L). Los casetes de intercambio relativos a CDR3 incluyen CDR3-FR4 o FR3-CDR3-FR4. Por ende, la región V completa tiene un total de veinte casetes de intercambio de uno a tres marcos y una a tres CDR.

En algunas realizaciones, se emplean casetes extendidos en los métodos de sustitución de la invención. Estos casetes extendidos tienen al menos una CDR y dos marcos que pueden darse conjuntamente de forma natural; es decir, que están codificados por el mismo gen. Los casetes extendidos incluyen FR1-CDR1-FR2, FR2-CDR2-FR3 y, en las realizaciones que implican un intercambio de secuencias de CDR3, FR3-CDR3-FR4.

Pueden construirse repertorios de regiones V novedosas de anticuerpos mediante técnicas de ADN recombinante que comprenden varias secuencias que codifican uno o más casetes de intercambio y uno o más segmentos clonados procedentes de un anticuerpo de referencia. Tales repertorios codifican regiones V híbridas que no existen de forma natural y que contienen secuencias recombinadas procedentes de diferentes genes V.

Los métodos que comprenden la sustitución de un casete de intercambio de una región variable con un correspondiente casete de intercambio procedente de un anticuerpo que está codificado por un gen diferente pueden llevar a cabo de forma secuencial o concurrente. Así, puede seleccionarse un anticuerpo de referencia en el que un casete de intercambio ha sido sustituido por una correspondiente biblioteca de secuencias procedentes de otros genes de anticuerpos por su unión a un antígeno al mismo tiempo que se sustituye un casete diferente de intercambio por una biblioteca separada de secuencias correspondientes de casetes de intercambio y se lo selecciona por su unión con el antígeno. Alternativamente, puede llevarse a cabo una etapa de selección después de la otra.

Se generan bibliotecas usando casetes clonados de secuencias de anticuerpos de referencia y repertorios de secuencias derivadas de inmunoglobulina humana. Los repertorios humanos pueden ser generados mediante amplificación por PCR usando cebadores apropiados para los segmentos deseados a partir de ADNc obtenido de la sangre periférica o el bazo, en cuyo caso se espera que los repertorios contengan clones con mutaciones somáticas. Alternativamente, los repertorios pueden obtenerse por amplificación del ADN genómico procedente de células de sistemas no inmunitarios para obtener secuencias codificadas de línea germinal no mutadas.

Las bibliotecas de casetes pueden ser expresadas en diversos vectores de expresión y manifestadas en la superficie de virus, células o esporas. Ejemplos de sistemas de visualización incluyen levaduras, bacterias o fagos. En este caso, se seleccionan células anfitrionas o fagos en el antígeno diana para aislar clones que expresan anticuerpos de unión al antígeno.

Alternativamente, las bibliotecas de casetes pueden ser expresadas como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos solubles y secretadas de células anfitrionas. Por ejemplo, las bibliotecas pueden ser expresadas mediante la secreción de *E. coli* o levadura y las colonias de células que expresan ligantes de antígenos son reveladas mediante un ensayo de unión de transferencia de colonias. Puede usarse cualquier célula anfitriona adecuada. Tales células incluyen células tanto procariotas como eucariotas; por ejemplo, bacterias, levadura o células de mamíferos.

Modificación genética de anticuerpos usando bibliotecas de casetes

En un aspecto, la invención proporciona métodos de modificación genética de anticuerpos —por ejemplo, de humanización de un anticuerpo— que implican la sustitución de porciones de la región variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de referencia con la correspondiente secuencia procedente de un repertorio de secuencias de regiones variables. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede generarse:

Construyendo un repertorio de segmentos génicos V de anticuerpos (Repertorio A). El repertorio A es una biblioteca de secuencias de anticuerpos humanos en la que cada miembro de la biblioteca está fusionado a una secuencia que codifica un casete de intercambio procedente de un anticuerpo de referencia en la posición apropiada, de modo que se genere un segmento génico V completo.

Fusionando los segmentos génicos V de anticuerpos del repertorio A con secuencias CDR3 procedentes de

un anticuerpo de referencia y secuencias que codifican una FR4 e insertándolos en un vector de expresión, de modo que pueda generarse un repertorio de regiones V funcionales (Repertorio B).

5 Emparejando el repertorio B con una región V complementaria clonada o con un repertorio de regiones V complementarias para formar un repertorio C que comprende dímeros V_H-V_L funcionales capaces de unirse a un antígeno.

10 Expresando el repertorio C en una célula anfitriona, de modo que se secreten dímeros V_H-V_L de la célula anfitriona o se manifiesten como proteínas de fusión en la superficie de la célula.

Poniendo en contacto los dímeros V_H-V_L del repertorio C con el antígeno y aislando los clones que expresen los dímeros V_H-V_L que se unen con el antígeno.

15 Identificando una región V de un anticuerpo humanizado o un repertorio de regiones V capaces de unirse al antígeno de la etapa 5, de modo que cada uno de los marcos y una o más CDR se deriven de un repertorio humano (Repertorio D).

20 El proceso puede repetirse de modo que casetes alternativos procedentes del anticuerpo de referencia sean sustituidos con secuencias humanas. El proceso también se puede llevar a cabo de manera iterativa, de modo que los casetes de intercambio sean sustituidos en serie, de manera que la totalidad o una gran proporción del segmento génico V del anticuerpo de referencia sea sustituida por secuencias humanas.

En una realización, el repertorio A consiste en secuencias génicas V_H híbridas que contienen un casete funcional procedente de un anticuerpo de referencia y varias secuencias humanas para generar el dominio V_H completo. En este caso, la región V complementaria es una región V_L .

25 En una realización alternativa, el repertorio A consiste en secuencias V_L híbridas y el dominio V complementario es un dominio V_H .

30 Los dímeros V_H-V_L pueden consistir en fragmentos Fv funcionales o pueden consistir en fragmentos más largos de anticuerpos como as Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv o inmunoglobulinas enteras. Los dímeros V_H-V_L también pueden expresarse como proteínas de fusión, por ejemplo en la superficie de un bacteriófago filamentoso. Preferiblemente, los dímeros V_H-V_L son expresados y secretados a partir de una célula anfitriona y se unen al antígeno en forma soluble. Por ejemplo, las moléculas Fab o Fab' pueden ser expresadas y secretadas a partir de una célula anfitriona, tal como *E. coli* o una levadura.

35 El segmento génico V híbrido consiste en un casete de intercambio procedente de un anticuerpo de referencia y secuencias humanas adicionales proporcionadas provenientes de un repertorio de secuencias humanas para completar el segmento génico V. Preferiblemente, el anticuerpo de referencia es un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de roedor, pero el propio anticuerpo de referencia también puede ser un anticuerpo humano. El casete de intercambio tiene al menos un marco y una CDR unidos en un orden natural y no tiene más de dos marcos y dos CDR. Ejemplos de casetes de intercambio que se usan a menudo incluyen:

FR1-CDR1

40 FR1-CDR1-FR2

FR2-CDR2-FR3

45 CDR2-FR3 o

FR3-CDR3.

50 En algunas realizaciones, una CDR en un casete de intercambio es una CDR híbrida. Una "CDR híbrida", en el contexto de esta invención, se refiere a una CDR que comprende un MEBSD procedente de un anticuerpo de referencia y una secuencia adicional en la CDR que es diferente de la secuencia de la CDR del anticuerpo de referencia. La posición de la secuencia de MEBSD puede determinarse empíricamente mediante uno o más métodos que incluyen, sin limitación, el barrido de alanina, la cristalografía de rayos X, la mutagénesis puntual aleatoria, etc., que se describen con mayor detalle posteriormente. La subsecuencia de MEBSD puede estar en cualquier posición dentro de la CDR y normalmente comprende de uno a varios aminoácidos. Puede construirse un casete de CDR usando cualquiera de las seis CDR contenidas en V_H y V_L .

55 Para crear una biblioteca de repertorios que contenga MEBSD de CDR, se diseña un cebador con nucleótidos que, a la vez, codifican el MEBSD y se hibridan con las secuencias de línea germinal provenientes de una región diferentes de la CDR, de modo que alguna porción del casete final de CDR incluya una diversidad de secuencias representada en el repertorio de Ig humana. En el repertorio creado se incluyen una o ambas regiones marco que se unen de manera natural a la CDR del casete. El repertorio del casete CDR-FR se combina a continuación con las secuencias

complementarias necesarias para crear una región V completa. Las secuencias complementarias pueden derivar de la secuencia del anticuerpo de referencia o de otros casetes de intercambio que se sepa que soportan la unión al antígeno. El casete CDR-FR se inserta en un vector de expresión junto con la cadena complementaria V_H o V_L .

Combinación de segmentos génicos V híbridos con secuencias CDR3

- 5 Cada segmento génico V híbrido se combina normalmente con secuencias CDR3 procedentes de la correspondiente cadena de un anticuerpo de referencia y un segmento FR4 adecuado para permitir el ensamblaje de dominios V completos. La FR4 puede provenir del anticuerpo de referencia, o puede provenir de un gen de segmento J humano clonado, o de un repertorio de secuencias de FR4. Alternativamente, puede proporcionarse un MEBSD de una CDR3 proveniente del anticuerpo de referencia y puede usarse un segmento J humano completo para proporcionar parte de la CDR3, además de la FR4.

El MEBSD es la región dentro de una secuencia CDR3 o de un par de CDR3 requerida para retener la especificidad de unión del anticuerpo de referencia cuando se combina con secuencias humanas que reconstituyen el resto de la CDR3 y el resto de la región V. El MEBSD puede definirse empíricamente o puede ser objeto de predicción a partir de consideraciones estructurales.

- 15 Para la determinación empírica, se pueden llevar a cabo métodos como la mutagénesis por barrido de alanina en la región CDR3 de un anticuerpo de referencia (Wells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 1-6, 1996) para identificar residuos que desempeñan un papel en la unión al antígeno. Análisis adicionales pueden incluir la mutagénesis de barrido exhaustivo, en la que cada residuo de CDR3 es sustituido, uno por uno, con cada uno de los 19 aminoácidos alternativos, en lugar de una simple sustitución con alanina. Pueden usarse ensayos de unión —por ejemplo, de transferencia de colonias— para seleccionar bibliotecas de dichos mutantes para determinar los mutantes que retienen la especificidad de unión. Se pueden secuenciar las colonias que secretan fragmentos de anticuerpos con señales de ensayo reducidas al menos diez veces con respecto al anticuerpo de referencia y las secuencias de ADN ser usadas para generar una base de datos de posiciones de aminoácidos en la CDR3 que son importantes para la retención de la unión. El MEBSD puede definirse, entonces, como el conjunto de residuos que no toleran la sustitución de un solo sitio, o que toleran únicamente una sustitución conservadora de aminoácidos.

El MEBSD también puede deducirse de consideraciones estructurales. Por ejemplo, si se conoce la estructura cristalina vista por rayos X, o si hay disponible un modelo de la interacción del anticuerpo y el antígeno, el MEBSD puede definirse a partir de los aminoácidos requeridos para formar un contacto adecuado con el epítipo y retener la estructura de la superficie de unión con el antígeno.

- 30 Alternativamente, se puede predecir el MEBSD a partir de la estructura primaria de la CDR3. En dominios V_H , por ejemplo, el MEBSD puede corresponder, en algunos anticuerpos, a un segmento D (incluyendo delecciones o adiciones N identificables cualesquiera resultantes de la reordenación y la maduración del anticuerpo de referencia). En este caso, el segmento J puede ser sustituido por un segmento J humano clonado o por un repertorio de segmentos J. La especificidad de unión del dominio V_H de referencia modificado con el segmento J sustituido puede ser determinada en combinación con una cadena ligera complementaria adecuada. La cadena complementaria puede ser la cadena ligera del anticuerpo de referencia o puede ser una cadena ligera humana que contenga la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo de referencia. La especificidad de unión puede determinarse mediante un ensayo de unión de transferencia de colonias o por otra metodología conocida de ensayo. Si las colonias que secretan anticuerpos que se unen al antígeno no son identificadas por este planteamiento, pueden sustituirse las secuencias del segmento J por las correspondientes secuencias adicionales procedentes de la CDR3 del anticuerpo de referencia, y estos mutantes adicionales ser seleccionados con la cadena ligera complementaria hasta que se identifique un MEBSD.

