

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 746 559

 (51) Int. Cl.:

 C07K 16/00
 (2006.01)

 A61K 39/395
 (2006.01)

 C12N 15/13
 (2006.01)

 C40B 40/10
 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacion	nal: 27.01.2	012 PCT/CA201	2/000126
87 Fecha y número de publicación internacional:	02.08.2012	WO12100343	
96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	27.01.2012	E 12738867 (6)	
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea:	17.07.2019	EP 2668206	

54 Título: Modificación genética de dominios de inmunoglobulina

(30) Prioridad:

28.01.2011 US 201161437174 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 06.03.2020

73 Titular/es:
NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA (100.0%) 1200 Montreal Road Building M-58 Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA
72 Inventor/es:
KIM, DAE YOUNG y TANHA, JAMSHID
74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

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

Modificación genética de dominios de inmunoglobulina

5 Campo de la invención

> La presente invención se refiere a la modificación genética de dominios de inmunoglobulina. Más específicamente, la presente invención está dirigida a la modificación genética de dominios de inmunoglobulina para mejorar las propiedades biofísicas de la inmunoglobulina.

10 Antecedentes de la invención

La estabilidad de la proteína juega un papel importante en terapéutica de proteínas, ya que las proteínas inestables conducen a una disponibilidad terapéutica variable y efectos fisiológicos impredecibles in vivo (Horwich, 2002: Wetzel, 15 1988; Mitraki y King, 1992; Worn y Pluckthun, 2001; Hurle et al., 1994). En el campo de la terapéutica de anticuerpos, los anticuerpos humanos convencionales y los fragmentos de anticuerpo son o bien muy grandes y/o tienen propiedades biofísicas deficientes, tales como baja estabilidad, desarrollo irreversible y baja expresión; por lo tanto, tienen aplicaciones clínicas limitadas. Los anticuerpos de un solo dominio "naturales" (sdAb), por ejemplo, V_HH de camélidos, V_{NAR} de tiburón, no tienen los problemas mencionados anteriormente, aunque son inmunogénicos debido

20 a su naturaleza no humana.

Los sdAb completamente humanos, por ejemplo, VH o VL, serían moléculas ideales para la terapia humana debido a su menor (o carencia de) inmunogenicidad esperada; sin embargo, son propensos a la agregación debido a su baja estabilidad y solubilidad (Ward et al., 1989; Davies y Reichmann, 1994; Davies y Riechmann, 1995; Tanha et al., 2001; 25 Kazlauskas y Bornscheuer, 2009; Holliger y Hudson , 2005; Hoogenboom, 2005). Esto limita sus aplicaciones en la terapia humana. Dada la importancia de los anticuerpos estables como moléculas terapéuticas, no es sorprendente que se hayan realizado esfuerzos para seleccionar anticuerpos de dominio único más estables/solubles (Davies y Riechmann, 1996a; Jespers et al., 2004; To et al., 2005; Tanha et al., 2006; Arbabi-Ghahroudi et al., 2009a; Arbabi-Ghahroudi et al., 2009b; Arbabi-Ghahroudi et al., 2010).

30

Un método típico para mejorar la estabilidad de sdAb es usar un sdAb como andamio para generar una biblioteca de visualización que comprende cientos de millones de variedades de sdAb, cada una con una especificidad única; los aglutinantes (sdAb) se seleccionan luego contra los antígenos objetivo mediante técnicas de barrido. En un enfoque de este método, el andamio progenitor se modifica primero genéticamente para que no se agregue y luego la biblioteca