- Los MEBSD pueden ser identificados de forma similar en una CDR3 de la cadena ligera, en cuyo caso la cadena complementaria usada en el ensayo de selección comprende un dominio V_H . En este caso, el dominio V_H puede derivarse del anticuerpo de referencia o puede ser un dominio V_H humano con la CDR3 procedente del anticuerpo de referencia. Dado que no hay ningún segmento D en la cadena ligera, se puede deducir el MEBSD por mutagénesis de barrido o por inspección de la secuencia de la CDR3 y sustitución de las secuencias en la CDR3 codificadas por el segmento génico V, o de las secuencias codificadas por el segmento J. La detección de la unión al antígeno, por ejemplo, mediante un ensayo de unión de transferencia de colonias puede ser usada para definir qué segmento de la CDR3 constituye el MEBSD.

- 50 Además, pueden usarse programas de soporte lógico como JOINSOLVER™ (Souto-Carneiro, et al., *J. Immunol.* 172:6790-6802, 2004) para analizar la CDR3 del gen de la inmunoglobulina para buscar secuencias D de línea germinal. La estrategia de JOINSOLVER™ es buscar secuencias D de línea germinal que flanqueen genes V_H y J_H de línea germinal. Además, busca adiciones de tipos P y N en las uniones V_HD y DJ_H . La base de datos de genes D humanos de línea germinal empleada incluye todos los segmentos D del banco de datos de IMGT, así como los genes de línea germinal inversos y DIR.

Así, por ejemplo, un dominio V_H híbrido de la invención puede comprender un casete de intercambio procedente de un anticuerpo de referencia, tal como un anticuerpo murino, secuencias génicas V restantes procedentes de un repertorio humano, un segmento D procedente del anticuerpo de referencia y un segmento JH humano. En un segundo

ejemplo, el dominio V_H o V híbrido puede comprender un casete de intercambio procedente de un anticuerpo de referencia de roedor, secuencias génicas V restantes procedentes de un repertorio humano, una región CDR3 procedente del anticuerpo de referencia y un segmento FR-4 humano.

5 En otra realización, el segmento génico V híbrido puede comprender por entero casetes humanos de intercambio procedentes de dos o más genes V_H o V_L humanos diferentes. Así, por ejemplo, se puede obtener un casete de intercambio de un gen V_H humano y se lo puede fusionar con un segundo casete de intercambio procedente de un gen V_H humano diferente de subclase igual o diferente. A menudo, ambos casetes funcionales son de línea germinal en secuencia o tienen secuencias cercanas a la línea germinal.

10 La sustitución en serie para identificar casetes funcionales de genes V humanos compatibles con la unión al antígeno permite la rápida sustitución del segmento génico V de un anticuerpo de referencia con secuencias completamente humanas. La capacidad de recombinar casetes de intercambio procedentes de dos o más genes diferentes de anticuerpos aumenta la diversidad potencial de las secuencias generadas a partir de las bibliotecas de genes V humanos. Con este planteamiento, es posible recombinar dos o más casetes de línea germinal para generar una diversidad de secuencias adicionales no hallada en la línea germinal, pero sin introducir mutaciones puntuales
15 potencialmente inmunogénicas.

Combinación de casetes de intercambio seleccionados

En algunas realizaciones, la selección en busca de anticuerpos que comprendan casetes intercambiados incluye etapas en las que la misma región marco está incluida en el casete de intercambio para más de una etapa de selección; por ejemplo, se lleva a cabo una etapa de sustitución de un FR1-CDR1-FR2 procedente de un anticuerpo de referencia
20 y también se lleva a cabo una etapa de sustitución del FR2-CDR2-FR3 procedente del anticuerpo de referencia. En estos casos, los anticuerpos seleccionados son identificados y, a continuación, la o las regiones marco superpuestas (en este ejemplo, la FR2) son combinadas para crear el nuevo anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de referencia. La etapa de combinación de la región marco superpuesta (es decir, FR2 en este ejemplo) puede comprender la combinación de las dos regiones marco seleccionadas independientemente en una región de
25 gran homología, o la selección de una u otra de las regiones marco para su incorporación. La combinación de las regiones marco es descrita con mayor detalle en la sección “Anticuerpos modificados genéticamente”. Normalmente, cuando se combinan las dos regiones marco, son marcos de la misma subclase. En consecuencia, tienen un grado elevado de homología (es decir, una identidad típicamente mayor del 80%).

La combinación de casetes de intercambio puede llevarse a cabo mediante recombinación entre regiones homólogas
30 o por fusión de casetes adyacentes en el orden natural. Se puede permitir que la recombinación se produzca por procesos naturales de recombinación en una célula anfitriona o se puede llevar a cabo mediante técnicas biológicas moleculares *in vitro*. Por ejemplo, dos secuencias homólogas procedentes de casetes complementarios pueden ser digeridas con enzimas de restricción y ligadas entre sí. Alternativamente, las secuencias recombinadas deseadas pueden ser diseñadas y generadas usando ADN sintético o ser ensambladas usando oligonucleótidos sintéticos
35 usando técnicas estándar muy conocidas en la técnica. La fusión de casetes de intercambio adyacentes se logra mediante técnicas estándar de ADN recombinante; por ejemplo, usando PCR.

Generación de regiones V por sustitución de casetes que contienen CDR3

Según se ha indicado anteriormente, la región V completa tiene dos casetes mínimos adicionales (CDR3 y FR4) no presentes en el segmento génico V . Estos casetes adicionales procedentes del anticuerpo de referencia también
40 pueden ser sustituidos por secuencias provenientes de una biblioteca de secuencias de anticuerpos humanos, de modo que se genere una región V a partir de secuencias humanas por entero a la vez que se retiene la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo de referencia.

En este caso, el segmento génico V es humanizado en primer lugar mediante sustitución en serie de casetes funcionales según se ha descrito anteriormente. El segmento génico V humanizado es usado a continuación para
45 guiar la selección de un repertorio de secuencias que comprende secuencias CDR3 y FR4 humanas. Se genera un anticuerpo humanizado o plenamente humano con al menos una CDR3 que contiene secuencias humanas:

Obteniendo secuencias génicas V del repertorio D anterior y combinándolas con secuencias CDR3 y secuencias FR4 procedentes de una biblioteca de secuencias CDR3-FR4 para formar el repertorio E.

50 Expresar el repertorio E en una célula anfitriona y coexpresar una o varias cadenas complementarias de modo que se genere un repertorio de dímeros V_H - V_L .

Poner en contacto los dímeros V_H - V_L con el antígeno y aislar los dímeros V_H - V_L que se unen al antígeno.

Las secuencias génicas V procedentes del repertorio D pueden ser secuencias V_H , en cuyo caso la cadena complementaria es una cadena V_L . Alternativamente, las secuencias génicas V del repertorio D pueden ser secuencias
55 V_L y la cadena complementaria es una cadena V_H .

La biblioteca de secuencias CDR3-FR4 puede tener un origen enteramente humano o puede comprender en parte

secuencias humanas con algunas secuencias retenidas procedentes del anticuerpo de referencia. Por ejemplo, la secuencia de la región codificada por el segmento J puede ser proporcionada por uno o varios segmentos J humanos, y el resto de la CDR3, compuesta por el segmento D y cualquier adición N, puede proceder del anticuerpo de referencia. Alternativamente, la CDR3 puede contener secuencias aleatorias o secuencias sintéticas.

- 5 En algunas realizaciones, la región CDR3-FR4 puede estar comprendida por una región FR3-CDR3-FR4. En tal realización, la FR3 puede provenir, por ejemplo de un repertorio humano, siendo la región CDR3-FR4 según se ha descrito anteriormente.

Anticuerpos modificados genéticamente

- 10 Los anticuerpos modificados genéticamente usando los métodos de la invención descritos en la presente memoria tienen al menos un casete de intercambio procedente de un gen de anticuerpo y un segundo casete procedente de otro gen de anticuerpo. Los anticuerpos formados de la combinación de dos o más casetes de intercambio se distinguen de los anticuerpos humanos que se presentan de forma natural y de otras formas de anticuerpos seleccionados modificados genéticamente o *in vitro* o *in vivo* en función de sus secuencias. La combinación de dos casetes de intercambio genera una diversidad combinatoria adicional no encontrada en los anticuerpos naturales.
- 15 Para las combinaciones de casetes de intercambio de línea germinal, el origen de cada casete es identificado fácilmente a partir de bases de datos de secuencias de la región V de línea germinal humana. Para combinaciones que implican casetes de intercambio procedentes de anticuerpos mutados somáticamente, la secuencia de línea germinal humana más cercana es identificada por comparación secuencial de cada casete mínimo con las bases de datos de secuencias de la región V. Por este medio, se pueden identificar los casetes de intercambio usados en la construcción de una región V recombinada.
- 20

Las secuencias de todos los genes de la región V de línea germinal humana son conocidos y pueden ser objeto de acceso en la base de datos de la región V proporcionada por el MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido (Honegger y Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 309:657, 2001; Tomlinson, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227: 776, 2002; Cox, *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24: 827, 1994).

- 25 Los métodos de la invención también proporcionan anticuerpos humanos novedosos generados por recombinación entre casetes de intercambio en una o ambas regiones V. La sustitución de casetes de intercambio proporciona una diversidad adicional por la recombinación entre diferentes genes V. Los casetes pueden ser una combinación de casetes no humanos y humanos o pueden ser completamente humanos.

- 30 En los seres humanos, hay 51 genes V_H de línea germinal y cada uno de estos puede recombinarse. Hay 40 genes V_{κ} y 31 genes V_{λ} , y cada uno de los genes kappa o lambda puede ser recombinado. Preferiblemente, la recombinación es entre miembros de la misma subclase. Los genes V_H de línea germinal se subdividen en 7 subclases ($V_{H1} - V_{H7}$) y las cadenas ligeras de línea germinal se subdividen en 16 subclases ($V_{K1} - V_{K6}$ y $V_{\lambda 1} - V_{\lambda 10}$).

- 35 La recombinación entre casetes funcionales puede llevarse a cabo con ventaja usando secuencias homólogas en uno de los marcos. Por ejemplo, las regiones FR2 de anticuerpos dentro de la misma subclase V_H son muy homólogas. A continuación se muestran las secuencias de la región FR2 de los anticuerpos humanos de línea germinal. Los anticuerpos de línea germinal de la subclase V_{H2} tienen secuencias de aminoácidos idénticas en la FR2. En la subclase V_{H3} , 9/22 secuencias de anticuerpos de línea germinal tienen secuencias FR2 idénticas al consenso para esta subclase. Solo 2/51 anticuerpos humanos de línea germinal difieren de la secuencia FR2 de consenso para su subclase particular en más de 1 aminoácido entre los 14 aminoácidos de la FR2. Estos se muestran a continuación en la Tabla 1.
- 40

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de la región Marco 2 de los dominios humanos V_H de línea germinal. Las secuencias de la tabla representan únicamente las subclases con más de un miembro. Se subrayan las diferencias con respecto a la secuencia de consenso para cada subclase.

VH1	1-3	1-02	WVRQAPGQGLEWMG
	1-3	1-03	WVRQAPGQ <u>R</u> LEWMG
	1-3	1-08	WVRQA <u>T</u> GQGLEWMG
	1-2	1-18	WVRQAPGQGLEWMG
	1-U	1-24	WVRQAPG <u>K</u> GLEWMG
	1-3	1-45	WVRQAPGQ <u>A</u> LEWMG
	1-3	1-46	WVRQAPGQGLEWMG
	1-3	1-58	WVRQA <u>R</u> GQ <u>R</u> LEW <u>I</u> G
	1-2	1-69	WVRQAPGQGLEWMG
	1-2	1-e	WVRQAPGQGLEWMG
	1-2	1-f	WV <u>Q</u> QAPG <u>K</u> GLEWMG

VH2	3-1/2-1	2-05	WIRQPPGKALEWLA
	3-1	2-26	WIRQPPGKALEWLA
	3-1	2-70	WIRQPPGKALEWLA
VH3	1-3	3-07	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-09	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-11	WVRQAPGKGLEWVS
	1-1	3-13	WVRQA <u>T</u> GKGLEWVS
	1-U	3-15	WVRQAPGKGLEWV <u>G</u>
	1-3	3-20	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-21	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-23	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-30	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-30.3	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-30.5	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-33	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-43	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-48	WVRQAPGKGLEWVS
	1-U	3-49	WVRQAPGKGLEWV <u>G</u>
	1-1	3-53	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-64	WVRQAPGKGLE <u>Y</u> VS
	1-1	3-66	WVRQAPGKGLEWVS
	1-4	3-72	WVRQAPGKGLEWV <u>G</u>
	1-4	3-73	WVRQA <u>S</u> GKGLEWV <u>G</u>
	1-3	3-74	WVRQAPGKGL <u>V</u> WVS
	1-6	3-d	WVRQAPGKGLEWVS
VH4	2-1/1-1	4-04	WVRQPPGKGLEWIG
	2-1	4-28	WIRQPPGKGLEWIG
	3-1	4-30.1	WIRQH <u>P</u> GKGLEWIG
	3-1	4-30.2	WIRQPPGKGLEWIG
	3-1	4-30.4	WIRQPPGKGLEWIG
	3-1	4-31	WIRQH <u>P</u> GKGLEWIG
	1-1	4-34	WIRQPPGKGLEWIG
	3-1	4-39	WIRQPPGKGLEWIG
	1-1	4-59	WIRQPPGKGLEWIG
	3-1	4-61	WIRQPPGKGLEWIG
	2-1	4-b	WIRQPPGKGLEWIG

Además, los segmentos génicos V pueden recombinarse con un casete CDR3-FR4 que puede ser humano o que puede comprender secuencias humanas y no humanas.

Así, en una realización, un dominio V_H o un dominio V_L contiene los siguientes elementos:

- 5 un segmento génico V compuesto por un casete humano de intercambio procedente de un gen de anticuerpo humano y un segundo casete de intercambio procedente de un gen diferente de anticuerpo humano
- una CDR3 derivada, al menos parcialmente, de un anticuerpo de referencia
- una secuencia FR4.

- 10 A menudo, al menos uno de los casetes de intercambio es idéntico a una secuencia de línea germinal humana. El dominio V_H o V_L en esta realización se empareja con una cadena complementaria formando un dímero V_H-V_L funcional,

capaz de unirse a un antígeno definido. La cadena normalmente tiene una secuencia CDR3 derivada del mismo anticuerpo de referencia que la primera cadena, de modo que el par de CDR3 defina la especificidad de unión al antígeno. Lo más frecuente es que la segunda cadena tenga una CDR3 proveniente de un anticuerpo de referencia y un segmento génico V completo procedente de un único clon de anticuerpo, tal como un gen de línea germinal humana.

También se proporciona un dímero V_H-V_L humano capaz de unirse a un antígeno con una especificidad predefinida que comprende:

una primera región V compuesta por un segmento génico V codificado por línea germinal, una porción de CDR3 derivada de un anticuerpo de referencia, y secuencias adicionales para completar las secuencias CDR3 y FR4;

una región V complementaria compuesta por un segmento génico V constituido a partir de dos casetes de intercambio recombinados —al menos uno de los cuales es de secuencia de línea germinal—, una porción de CDR3 derivada de un anticuerpo de referencia, y secuencias adicionales para completar las secuencias CDR3 y FR4.

En un ejemplo, la primera región V es una región V_H y la porción de CDR3 procedente del anticuerpo de referencia es un segmento D procedente de un anticuerpo de roedor que se une a un antígeno de especificidad predefinida. En este caso, la región V complementaria es una región V_L y la porción de la CDR3 procedente del anticuerpo de referencia puede derivar del gen V o puede formar parte del segmento JL.

En algunos casos, se usan CDR3 completas procedentes del anticuerpo de referencia, en cuyo caso los pares de CDR3 son suficientes para dirigir la especificidad de unión del dímero V_H-V humano con el mismo epítipo que el del anticuerpo de referencia.

La recombinación de dos casetes de intercambio procedentes de anticuerpos humanos diferentes se usa para acceder a una diversidad de secuencias adicional no encontrada en los genes humanos de línea germinal natural, pero sin la necesidad de aprovechar la mutación somática para generar anticuerpos de afinidad adecuada por el antígeno deseado. Tales anticuerpos tienen segmentos génicos V compuestos por entero de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal y, por lo tanto, cabe esperar que sean mínimamente inmunogénicos en un uso clínico en seres humanos. Sin embargo, la recombinación de dos genes diferenciados puede introducir "epítopos de unión", es decir, secuencias en el sitio de recombinación que no se encuentran de forma natural y que pueden ser reconocidas por los receptores de los linfocitos T como epítopos extraños en linfocitos T y que, por ende, desencadenen una respuesta inmunitaria. Sin embargo, mediante una elección apropiada de sitios de recombinación, tales epítopos de unión pueden reducirse o evitarse por completo. Así, por ejemplo, los diferentes miembros de la subclase V_{H3} de las cadenas pesadas son muy homólogos en la Marco 2 y la recombinación en esta región puede ser usada para evitar la generación de un número significativo de epítopos de unión de linfocitos T.

Clonación de segmentos V humanos

Los segmentos V humanos correspondientes a casetes de intercambio pueden obtenerse fácilmente usando técnicas conocidas en la especialidad. Por ejemplo, pueden obtenerse segmentos V, tanto de línea germinal como madurados por afinidad, a partir de repertorios de la región V de linfocitos de la sangre periférica (PBL) agrupados de múltiples individuos usando métodos convencionales de clonación de ADNc (Sambrook y Russell, ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., tomos 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). Puede usarse PCR para amplificar los segmentos V deseados para la clonación. Sin embargo, los mecanismos de amplificación exponencial son propensos a sesgos aleatorios, y esto puede agravarse por el uso de cebadores degenerados, que tienen eficacias de cebado variables, lo que da lugar a una pérdida significativa de la diversidad. Así, cuando se desea amplificación, puede ser deseable usar un método de amplificación lineal independiente de cebadores, tal como la transcripción *in vitro* (Sambrook y Russell, ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., tomos 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

En una realización, se aísla ARNm de PBL humanos o de otros tejidos ricos en linfocitos, como el bazo, usando métodos estándar (por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1997).

Las secuencias del segmento V humano de línea germinal pueden ser clonadas a partir de ADN genómico mediante PCR o métodos de amplificación de la misma manera que se clonan a partir de ADNc las secuencias de segmentos V reordenados y mutados somáticamente.

Métodos de detección

Pueden usarse varios procedimientos diferentes de detección dependiendo de la elección del vector de expresión. En la técnica son muy conocidos los métodos de detección por visualización (véanse, por ejemplo, las referencias ejemplares de visualización citadas más arriba).

En una realización, el repertorio de anticuerpos es expresado como fragmentos Fab o Fab' en *E. coli*. Tales fragmentos de anticuerpos pueden ser detectados, por ejemplo, en un ensayo de transferencia de colonias. El uso de fragmentos Fab', con una bisagra de inmunoglobulina, permite la generación de una mezcla de moléculas Fab' monovalentes y fragmentos F(ab')₂ bivalentes. La presencia de moléculas F(ab')₂ puede ser ventajosa en la detección de anticuerpos a ciertos antígenos para los cuales la unión bivalente puede contribuir a la avidéz y, así, a la intensidad de la señal en el ensayo de detección. A continuación se describe brevemente un protocolo ejemplar para detectar las moléculas secretadas por un ensayo de transferencia de colonias.

En la técnica se conocen vectores y métodos para la expresión de anticuerpos a partir de *E. coli* (por ejemplo, Pluckthun, *Methods* 2:88-96, 1991; Corisdeo y Wang, *Protein Expr Purif.* 34:270-9, 2004; Humphreys *et al.*, *Protein Expr Purif.* 26:309-20, 2002). Las cadenas pesada y ligera pueden ser expresadas a partir de dos promotores separados (como los promotores tac, lac o Ara) o a partir de un mensaje dicistrónico, en cuyo caso se usa un solo promotor. Se traduce cada cadena. En algunas realizaciones, puede presentarse un péptido señal para dirigir la secreción. Tal péptido señal puede ser un péptido señal procariota natural, tal como PelB u OmpA, o puede ser un péptido señal no natural (por ejemplo, véase la solicitud de patente estadounidense 2002/0072093).

También son conocidos los ensayos de unión de transferencia de colonias (por ejemplo, Govannoni *et al.*, *Nucleic Acids Research* 29:e27, 2001). Para el cribado de la biblioteca, la biblioteca es puesta en una placa a una densidad de no más de ~10⁴ por placa de 150mm o el equivalente en un medio sólido con antibiótico, pero sin inductor de la transcripción. Así, para una biblioteca de 10⁶, esto requiere al menos 100 de las placas de 150mm o su equivalente. Después de un cultivo de un día para otro, las colonias resultantes son transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas en caldo nuevo durante unas horas en presencia del inductor de la transcripción; por ejemplo, IPTG para el promotor *lac*. El filtro es transferido con el lado de la colonia hacia arriba a un segundo filtro, que ha sido recubierto con antígeno (0,5-20µg/ml), bloqueado con leche desnatada en polvo, y colocado sobre un medio sólido nuevo que contiene el inductor. Los filtros son incubados unas horas más mientras los anticuerpos se difunden de las colonias al antígeno del filtro directamente debajo de cada colonia. Los filtros recubiertos de antígeno son entonces procesados para detectar anticuerpos unidos al antígeno. Los filtros se lavan e incuban unas horas con un anticuerpo antietiqueta que se une a la etiqueta del epítipo en cada Fab, y que se conjuga con peroxidasa de rábano picante (HRP). La conjugación puede ser directa o indirecta; por ejemplo, mediante acoplamiento con biotina-estreptavidina o similar. A continuación, después de eliminar por lavado el anticuerpo antietiqueta/HRP no unido, el filtro es incubado en presencia del sustrato (reactivo ECL Plus reagent, Amersham Biosciences) según las recomendaciones del proveedor, y el Fab unido es detectado y cuantificado por detección espectrofotométrica o autorradiográfica de la quimioluminiscencia resultante. Dado que cada filtro es una imagen de la placa de la que se transfirieron las colonias, las colonias productoras de los Fab unidos al antígeno son fácilmente identificadas y recuperadas. Las condiciones para el ensayo de unión de transferencia de colonias (CLBA) pueden ser optimizadas empíricamente. Por ejemplo, el inductor de la transcripción puede optimizarse para evitar la sobreexpresión o la subexpresión determinando experimentalmente la cantidad requerida, por ejemplo, para una detección del 100% de diez veces sobre el segundo plano por quimioluminiscencia de la biblioteca de Fab cuando se usa un ligante universal de Fab —por ejemplo, un anticuerpo anti Ig humana— como antígeno en el filtro.

El rigor de la sección también puede manipularse regulando la concentración del antígeno en el filtro. Por ejemplo, la concentración del antígeno con la que el Fab que ha de ser humanizado produce una señal mínima, por ejemplo, de no más de 10 veces con respecto al segundo plano, puede ser determinada y usada para la selección, para que los Fab con mayores afinidades y/o mayores niveles de expresión puedan ser fácilmente identificados por la intensidad de sus señales. Los niveles de expresión pueden determinarse en paralelo efectuando transferencias de colonias duplicadas e incubándolas sobre filtros recubiertos con un ligante universal de Fab, tal como un anticuerpo anti Ig humana. La afinidad relativa por cada colonia es determinada a continuación como la proporción entre su señal quimioluminiscente procedente del filtro con el antígeno y su señal procedente del filtro del ligante universal de Fab, y las proporciones pueden ser comparadas entre sí y con la misma proporción para que el Fab precursor no humano ordene por rango los Fab seleccionados según su afinidad. A continuación, las afinidades absolutas pueden ser determinadas por cualquiera de varios métodos; por ejemplo, métodos de resonancia de plasmón superficial (SPA, Fagerstam *et al.*, 1992, *J Chromatog* 597:397-410).

Determinación de la afinidad

Se somete a los anticuerpos aislados de detecciones primarias de anticuerpos secretados o seleccionados a partir de tecnologías de visualización a análisis adicional para determinar las afinidades cuantitativas por el antígeno diana. Normalmente, los anticuerpos son expresados en forma soluble para este fin, lo que puede necesitar un cambio de formato como fragmento soluble o como una IgG entera si los anticuerpos fueron aislados en origen como proteínas de fusión a partir de un planteamiento de visualización en la superficie.