- 35 se construye con base en el andamio que no se agrega; dado que se asume que los sdAb de la progenie en la biblioteca en general "hereda" la propiedad de no agregación de el andamio progenitor, se realiza un barrido convencional basado solamente en el criterio de afinidad para seleccionar los sdAb que no se agregan. En un segundo enfoque, el andamio progenitor puede o no agregarse, y las bibliotecas de la misma se escanean con base en criterios de afinidad y no agregación. Independientemente del enfoque, los sdAb agregados y no agregados se seleccionan
- 40 conjuntamente; en muchos casos, los sdAb que se agregan dominan el proceso de selección, o los aglutinantes seleccionados tienen niveles bajos de solubilidad, estabilidad y expresión. Además, se pierden varios anticuerpos V_H durante la selección por afinidad, donde se producen grandes intervalos de sustituciones de aminoácidos para desestabilizar los V_H que conducen a la agregación (Kazlauskas y Bornscheuer, 2009; Bloom et al., 2006). Estos factores hacen que la selección de sdAb sin agregación sea tediosa y laboriosa y, a veces, desalentadora. 45

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de anticuerpos que no se agreguen, solubles y estables.

Sumario de la invención

- 50 La invención se define por las reivindicaciones y cualesquiera otros aspectos o realizaciones establecidos en este documento que no entren dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para información. La presente invención se refiere a la modificación genética de dominios de inmunoglobulina. Más específicamente, la presente invención está dirigida a la modificación genética de dominios de inmunoglobulina para mejorar las propiedades biofísicas de la inmunoglobulina.
- 55

La presente invención proporciona una composición que comprende un andamio de inmunoglobulina, comprendiendo dicho andamio de inmunoglobulina uno o más de un enlace disulfuro no canónico en la región marco (FR), así como métodos para preparar y usar las composiciones. En una realización, el andamio de inmunoglobulina puede ser una VL; la VL puede ser de la familia kappa o lambda. En una realización, el andamio de inmunoglobulina es humana. En

- 60 una realización, el andamio de inmunoglobulina es humanitaria. En una realización, el andamio de inmunoglobulina es de camélido. En una realización, la especie de camélido se selecciona del grupo que consiste en llama, alpaca y camello.
- En el andamio de inmunoglobulina como se describió anteriormente, el uno o más de un enlace disulfuro no canónico 65 puede formarse entre cisteínas introducidas por mutaciones en FR2 y FR3. En el caso en el que el andamio de inmunoglobulina sea una VL, la invención proporciona un método para elaborar el andamio en la que los residuos de

Cys pueden introducirse en cualquiera de las posiciones 46-49 y cualquiera de las posiciones 62-66, con base en la numeración de Kabat. En una realización, los residuos de Cys pueden introducirse en las posiciones 48 y 64, con base en la numeración de Kabat.

- 5 El andamio de inmunoglobulina descrita en el presente documento puede comprender una secuencia de polipéptidos que comprende al menos dos residuos de Cys no canónicos introducidos en las regiones marco FR2 y FR3 de una región variable de anticuerpo. En una realización, el polipéptido comprende un residuo de Cys en una posición seleccionada de los residuos 46 a 49 de regiones FR2 de V_L y un residuo de Cys en una posición seleccionada de los residuos 62 a 66 de regiones FR3 de V_L de un dominio sdAb de V_L.
- 10 En una realización, el dominio de V_H de la invención comprende un fragmento de sdAb. En una realización, la invención proporciona una biblioteca de expresión que comprende el fragmento de sdAb de V_H de la invención, en el que los fragmentos de sdAb de la invención comprenden una multiplicidad de secuencias de CDR. En una realización, la posición de las regiones CDR de un fragmento de sdAb de V_H de la invención seleccionado del grupo de las SEQ ID
- 15 NOs: 2, 4, 6 y 8 están en las posiciones proporcionadas en la Figura 1A y las seleccionadas del grupo de SEQ ID NOs : 70 a 83 están en la posición prevista para las secuencias de tipo silvestre correspondientes en la Figura 2 de la publicación PCT WO2006/099747.
- En una realización, el polipéptido comprende al menos un residuo de Cys en la posición 48 y al menos un residuo de
 Cys en la posición 64 de un dominio de V_L. En una realización, el dominio de V_L de la invención comprende un fragmento de sdAb. En una realización, la invención proporciona una biblioteca de expresión que comprende el fragmento de sdAb de V_L de la invención, en el que los fragmentos de sdAb de la invención comprenden una multiplicidad de secuencias de CDR. En una realización, la posición de las regiones CDR de un fragmento de sdAb de V_L de la invención seleccionado del grupo de las SEQ ID NOs: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 están en las posiciones proporcionadas en la Figura 1B.