Las afinidades pueden determinarse mediante diversos estudios de unión competitiva que requieren la interacción del anticuerpo en solución con el antígeno nativo, ya sea en solución o en células completas, y en el análisis de afinidad por gráficos de Scatchard. Alternativamente, la afinidad puede determinarse en un antígeno aislado; por ejemplo en ensayos por inmuoabsorción ligados a enzimas (ELISA) o por análisis de resonancia de plasmón superficial u otros inmunoensayos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999). Harlow y Lane y manuales de procedimientos similares también dan a

conocer técnicas para correlacionar epítomos o alternativamente, experimentos competitivos, para determinar si un anticuerpo se une al mismo epítomo que el anticuerpo donador.

En las primeras etapas de estudio, por ejemplo, estudios que analizan la sustitución de un casete de intercambio, siendo el resto de las secuencias de anticuerpos de un anticuerpo de referencia, se selecciona un anticuerpo que tenga una afinidad demostrable por el anticuerpo. La afinidad puede ser menor que la del anticuerpo de referencia.

Los anticuerpos producidos usando los métodos de la invención son normalmente anticuerpos de gran afinidad y pueden tener constantes de disociación monovalente en el intervalo de 50nM a 1 pM. Preferiblemente, el anticuerpo tiene una afinidad monovalente inferior a 10nM, siendo lo más preferible que sea inferior a 1 nM.

Los anticuerpos tienen afinidades preferiblemente no más de 5 veces peores que la del anticuerpo de referencia, siendo lo más preferible que tengan una afinidad mayor que la del anticuerpo de referencia.

Ejemplos

Construcción y detección de bibliotecas de casetes V_H o V_L

Se crean regiones V híbridas recombinando parte de un anticuerpo de referencia con bibliotecas de casetes creadas a partir de un repertorio de la región V humana. El proceso de recombinación se realiza normalmente mediante PCR de extensión de solapamiento, procedimiento muy conocido por los expertos en la técnica (Mehta, RK y Singh, J., *Biotechniques* 26:1082-1086,1999). La cadena híbrida puede ser bien una V_H o bien una V_L . Los repertorios de la región V humana pueden derivarse de segmentos V codificados por ARNm aislado de cualquier de varios linfocitos B productores de Ig, incluyendo los de la sangre periférica o el bazo. La biblioteca de casetes V_H o V_L puede ser emparejada con la cadena complementaria, que puede proceder ya sea del anticuerpo de referencia, de una cadena humana o de una cadena híbrida humana de referencia, y ser sometida a ensayo en cuanto a su unión al antígeno diana.

La biblioteca de casetes de intercambio se crea normalmente con dos o más tandas de PCR. En la primera etapa, se usa la secuencia del anticuerpo de referencia para diseñar cebadores de PCR para las regiones N-terminal o C-terminal, y una región o regiones (normalmente las CDR) dentro de la región V que será común a todas las moléculas en la biblioteca recombinada. También se diseñan cebadores de PCR para que sean complementarios de los repertorios de la región V humana, aprovechando la conservación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos encontrada en las familias de la región V. Los cebadores del repertorio pueden estar degenerados en una o más posiciones para dar cuenta de la heterogeneidad de la secuencia. El cebador o conjunto de cebadores pueden estar diseñados para amplificar una o más familias de la región V.

Ejemplo 1. Casete de intercambio FR1-CDR1-FR2

A título de ejemplo, se usan tres reacciones de PCR para crear una región V híbrida. La primera PCR amplifica la región FR1-CDR1-FR2 humana procedente de un repertorio de segmentos V humanos usando cebadores A y B (Figura 1a). El cebador A se selecciona entre uno o más de un conjunto de cebadores N-terminal diseñados para amplificar todas las regiones V_L de línea germinal (Welschof, M. *et al.*, *J. Immunological Methods* 179: 203-214, 1995). Además, se agrega un sitio de enzima de restricción en el extremo 5' del cebador A para su posterior clonación en un vector de expresión. El cebador B es uno o más cebadores complementarios de una región conservada en el centro o en el extremo C-terminal de la FR2 humana; la región de complementariedad es normalmente de 12-15 nucleótidos (nt) y puede incluir posiciones degeneradas para dar cuenta de la heterogeneidad de la línea germinal humana.

Además, el cebador B tiene una región de 12-15 nt en su extremo 5' complementaria de los 12-15 nt del anticuerpo de referencia. La segunda PCR amplifica la región CDR2-FR3-CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia usando los cebadores C y D (Figura 1b), habiendo sido diseñados los cebadores C y D usando la secuencia conocida de nucleótidos del anticuerpo de referencia. Normalmente, el cebador D tiene un sitio de restricción agregado a su extremo 5' para su posterior clonación en un vector de expresión. Las reacciones de PCR usan condiciones estándar (por ejemplo, 94°C durante 10 segundos, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, repetido a lo largo de 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes son purificados en gel apartados de los cebadores A, B, C y D de amplificación y se cuantifica el rendimiento del producto. En la PCR tercera y última, se mezclan cantidades molares iguales de dos productos de PCR y se las amplifica con el cebador A y el cebador D usando condiciones estándar de ciclo. Estas regiones de complementariedad de los cebadores B y C se hibridan y soportan la síntesis de una región V contigua que es un híbrido del repertorio humano FR1-CDR1-FR2 y del anticuerpo de referencia CDR2-FR3-CDR3-FR4 (Figura 1c). La biblioteca de regiones V híbridas se clona en un vector de expresión usando los sitios de restricción en los cebadores A y D, y normalmente se aíslan 10.000 clones para un análisis ulterior.

Un ejemplo específico del casete de intercambio FR1-CDR1-FR2 es como sigue. Se agregó un repertorio humano de secuencias FR1-CDR1-FR2 a la región murina CDR2-FR3-CDR3-FR4 del anticuerpo 19 anti citoquina humana y se seleccionaron del repertorio casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 humanos que soportaban la unión al antígeno. El cebador A es específico a los N-terminales de las regiones V de Vkl; se agregó un sitio BssHII al cebador A y se lo usó para la clonación en un vector de expresión. El cebador B es una mezcla de tres cebadores que se hibridan con el extremo C-terminal de un repertorio de FR2 humana. Se añadieron 15 nt adicionales de la secuencia de CDR2 de

anticuerpo murino 19 al extremo 5' del cebador B como una región de hibridación con el cebador C en la PCR de extensión de solapamiento usada para construir la región V final. El cebador C se hibrida con la CDR2 del V_L del anticuerpo murino 19 y se solapa con el extremo 5' de las secuencias que comprenden el cebador B. El cebador D se hibrida con la FR4 del Fab murino y tiene un sitio *SpeI* agregado que se usa para la clonación en un vector de expresión.

En la primera PCR, se usaron los cebadores A y B para amplificar los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 humanos a partir de la primera hebra de ADNc de un repertorio de Ig inmunitaria humana derivado de sangre periférica y del bazo. En la segunda PCR, se amplificó el CDR2-FR3-CDR3-FR4 de V_L del anticuerpo murino 19. Se mezclaron cantidades molares iguales de dos PCR y se las amplificó con los cebadores A y D para construir la región V final. Así se construyó la biblioteca de casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 de repertorio humano. Para la cadena complementaria se usó una cadena pesada Vh1-02 de línea germinal humana que contenía el CDR3-FR4 del anticuerpo murino 19.

Se sometieron a ensayo aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes en un ensayo de unión de transferencia de colonias (CLBA) usando la proteína citoquina humana como antígeno diana. Se seleccionaron dos clones, FB27-A11 y FB27-A12, que se unieron al antígeno. Cada uno era una secuencia FR1-CDR1-FR2 de V_KI humano unida a la secuencia CDR2-FR3-CDR3-FR4 murina. Se demostró que los clones FB27 se unen al antígeno de la citoquina humana en un ensayo ELISA.

Ejemplo 2. Casete de intercambio FR2-CDR2-FR3

En otra realización de la invención, se recombina un repertorio FR2-CDR2-FR3 humano con las regiones FR1-CDR1 y CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia. En este ejemplo, se realizan tres reacciones de PCR para obtener la región V híbrida final. El repertorio de regiones V humanas se obtiene a partir de una biblioteca de segmentos V humanos a la que se ha agregado la región CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia mediante procedimientos estándar de ADN recombinante. El cebador A y el cebador B (Figura 2a) están diseñados para ser complementarios del terminal N de la región V y de la región C-terminal de la CDR1 del anticuerpo de referencia; normalmente, se agrega un sitio de restricción al extremo 5' del cebador A para la posterior clonación en un vector de expresión. Para la primera reacción de PCR, se usan los cebadores A y B para amplificar la región FR1-CDR1 del anticuerpo de referencia usando condiciones estándar de ciclo para la PCR. El producto resultante de la PCR es purificado en gel apartado de los cebadores A y B y se cuantifica. Para la segunda reacción de PCR, el cebador C (Figura 2b) está diseñado para que sea complementario de las regiones FR2 del repertorio de Ig humana de la región V; algunas posiciones del cebador B podrían estar degeneradas para dar cuenta de las variaciones en la secuencia de nucleótidos de línea germinal humana. Además, se agrega al extremo 5' del cebador C una secuencia de 12-18 nt complementaria de los 12-18 nt finales de la CDR1 del anticuerpo de referencia para facilitar la PCR de extensión de solapamiento. El cebador D (Figura 2b) es complementario del extremo 3' de la FR4; normalmente, se agrega un sitio de restricción al extremo 5' del cebador D para la posterior clonación en un vector de expresión. Se usan los cebadores C y D para amplificar el repertorio humano FR2-CDR3-FR3 más las regiones CDR3-FR4 de referencia procedentes de la biblioteca de repertorios de la región V humana usando condiciones estándar de ciclo para la PCR. El producto resultante de PCR es purificado en gel apartado de los cebadores C y D y se cuantifica. En la PCR tercera y última, se mezclan cantidades molares iguales de los productos de PCR primero y segundo y se las amplifica con el cebador A y el cebador D usando condiciones estándar de ciclo. Las regiones complementarias de los cebadores B y C se hibridan y soportan la síntesis de una región V contigua que es un híbrido del FR1-CDR1 de la región V de referencia, del FR2-CDR2-FR3 de repertorio humano y del CDR3-FR4 de la región V de referencia (Figura 2b). La biblioteca de la región V híbrida es clonada en un vector de expresión usando los sitios de restricción en los cebadores A y D, y normalmente se aíslan 10.000 clones para un análisis ulterior.

Como ejemplo específico, se construyó un repertorio de casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 humano en el V_L del anticuerpo murino 19 anti citoquina. El cebador A es complementario de la región N-terminal del V_L murino y tiene un sitio *BssHII* agregado al extremo 5' para la clonación en un vector de expresión. El cebador B es complementario de los 18 nt finales de la CDR1 del V_L del anticuerpo murino 19. El cebador C se hibrida con la región N-terminal del repertorio humano de FR2 de V_KI; en su extremo 5' se agrega al cebador B una región de 18 nt de complementariedad. El cebador D se hibrida con el terminal C de la región V del anticuerpo murino 19 y tiene un sitio *SpeI* agregado que se usa para la clonación en un vector de expresión.

En la primera PCR, se usan los cebadores A y B para amplificar la región murina FR1-CDR1. En la segunda PCR, se usan los cebadores C y D para amplificar el repertorio FR2-CDR2-FR3 humano procedente de una biblioteca de la región V humana, conteniendo cada miembro de la biblioteca la CDR3 del V_L del anticuerpo murino 19 y la FR4 de línea germinal, ya sea murina o humana. En la tercera PCR, se amplifican cantidades molares iguales de las dos primeras reacciones de PCR con los cebadores A y D para completar la construcción del repertorio de regiones V del casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 humano. Se usó una cadena pesada Vh1-02 de línea germinal humana que contenía la región CDR3-FR4 del anticuerpo murino 19.

Se sometieron a ensayo aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes en un ensayo de unión de transferencia de colonias (CLBA) usando la proteína citoquina humana como antígeno diana. Se recuperaron y purificaron cuatro anticuerpos recombinantes, FB25-6-1, FB25-D3, FB25-E1 y FB26-E9, que se unieron al antígeno

diana. Dos de los clones eran la secuencia FR2-CDR2-FR3 de V κ I humano unida a las secuencias murinas FR1-CDR1 y CDR3-FR4. Los otros dos clones eran la secuencia FR2-CDR2-FR3 de V κ III humano unida a las secuencias murinas FR1-CDR1 y CDR3-FR4. Era probable que los casetes de intercambio FR2-CDR2-FR3 de V κ III estuvieran incluidos en la biblioteca, porque el cebador C se hibridaron de forma cruzada con secuencias del segmento V de V κ III humano. Se demostró que los clones FB25 y FB26 se unen al antígeno de la citoquina humana en un ensayo ELISA.

Ejemplo 3. Biblioteca de FR3-CDR3-FR4

La biblioteca de FR3-CDR3-FR4 puede ser de V $_H$ o V $_L$ y se construye de la manera siguiente. Se prepara una primera hebra de ADNc usando procedimientos estándar a partir de ARNm derivado de células que expresan un repertorio inmunitario; por ejemplo, linfocitos B provenientes de la sangre periférica o del bazo. Se prepara mediante PCR una biblioteca de ADNc del segmento V que contiene las regiones de FR1 a FR3 de la primera hebra de ADNc. El ADNc es amplificado por PCR usando uno o varios cebadores directos en la región N-terminal de la FR1 y uno o varios cebadores inversos procedentes de la región C-terminal de la FR3. Los cebadores de PCR están diseñados para que sean complementarios de los repertorios del segmento V humano, aprovechando la conservación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos encontrada en las familias del segmento V. Los cebadores del repertorio pueden estar degenerados en una o más posiciones para dar cuenta de la heterogeneidad de la secuencia. El cebador o conjunto de cebadores pueden estar diseñados para amplificar una o más familias del segmento V.

En primer lugar se construye una biblioteca de la región V que contiene la CDR3 de referencia y una FR4. La región CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia se une al repertorio del segmento V mediante uno de varios métodos que incluyen la ligadura por medio de un sitio compatible de restricción o por PCR de extensión de solapamiento. La región FR4 puede ser la misma que la del anticuerpo de referencia o puede ser convertida en la secuencia de línea germinal humana en aquellos residuos en los que difieren las regiones J germinales de referencia y humana.

El repertorio FR3-CDR3-FR4 se construye con tres reacciones de PCR como sigue. En la primera PCR (Figura 3a), se usan el cebador A y el cebador B para amplificar la región FR1-CDR1-FR2-CDR2 del anticuerpo de referencia. Normalmente, el cebador A tiene un sitio de restricción agradado para la clonación en un vector de expresión. En la segunda PCR, el repertorio FR3-CDR3-FR4 puede derivarse de la biblioteca construida de la región V mediante una primera PCR usando un cebador C directo al extremo N-terminal de la FR3 y un cebador D inverso al extremo C-terminal de la FR4. Normalmente, los cebadores de PCR tienen una longitud de 15-20 nt y el cebador C directo tiene una región de 12-15 nt de la CDR2 de referencia en su extremo 5' usado para la PCR de extensión de solapamiento. El cebador C puede contener uno o más miembros y podría estar degenerado en una o más posiciones para dar cuenta de la heterogeneidad de la secuencia en la línea germinal humana en estas posiciones. Normalmente, el cebador D tiene un sitio de restricción agregado para la clonación en un vector de expresión. Las reacciones de PCR usan condiciones estándar (por ejemplo, 94°C durante 10 segundos, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, repetido a lo largo de 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes son purificados en gel apartados de los cebadores A, B, C y D de amplificación y se cuantifica el rendimiento del producto. En la tercera PCR, se amplifican cantidades molares iguales de las dos primeras reacciones de PCR con los cebadores A y D para completar la construcción del repertorio FR3-CDR3-FR4 humano. El repertorio de Ig humana de FR3-CDR3-FR4 es diverso en la FR3 y común en la región CDR3-FR4. La biblioteca de FR3-CDR3-FR4 es clonada en un vector de expresión y es coexpresada con la cadena V $_H$ o V $_L$ de complementariedad. La cadena V $_H$ o V $_L$ puede derivarse del anticuerpo de referencia o puede ser una cadena humana modificada genéticamente.

Se creó una biblioteca de FR3-CDR3-FR4 para las cadenas V $_H$ o V $_L$ de un clon 10 del anticuerpo murino de referencia que se une a una proteína citoquina humana. Se sometieron a ensayo aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes para las cadenas V $_H$ o V $_L$ en un ensayo de unión de transferencia de colonias (CLBA) usando la proteína citoquina humana como antígeno diana. Se recuperaron y purificaron dos anticuerpos recombinantes a partir de la biblioteca de FR3-CDR3-FR4 de V $_H$, B-17-11-H1 y B-17-15-H5, que se unieron al antígeno diana. Se recuperaron y purificaron dos anticuerpos recombinantes a partir de la biblioteca de FR3-CDR3-FR4 de V $_L$, B-18-17-H7 y B-18-20-H10, que se unieron al antígeno diana. Todos los clones V $_H$ o V $_L$ tenían una secuencia de FR3 similar, y a veces idéntica, a la secuencia de la FR3 de línea germinal humana. Se demostró que los clones del anticuerpo B para las cadenas V $_H$ o V $_L$ se unen al antígeno de la citoquina humana en un ensayo ELISA.

Ejemplo 4. Sustitución de CDR3-FR4

La región CDR3-FR4 del anticuerpo de referencia puede ser sustituida por un casete de intercambio CDR3-FR4 seleccionado de un repertorio humano. Una biblioteca de CDR3-FR4 puede fusionarse con uno o con un conjunto de segmentos V derivados de regiones V que se sepa que se unen al antígeno de referencia. En la primera PCR, se usan los cebadores A y B (Figura 4a) para amplificar un segmento V a partir ya sea del anticuerpo de referencia o de un segmento V humano modificado genéticamente que se sepa que se une al antígeno diana. En la Figura 4a, el cebador A se hibrida con el terminal N de la región V y normalmente tiene un sitio de restricción agregado al extremo 5' para la clonación en un vector de expresión. El cebador B se hibrida con el extremo C-terminal de la FR3 y tiene un sitio de restricción agregado a él para unir el producto de PCR al repertorio del casete de intercambio CDR3-FR4. En la segunda PCR, se usan los cebadores C y D (Figura 4b) para amplificar el casete de intercambio CDR3-FR4 procedente del ARNm de un repertorio de Ig humana derivado de linfocitos de la sangre periférica y/o de linfocitos del bazo. El cebador C se hibrida con la FR3 o con la FR3 y una porción de la CDR3. El cebador C también contiene un

sitio de restricción que puede ser usado para fusionar la biblioteca del casete de intercambio CDR3-FR4 con el o los segmentos V. El cebador D contiene una o más secuencias que se hibrida con los extremos C-terminal de las regiones V humanas; el cebador D puede contener una mezcla degenerada de nucleótidos en una o más posiciones que refleja la diversidad de secuencia en el repertorio de la región J humana. Además, el cebador D contiene un sitio de restricción que puede ser usado para la inserción de las regiones V resultantes en un vector de expresión.

A título de ejemplo específico, la región CDR3-FR4 del V_L murino de un anticuerpo 19 modificado genéticamente anti citoquina humana fue sustituida con un casete de intercambio CDR3-FR4 humano. El cebador A se une a las regiones N-terminal de FB39-3, FB38-4, FB44-15 y FB44-16, un grupo de cadenas V_L humanas modificadas genéticamente cada una de las cuales se une a una citoquina humana cuando está emparejada con un V_H complementario. El cebador A contiene el sitio de restricción *Bss*HII usado para la clonación en un vector de expresión. El cebador B se hibrida con los extremos C-terminal de la FR3 para cada V_L del grupo de FB39-3, FB38-4, FB44-15 y FB44-16. El cebador B contiene el sitio de restricción *Bst*1107I para facilitar la ligadura de los segmentos V a la biblioteca del casete de intercambio CDR3-FR4. El cebador C se hibrida con la FR3 humana de la familia V_L de VκIII. El cebador D contiene tres cebadores que se hibridan con las secuencias de FR4 para las regiones J humanas Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5. El cebador D contiene un sitio *Spe*I usado para clonar las regiones V en un vector de expresión.

En la primera PCR, se usan los cebadores A y B para amplificar los segmentos V a partir de un grupo de cuatro cadenas V_L humanas modificadas genéticamente que contienen el CDR3-FR4 del anticuerpo murino 19 de referencia. Es sabido que las cadenas V_L se unen al antígeno citoquina humana cuando están emparejadas con una cadena pesada complementaria Vh1-02 de línea germinal humana con la CDR3 del V_H de referencia y una FR4 humana unida modificada genéticamente. En la segunda PCR, se usan los cebadores C y D para amplificar un repertorio del casete de intercambio CDR3-FR4 a partir de la primera hebra de ADNc del bazo humano. Los productos de PCR de las reacciones primera y segunda son digeridos con *Bst* 1107I, purificados en gel y ligados entre sí usando procedimientos estándar. Los productos de ligadura resultantes son digeridos con *Bss*HII y *Spe*I e insertados en un vector de expresión. Para la cadena complementaria se usó un segmento V que contenía una cadena pesada Vh1-02 de línea germinal humana, la CDR3 del anticuerpo murino 19 y una FR4 de línea germinal humana.

Se sometieron a ensayo aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes en un ensayo de unión de transferencia de colonias (CLBA) usando la proteína citoquina humana como antígeno diana. Se recuperó y se purificó un anticuerpo recombinante, FB67-2, que se unió al antígeno diana. El casete de intercambio CDR3-FR4 era una secuencia de aminoácidos diferente de la del CDR3-FR4 de referencia y parecía derivarse de la subclase VκIII del V_L humano. Se demostró que el clon FB67-2 se une al antígeno de la citoquina humana en un ensayo ELISA.

Ejemplo 5. Casete CDR2-FR3

Los ejemplos precedentes describen casetes de intercambio que contienen regiones CDR completas y al menos un marco adjunto. Alternativamente, un casete de CDR puede comprender una subsecuencia de la CDR que se derive del anticuerpo de referencia junto con una biblioteca de repertorios que contenga el resto de la región CDR.

A título de ejemplo específico, se creó una biblioteca de casete para la región CDR2-FR3 del V_H de anticuerpo murino de referencia, el clon 10, que se une a una citoquina humana. La CDR2 del Vh del clon 10 tiene una longitud de 17 aminoácidos y se secuencia de aminoácidos es sumamente similar a la de la subclase Vh3 humana. El MEBSD fue definido empíricamente usando mutagénesis puntual. Todas las alteraciones en las posiciones 1-6 de la CDR2 de referencia dieron como resultado la completa pérdida de la actividad de unión, mientras que las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 7-17 no abolieron la unión al antígeno.

Según se muestra en la Figura 5, las regiones V que contienen la biblioteca de casetes de CDR se construyen con cinco reacciones de PCR. Las reacciones de PCR usan condiciones estándar (por ejemplo, 94°C durante 10 segundos, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, repetido a lo largo de 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes son purificados en gel apartados de los cebadores de amplificación y se cuantifica el rendimiento del producto. La primera reacción de PCR se realiza con los cebadores A y B. El cebador A contiene la secuencia de nucleótidos que codifica el MEBSD junto con 13 nucleótidos posteriores que se hibridan con la mayoría de secuencias de CDR2 de línea germinal de la familia Vh3 humana. El cebador B se hibrida con el extremo C-terminal de la FR3 y está diseñado para capturar las secuencias de línea germinal humana del repertorio de Vh3. Los cebadores A y B son usados para amplificar el repertorio de Ig humana a partir de la primera hebra de ADNc del bazo, dando como resultado una biblioteca del casete de intercambio CDR2-FR3. En la segunda reacción de PCR se usan los cebadores C y D para amplificar el FR1-CDR1-FR2 humano a partir de una cadena V_H que se sabe que se une al antígeno diana cuando es emparejada con un V_L complementario. El cebador C contiene un sitio de restricción usado para clonar la región V final en un vector de expresión. El cebador D contiene una región de complementariedad del cebador A para facilitar la PCR de extensión de solapamiento. En la tercera PCR, los cebadores E y F están diseñados para amplificar la región CDR3-FR4 ya sea del V_H de referencia o de un V_H humano modificado genéticamente que se sepa que soporta la unión al antígeno cuando está emparejado con el V_L complementario. El cebador E tiene una región de complementariedad del cebador B para facilitar la PCR de extensión de solapamiento. El cebador F contiene un sitio de restricción usado para clonar la región V en un vector de expresión.