En una realización, los residuos de CDR de los polipéptidos de la invención pueden estar en cualquier secuencia adecuada y pueden tener un número variable de residuos distinto del número proporcionado en las Figuras 1A y 1B.

30 En una realización, el polipéptido de inmunoglobulina de la invención comprende la región de el andamio de una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGDTVSDESMTWVRQAPGKGLEWVCAISSSGGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVTDNRSCQTSLCTSTTRSWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:2);

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGVTLSPECMAWVRQAPGKGLEWVCAISSSGGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVSCEGENAFWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:4);

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGYTVSSECMGWVRQAPGKGLEWVCAISSSSGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDSKNCHDKDCTRPYCSWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:6);

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGFSVISESMTWVRQAPGKGLEWVCAISSSGGSTYYADSVKGRFTCS RDNSKNTVHLQMNSLRAEDTAVYYCAAKKIDGARYDYWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:8);

40

45

35

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPKLLCFAASTLQSGVPSRFSCSGSGTDF TLTISNLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGHGTKVTVL (SEQ ID NO:10);

EIVLTQSPTTLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLAWYQQRPGQAPRLLCFDTSNRAPGVPARFSCRGSGTLF TLTISSLEPEDSAVYFCQQRSSGLTFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:12);

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSSLAWYQQKPGQAPRLLCYGTSNRATGIPDRFSCSGSGT HFTLTINRLEPGDFAVYYCQQYGSSPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:14);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTDLDWFQQRPGRAPHRLCYGASSLQGGVPSRFSCSGSGTE FTLTISGLQPEDFATYYCLQHHTYPRTFGLGTKVTVL (SEQ ID NO:16); EIVMTQSPVTLSLSPGERATLSCRASQSVGTSLAWYQQKPGQAPRLLCYDASNRATGISARFSCSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQRYNWPRTFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:18);

ETTLTQSPATLSVSPGERATFSCRASQSVSNNLAWYQQKPGQAPRLLCYGASSRTTGIPDRFSCSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDTSPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:20);

5

QSVVTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSSYNIGENSVSWYQQLPGTAPKLLCYGNDKRPSGIPDRFSCSKSGTS ATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSNLRASVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:22);

ETTLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRNNLAWYQQRPGQAPRLLCYGASTRATGIPARFSCSGSGTD FTLTISSLQVEDVAVYYCQQYYTTPKTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:24),

- 10 o secuencias sustancialmente idénticas a las mismas, con la condición de que la secuencia sustancialmente idéntica, retenga tanto los enlaces disulfuro canónicos como no canónicos, y en la que la secuencia en las regiones de las CDR puede ser cualquier secuencia adecuada y puede tener un número adecuado pero variable de residuos en cada una de CDR1, CDR2 y CDR3. En el caso de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14,16, 18, 20, 22 y 24, los residuos que comprenden las CDR son como se proporcionan en las Figuras 1A y 1B.
- 15

La solicitud describe además el polipéptido de inmunoglobulina que comprende la región de el andamio de una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGSGGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEPRSVSGLRGVVDSWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:70)

20

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGSGGSTYYADSVKGRFT CSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGTDMEVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:71)

QLQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGSGGSTYYADSVKGRFT CSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGKGGSSGYDHPDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:72)

QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGSGGSTYYADSVKGRFT CSRDNSKNSLYLQMNSLGAEDTAVYYCARSWSGSSYGGDLDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:73)

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISSSGGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVREEYRCSGTSCPGAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:74)

EVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFTFINYAMSWVRQAPDKGLDWVCTISNNGGATYYADSVKGRFTC SRDNSNNTLYLQMNSLRPDDTAVYYCAKGPINTGRYGDWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:75)

30

25

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGGGDHTYYADSVKGRFT CSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGMVRGVSSAPFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:76)

EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVCGISGSGASTYYADSVKGRFT

QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWFRQAPGKGLEWVCFIRSKAYGGTTEYAASVKGRF TCSRDDSKSIAYLQMNSLRAEDTAMYYCARRAKDGYNSPEDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:78)

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMTWVRQAPGKGLEWVCRIKTKTDGGTTDYAAPVKGR FTCSRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDRDHSSGSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:79)

DVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCTASGFPFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVCRITSKTDGGTTDYVAPVKGR FTCSRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDQANAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:80)

5

QMQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSRMSWFRQAPGMGLEWVCVIYSGGSTYYADSVRGRFSC SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAREREGAVTREDWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:81)

QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGKGLEWVCFIYSGGSTYYADSVKGRFTCS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVGGGAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:82)

10

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIVDGYAMHWVRQAPGQGLEWVCVTNNGGSTSYADSVKGRFT CSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSITGPTGAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:83)

o secuencias sustancialmente idénticas a las mismas, o fragmentos de las mismas, con la condición de que la secuencia sustancialmente idéntica, o fragmento de la misma, conserve tanto los enlaces disulfuro canónicos como no canónicos, y en la que la secuencia en las regiones de las CDR puede ser cualquier secuencia adecuada y puede tener un número adecuado pero variable de residuos en cada una de las CDR1, CDR2 y CDR3. En el caso de las SEQ ID NOs: 70 a 83, los residuos que comprenden las CDR son como se proporcionan en los clones de tipo silvestre correspondientes como se proporciona en la Figura 2 de la publicación PCT WO2006/099747.

La presente invención también abarca una biblioteca recombinante que codifica una diversidad de dominios variables, comprendiendo los dominios variables una multiplicidad de CDR que comprenden una variedad de secuencias y longitudes adecuadas intercaladas por las regiones marco de un andamio que comprende los residuos de Cys-Cys no canónicos de la invención como se describe en el presente documento. En una realización, la biblioteca recombinante comprende secuencias de mamíferos. En una realización, la biblioteca recombinante comprende secuencias de mamíferos. En una realización, la biblioteca recombinante comprende secuencias de nun realización, la biblioteca recombinante comprende secuencias de mamíferos.

biblioteca recombinante comprende una diversidad de secuencias que, una vez seleccionadas, opcionalmente se maduran y/o humanizan.

La presente invención también proporciona un método para mejorar la estabilidad de los anticuerpos de un solo dominio, que comprende introducir uno o más de un enlace disulfuro no canónico en las regiones marco.

La presente invención proporciona métodos para modificar genéticamente dominios de V_L con estabilidad mejorada. La formación de un enlace o enlaces disulfuro adicionales en los dominios de V_L mediante la introducción de un par o pares de Cys en ubicaciones específicas se muestra en le presente documento para transformar V_H y V_L en dominios

- 35 altamente no agregados, solubles, estables y expresables. Específicamente, estas propiedades ventajosas se obtienen cuando los residuos dentro de las regiones FR2 y FR3 se reemplazan de manera que se introduzca un par de Cys en las posiciones de aminoácidos 48 y 64 para V_L (numeración de Kabat). La espectrometría de masas confirmó la formación de enlaces disulfuro entre los residuos no canónicos introducidos en los mutantes de Cys. Todos los mutantes de Cys modificados de esta manera, es decir, que contienen el puente disulfuro no canónico mencionado,
- 40 no mostraron expresión adversa en *E. coli*, no hubo cambios conformacionales adversos como se muestra por las mediciones de unión de resonancia de plasmón superficial ("SPR") y mostraron disminución o falta de agregación. Además, todos los mutantes tenían una estabilidad drásticamente más alta, con temperaturas de fusión de al menos 11 °C más altas que las de sus contrapartes de tipo silvestre. Los datos actuales demuestran que la estabilización de los marcos del dominio de V_L mediante la introducción de dicho enlace disulfuro en un andamio de V_L, o ambos, puede
- 45 mejorar su resistencia a la proteasa. Las bibliotecas de V_L basadas en los andamios modificados genéticamente de la presente invención pueden prepararse para identificar V_L estables y no agregadas que se unen a moléculas objetivo específicas. Se pueden usar varias bibliotecas de despliegue conocidas en la técnica para expresar los constructos de V_L de la invención. En una realización, la biblioteca es una biblioteca de anticuerpos de un solo dominio ("sdAb").
- 50 La presente invención proporciona un enfoque novedoso que puede (i) convertir sdAb que se agrega en sdAb que no se agrega; (ii) aumentar la eficiencia de la obtención de sdAb que no se agrega a partir de bibliotecas de sdAb; (iii)