En la cuarta PCR, se incluyen cantidades molares iguales de las reacciones de PCR primera y segunda en una

reacción de PCR junto con los cebadores C y B. Los fragmentos resultantes son purificados en gel apartados de los cebadores B y C de amplificación y se cuantifica el rendimiento del producto. En la reacción final de PCR, se combinan y amplifican cantidades molares iguales de las reacciones de PCR tercera y cuarta con los cebadores C y F para construir la región V final. Los productos de PCR son purificados y digeridos con las enzimas de restricción que escinden los sitios incluidos en los cebadores C y F. La biblioteca del casete CDR2-FR3 es insertada en un vector de expresión junto con una cadena V_L complementaria. Normalmente, se analiza mediante CLBA una biblioteca de 10.000 miembros para encontrar su unión al antígeno.

La biblioteca del casete CDR2-FR3 fue analizada mediante CLBA usando como diana el antígeno citoquina humana. Se purificaron varios anticuerpos, incluyendo B180-27-4B, B180-32-6F, B180-33-7B y B180-34-7F, que mostraban unión a la proteína citoquina humana cuando se los sometía a ensayo en un ensayo ELISA.

Ejemplo 6. Construcción y selección de casetes de intercambio iterativos

Los anteriores ejemplos describen la construcción de bibliotecas de casetes de intercambio que son un híbrido de una biblioteca de repertorios de Ig humana y de una secuencia común procedente del anticuerpo de referencia. También se pueden construir bibliotecas de casetes de intercambio en las que la secuencia común no procede del anticuerpo de referencia, sino que, más bien, procede de un casete humano de intercambio seleccionado o de una región V humana modificada genéticamente seleccionada. Tal estrategia de casetes de intercambio iterativos puede ser usada ya sea con el V_H o con el V_L . La biblioteca del casete de intercambio iterativo es clonada en un vector de expresión y es coexpresada con la cadena complementaria V_H o V_L . La cadena complementaria V_H o V_L puede derivar ya sea del anticuerpo de referencia o de una región V humana modificada genéticamente.

A título de ejemplo específico, una biblioteca de repertorios de FR2-CDR2-FR3 de Ig humana fue unida a un casete de intercambio FR1-CDR1-FR2 seleccionado; la región de unión era una secuencia común dentro de la FR2. La construcción se efectuó con tres reacciones de PCR, según se muestra en la Figura 6. El anticuerpo 19 de referencia se une a un antígeno citoquina humana. Se seleccionó una región V_H de un Fab (FB42-8) que mostraba unión a un antígeno citoquina humana. La región V_H comprendía un segmento V humano unido a la CDR3 de referencia y a una FR4 de línea germinal humana. En la primera PCR (Figura 6a), se usaron el cebador A y el cebador B para amplificar el casete FR1- CDR1-FR2 a partir de FB42-8; el cebador B se hibridó con el extremo C-terminal de la FR2. El cebador A contiene un sitio de restricción usado para la clonación en un plásmido de expresión. En la segunda reacción de PCR (Figura 6b), se usaron el cebador C y el cebador D para amplificar la región FR2-CDR2-FR3 procedente de una biblioteca de la región V_H que contiene la CDR3 de referencia y una FR4 de línea germinal humana. El cebador C se hibrida con el extremo C-terminal de la FR2 y es la secuencia complementaria del cebador B. Normalmente, el cebador D tiene un sitio de restricción agregado para la clonación en un vector de expresión. Las reacciones de PCR usan condiciones estándar (por ejemplo, 94°C durante 10 segundos, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, repetido a lo largo de 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes son purificados en gel apartados de los cebadores A, B, C y D de amplificación, y se cuantifica el rendimiento del producto. En la tercera PCR, se amplifican cantidades molares iguales de las dos primeras reacciones de PCR con los cebadores A y D para completar la construcción de la región V que contiene el repertorio del casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 humano. La biblioteca del casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 fue clonada en un vector de expresión y coexpresada con cuatro cadenas V_L humanas complementarias modificadas genéticamente.

Se sometieron a ensayo aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes para la biblioteca del casete de intercambio FR2-CDR2-FR3 en un ensayo de unión de transferencia de colonias (CLBA) usando una proteína citoquina humana como antígeno diana. Se seleccionaron tres Fab (FB48-12, FB48-18 y FB48-20) que mostraron unión al antígeno citoquina humana en un ensayo ELISA.

Ejemplo 7. Reconstrucción de casetes

Los casetes de intercambio descritos en los ejemplos anteriores eran híbridos de secuencias humanas y de referencia. Los casetes humanos de intercambio seleccionados pueden ser recombinados para crear regiones V total o parcialmente humanas. Normalmente, uno o varios casetes humanos de intercambio seleccionados de varios Fab que se unen al antígeno diana se fusionan mediante PCR de extensión de solapamiento o ligadura para crear regiones V que son sometidas a ensayo para encontrar la unión al antígeno. Tal estrategia de reconstrucción del casete de intercambio puede ser usada ya sea para el V_H o el V_L . Los casetes de intercambio pueden originarse a partir de subclases iguales o diferentes de la región V para que la región V final reconstruida sea similar a una sola línea germinal humana o sea un híbrido similar a dos o más líneas germinales humanas. El casete de intercambio reconstruido o biblioteca del casete de intercambio es clonado en un vector de expresión y es coexpresado con la cadena V_H o V_L complementaria. La cadena V_H o V_L complementaria puede derivarse ya sea del anticuerpo de referencia o de una región V humana modificada genéticamente.

A título de ejemplo específico, pueden usarse tres reacciones de PCR para recombinar casetes de intercambio (Figura 7). Se identificaron varios casetes humanos de intercambio FR1-CDR1-FR2 de V_L para el anticuerpo 19 de referencia que se unieron al antígeno citoquina humana. En la primera PCR (Figura 7a), se usaron el cebador A y el cebador B para amplificar la región del casete de intercambio FR1-CDR1-FR2 a partir del ADN de la región V. Normalmente, el cebador A tiene un sitio de restricción agregado para la clonación en un vector de expresión. El cebador A puede ser

uno o un conjunto de cebadores que se hibridan con las regiones N-terminal de la FR1 de cada casete de intercambio que haya de ser amplificado. El cebador B puede ser uno o un conjunto de cebadores que se hibridan dentro de la FR2 de cada casete de intercambio que haya de ser amplificado. Se identificaron varios casetes humanos de intercambio FR2-CDR3-FR3 de V_L que se unieron al antígeno citoquina humana. En la segunda PCR (Figura 7b), se usaron el cebador C y el cebador D para amplificar la región FR2-CDR2-FR3 a partir del ADN de la región V junto con la CDR3 de referencia y una FR4. Normalmente, el cebador D tiene un sitio de restricción agregado para la clonación en un vector de expresión. El cebador C puede ser uno o un conjunto de cebadores que se hibridan dentro de la FR2 de cada casete de intercambio que haya de ser amplificado. Normalmente, el cebador B y el cebador C son secuencias complementarias para facilitar la PCR, tercera, de extensión de solapamiento. Las reacciones de PCR usan condiciones estándar (por ejemplo, 94°C durante 10 segundos, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, repetido a lo largo de 12-25 ciclos) y los fragmentos resultantes son purificados en gel apartados de los cebadores A, B, C y D de amplificación, y se cuantifica el rendimiento del producto. En la tercera PCR, se amplifican cantidades molares iguales de las dos primeras reacciones de PCR con los cebadores A y D para completar la construcción del repertorio de la región V del V_L humano. El V_L repertorio fue clonado en un vector de expresión y coexpresado con una cadena V_H complementaria.

Se sometieron a ensayo aproximadamente 10.000 anticuerpos recombinantes resultantes para la biblioteca de repertorios de la región V en ensayos de unión de transferencia de colonias (CLBA) y ELISA usando una proteína citoquina humana como antígeno diana. Se seleccionaron tres Fab (FB30-G4, FB31-13-1 y FB40-1-1H) que mostraron unión al antígeno citoquina humana en un ensayo ELISA.

Los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 y FR2-CDR2-FR3 provenientes de FB30-G4 son ambos sumamente similares a la subclase Vkl humana. Los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 y FR2-CDR2-FR3 provenientes de FB31-13-1 son ambos sumamente similares a la subclase VklII humana. Los casetes de intercambio FR1-CDR1-FR2 y FR2-CDR2-FR3 provenientes de FB40-1-1H son sumamente similares a las subclases VklII humana y Vkl humana, respectivamente.

Se usó el análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore) para determinar las afinidades de unión de los Fab humanos modificados genéticamente derivados por reconstrucción de casetes. Con este fin, los fragmentos Fab se purificaron del caldo de cultivo de clones de *E. coli* que expresaban el Fab usando cromatografía de afinidad con proteína G. A partir de la cinética de unión determinada a partir del análisis de resonancia de plasmón superficial, se identificó un Fab reconstruido en casete con la especificidad de unión del anticuerpo 19 y una afinidad de 20 pM, que es similar a la afinidad del anticuerpo 19 de referencia (10 pM).

Se identificaron Fab reconstruidos con la especificidad del anticuerpo 10 con afinidades de 0,4 nM (en comparación con una afinidad de 1,5 nM para el clon 10), demostraron que el intercambio de casetes puede usarse para identificar los Fab con mayor afinidad que el correspondiente anticuerpo de referencia.

Los anteriores ejemplos son proporcionados únicamente a título de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente diversos parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse dando esencialmente resultados similares.

Lista de secuencias

<110> Kalobios Inc.

<120> Intercambio de casetes de la región variable de la inmunoglobulina

<130> N101580

<140> EP 05851809.3

<141> 16-11-2005

<140> PCT/US05/41825

<141> 16-11-2005

<150> US 60/628,581

<151> 16-11-2004

<160> 20

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)...(14)
 5 <223> secuencia consenso de la región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH1 de la cadena pesada de línea germinal humana

<400> 1
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

10 <210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)...(14)
 20 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH1 de la cadena pesada de línea germinal humana

<400> 2
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

25 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1) ... (14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH1 de la cadena pesada de línea germinal humana

35 <400> 3
 Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

40 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)...(14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH1 de la cadena pesada de línea germinal humana

50 <400> 4
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

55 <210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)...(14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH1 de la cadena pesada de línea germinal

humana

<400> 5

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

5

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)...(14)

<223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH1 de la cadena pesada de línea germinal humana

15

<400> 6

Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

20

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1) ... (14)

<223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH1 de la cadena pesada de línea germinal humana

30

<400> 7

Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

35

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)...(14)

<223> secuencia consenso de la región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH2 de la cadena pesada de línea germinal humana

45

<400> 8

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

50

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)...(14)

<223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

60

<400> 9

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)...(14)
10 <223> secuencia consenso de la región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

<400> 10
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

15 <210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<221> PEPTIDO
<222> (1) ... (14)
<223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

25 <400> 11
Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

30 <210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)...(14)
<223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

40 <400> 12
Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

45 <210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <220>
<221> PEPTIDO
<222> (1) ... (14)
<223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

55 <400> 13
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 14

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)...(14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

10 <400> 14
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

15 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)...(14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

25 <400> 15
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val Ser
 1 5 10

30 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)...(14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

40 <400> 16
 Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

45 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)...(14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH3 de la cadena pesada de línea germinal humana

55 <400> 17
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser
 1 5 10

60 <210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE
 <222> (1)...(14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH4 de la cadena pesada de línea germinal humana
 5
 <400> 18
 Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10
 <210> 19
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <221> PEPTIDE
 <222> (1)...(14)
 <223> secuencia consenso de la región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH4 de la cadena pesada de línea germinal humana
 20 <400> 19
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 14
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 30 <221> PEPTIDO
 <222> (1) ... (14)
 <223> región marco 2 (FR2) del dominio variable (V-H) subclase VH4 de la cadena pesada de línea germinal humana
 <400> 20
 Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un método de modificación genética de un anticuerpo que retiene la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia con un antígeno diana, comprendiendo el método:

(a) obtener una región variable a partir del anticuerpo de referencia;

(b) sustituir al menos un casete de intercambio obtenido de un segmento V, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3, de la región variable del anticuerpo de referencia con una biblioteca de los correspondientes casetes de intercambio provenientes de segmentos V humanos, generando con ello una biblioteca de regiones V híbridas que comprenden miembros en los que el al menos un casete de intercambio de la región variable del anticuerpo de referencia es sustituido con los correspondientes casetes de intercambio humanos codificados por diferentes genes, con la condición de que el al menos un casete de intercambio tenga menos de tres regiones marco (FR);

en el que el al menos un casete de intercambio obtenido del segmento V de la región variable del anticuerpo de referencia incluye al menos una CDR intacta adjunta a al menos una FR intacta del segmento V que se dan juntas de forma natural;

(c) emparejar la biblioteca de regiones V híbridas de (b) con una región V complementaria; y

(d) seleccionar un anticuerpo que comprende una región V híbrida que tiene al menos un casete intercambiado generado en la etapa (b) que tiene una afinidad de unión con el antígeno diana.

2. El método de la reivindicación 1 que, además, comprende:

(e) sustituir un segundo casete de intercambio, que comprende al menos una CDR intacta unida a al menos una FR intacta, que se dan juntas de forma natural, de la región V del anticuerpo de referencia con una biblioteca de los correspondientes casetes de intercambio provenientes de segmentos V humanos para crear una segunda biblioteca híbrida de regiones V híbridas;

(f) emparejar la segunda biblioteca de regiones V híbridas con una región V complementaria;

(g) seleccionar un anticuerpo que comprende una segunda región V híbrida, anticuerpo que tiene una afinidad de unión con el antígeno diana; y

(h) combinar el casete humano de intercambio del anticuerpo modificado genéticamente de (d) con el segundo casete humano de intercambio del anticuerpo de (g), para obtener un anticuerpo con la especificidad de unión del anticuerpo de referencia, teniendo el anticuerpo una región V híbrida que comprende al menos dos casetes humanos de intercambio.

3. El método de la reivindicación 2 que, además, comprende:

una etapa de sustitución del CDR3-FR4 de la región V híbrida con una biblioteca de regiones CDR3-FR4, emparejando la región variable con una región variable complementaria, y seleccionando un anticuerpo que retenga la especificidad de unión con el antígeno diana; o

una etapa de sustitución de la FR4 de la región V híbrida con una biblioteca de secuencias de FR4.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la región V complementaria de (c) o (f):
tiene un segmento V que se da de forma natural; o

tiene un segmento V de línea germinal; o

es una región V híbrida; o

es una región V híbrida que es miembro de una biblioteca que comprende diferentes regiones V híbridas.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la región variable procede de la cadena pesada del anticuerpo de referencia.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la región variable procede de la cadena ligera del anticuerpo de referencia.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el anticuerpo es un fragmento Fv, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, o un scFv.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que los anticuerpos son expresados y secretados en forma soluble de una célula anfitriona y se unen a un antígeno, opcionalmente en el que la célula anfitriona es una célula procariota, una levadura o una célula de mamífero.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que los anticuerpos se manifiestan en una célula, una espora o un virus.

5

Figura 1

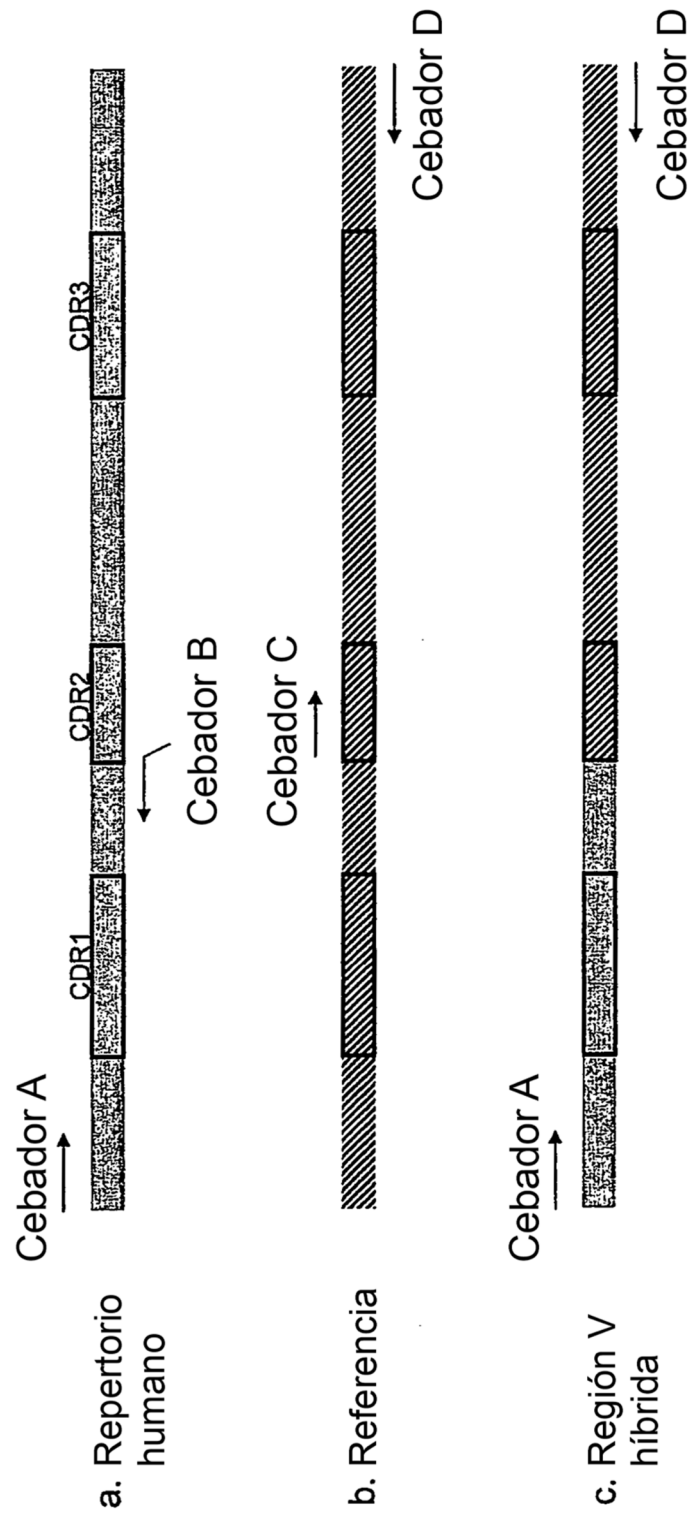


Figura 2

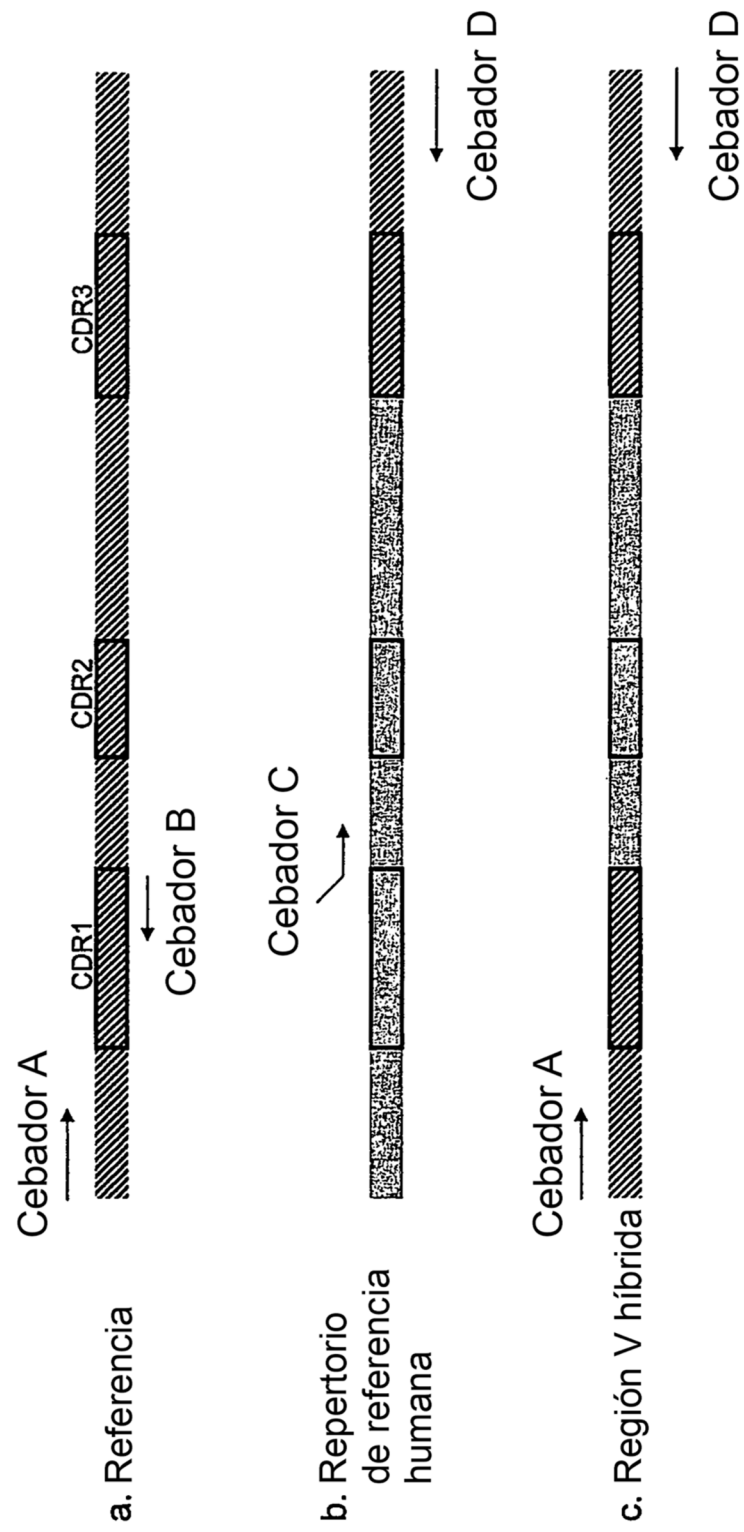


Figura 3

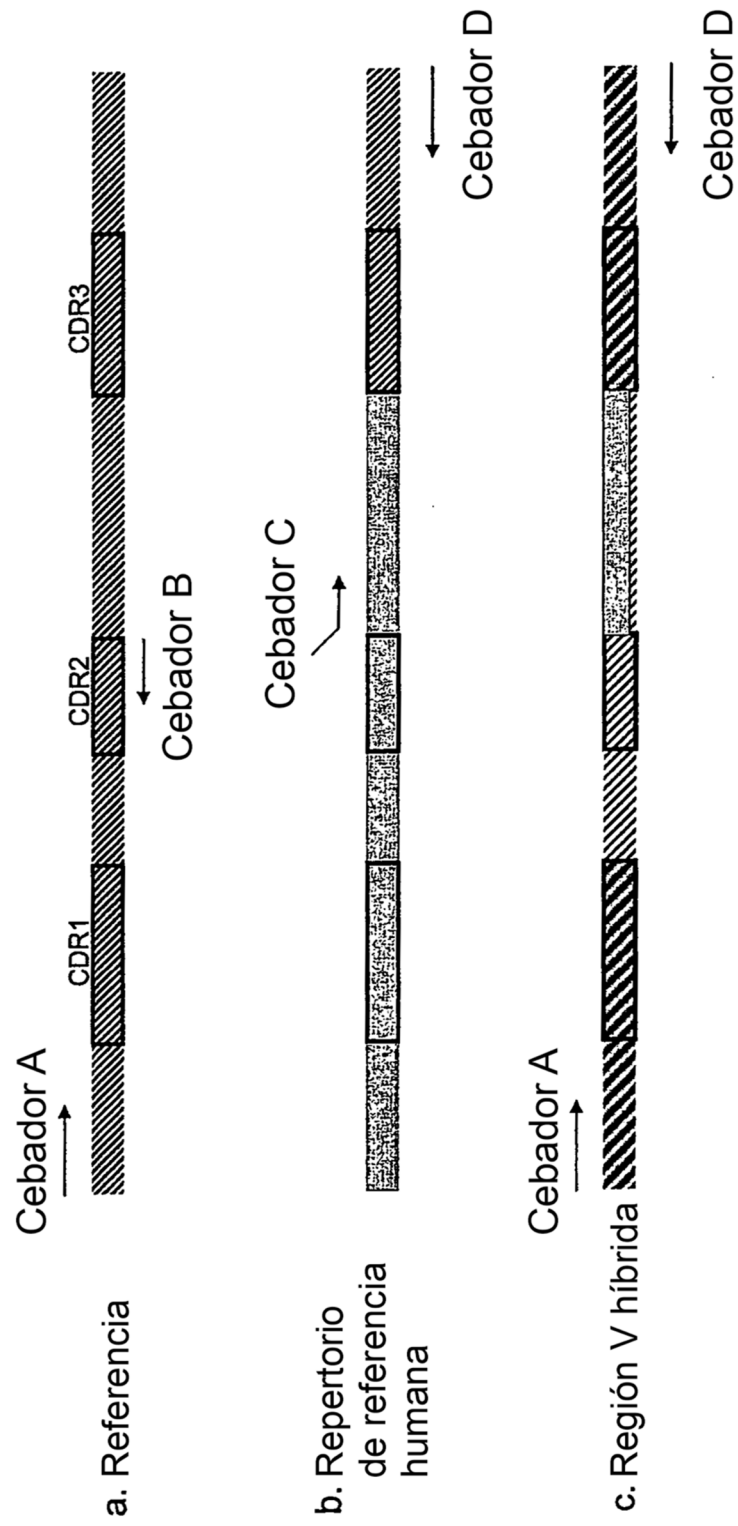


Figura 4

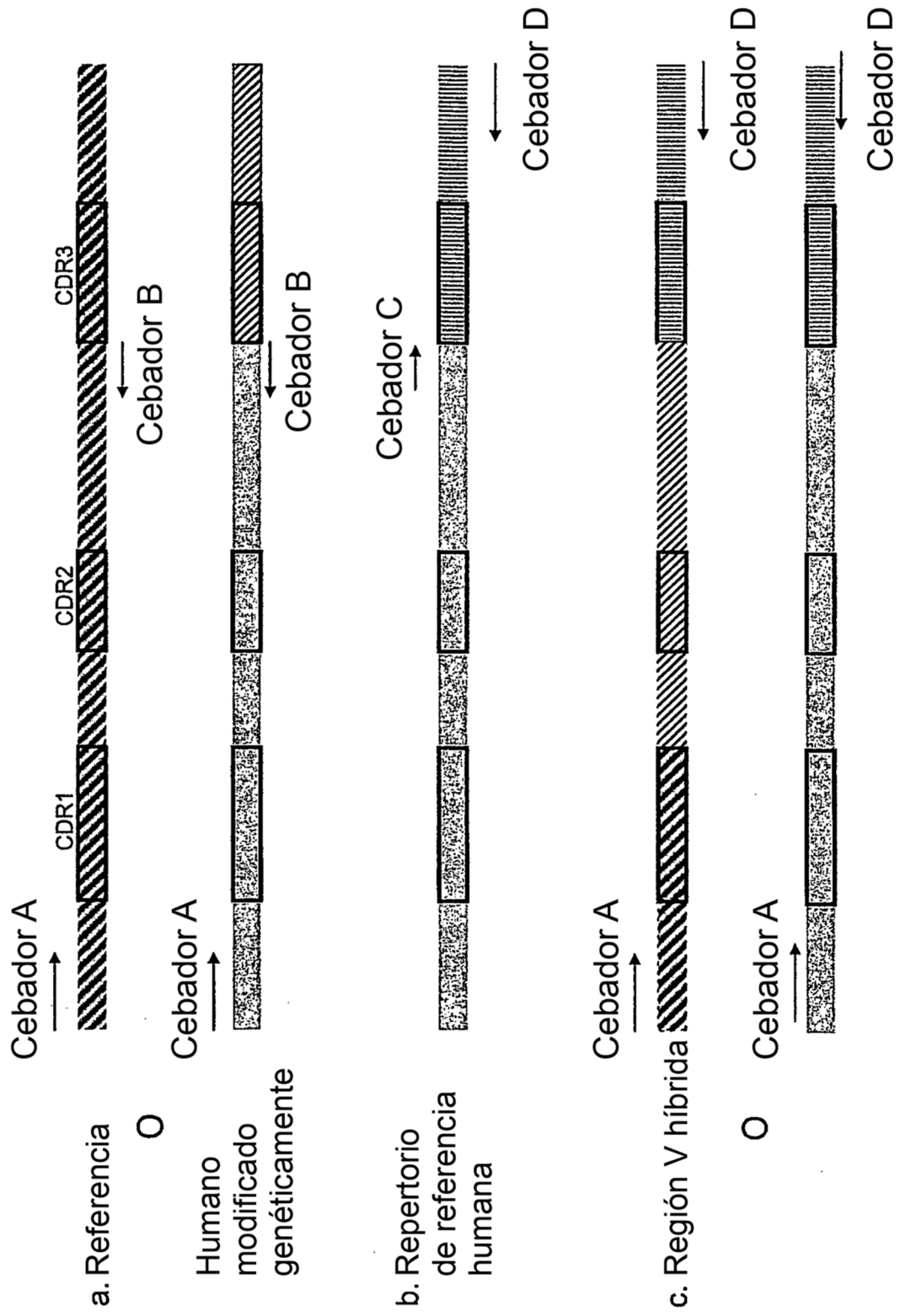


Figura 5

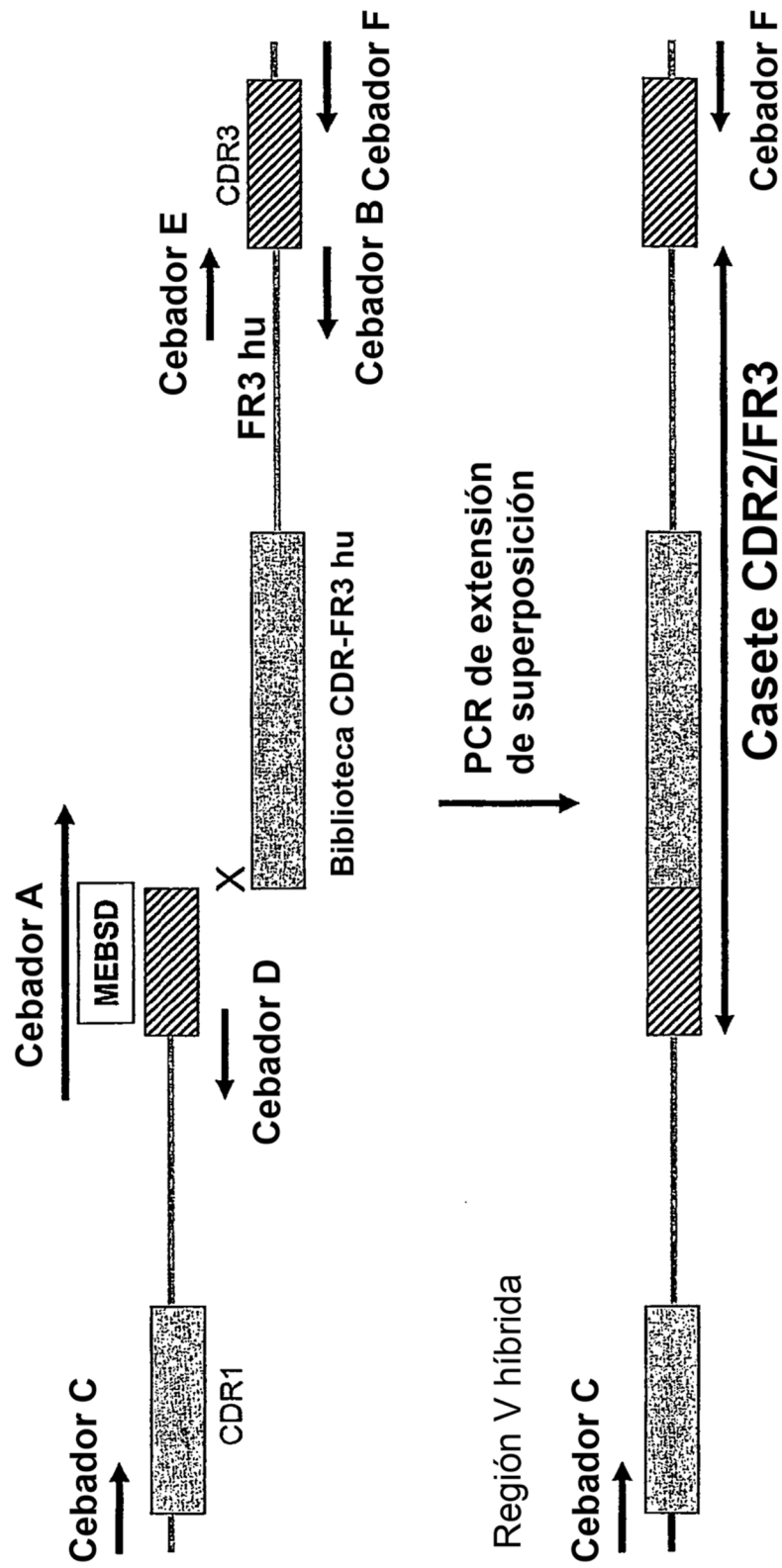


Figura 6

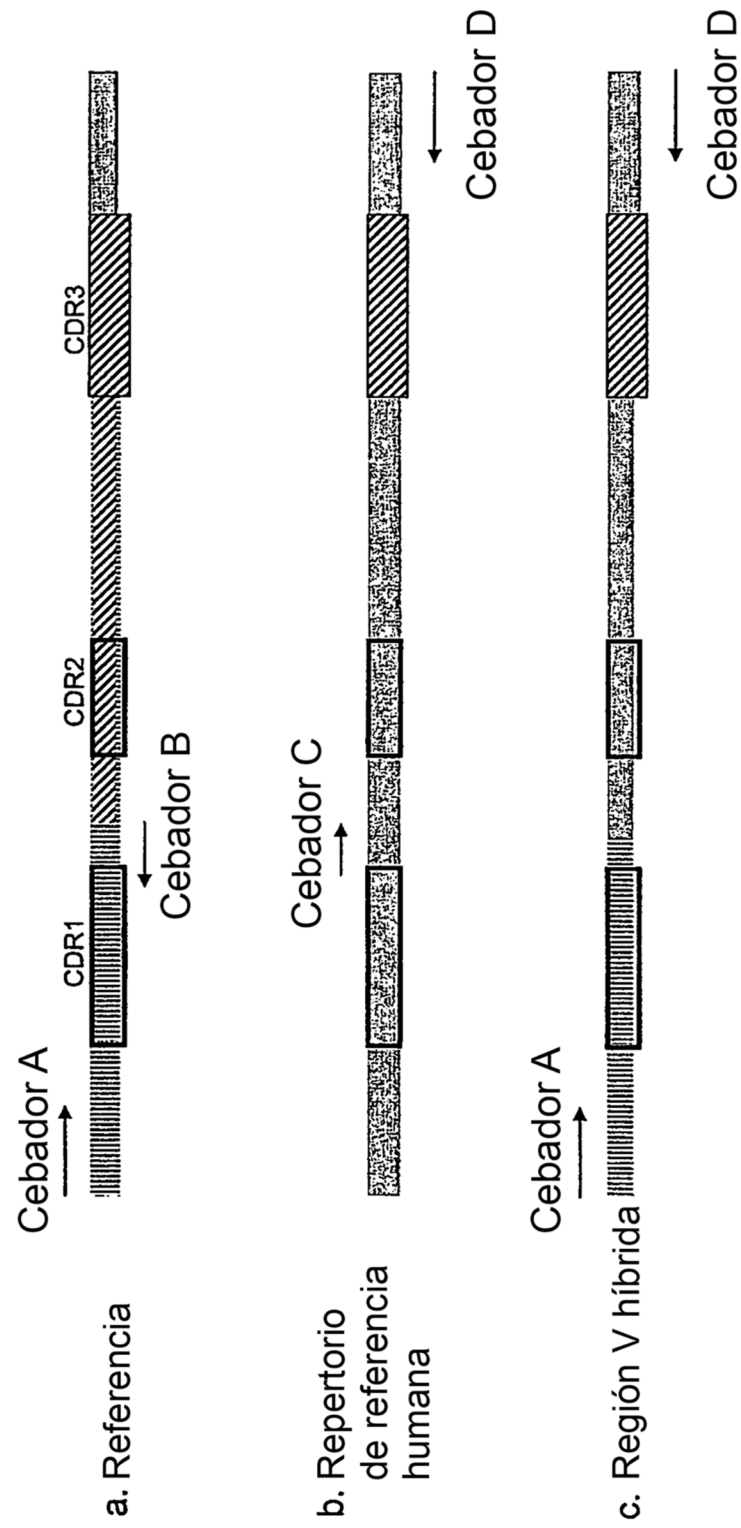


Figura 7