aumentar adicionalmente la estabilidad, por ejemplo, la temperatura de fusión, la eficiencia de replegamiento, la resistencia a proteasas y el nivel de expresión de sdAb. La provisión de andamios V_L con estas características puede permitir la recuperación de intervalos más amplios de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos; la retención de un alto grado de no agregación y estabilidad puede conducir al aislamiento de nuevos anticuerpos que de otro modo podrían perderse durante el proceso de selección de anticuerpos. Además, las características biofísicas mejoradas pueden permitir que la V_L sea ampliamente aplicable en el campo terapéutico e industrial.

Breve descripción de los dibujos

5

10 Estas y otras características de la invención se describirán ahora a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra los andamios primarias de V_H, V_L y los mutantes de Cys correspondientes. La Figura 1A muestra la numeración y la designación de CDR de V_H (SEQ ID NOs: 1-38) usando el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., 1991). Los residuos (Ser 49 e IIe 69) actualmente reemplazados por cisteínas están marcados con un sombreado gris. La Figura 1B muestra la numeración y la designación de CDR de V_L usando la numeración de Kabat. Los residuos (Ile/Val 48 y Gly/Ala 64) actualmente reemplazados por cisteínas están marcados con un sombreado gris. "FR" indica regiones marco, CDR, regiones determinantes de complementariedad, de V_H y V_L.

- La Figura 2A muestra los perfiles de elución de V_H de la purificación de IMAC (cromatografía de afinidad con metal inmovilizado). Las V_H de tipo silvestre y mutante se indican mediante líneas punteadas y continuas, respectivamente. Los picos que eluyen en o después de 20 mL contienen V_H purificadas. La Figura 2B muestra SDS-PAGE no reductora con V_H mutantes y de tipo silvestre purificadas por IMAC (se muestran los pares HVHAm302/HVHAm302S y HVHPC235/HVHPC235S como ejemplos). Las flechas marcan las especies diméricas de HVHAm302. "M" en el gel SDS-PAGE indica el carril cargado con estándares de proteínas.
 - La Figura 3A es un dibujo esquemático de péptidos trípticos (SEQ ID NOs: 25-36, véase también la Tabla 2) de V_H por el análisis de espectrometría de masas. Los enlaces disulfuro que conectan un par de Cys se muestran mediante
- Iíneas. Los puntos continuos marcan las cisteínas (C) introducidas en las posiciones 49 y 69. Solo se muestran los péptidos principales que portan enlaces disulfuro modificados genéticamente nativos canónicos (presentes en el tipo silvestre y mutantes) o no canónicos (presentes únicamente en mutantes). Los sitios de digestión con tripsina (terminal C de Lys y Arg) están en negrita. El perfil reductor de SDS-PAGE muestra que las V_H han sido digeridas con éxito mediante tripsina en péptidos pequeños (comparar "+Tripsina" con "-Tripsina"). "M" en el gel SDS-PAGE indica el carril cargado con estándares de proteína. La Figura 3B es un espectro de disociación inducida por colisión (CID)-MS² del
- 35 ion m/z 964,04 (3+) del péptido enlazado por disulfuro modificado genéticamente, GLEWVCAISSSGGSTYYADSVK (P1) (T44-T64)-FTCSR (P2) (T67-T71) (Cys49-Cys69) (SEQ ID NOs: 29 y 30) de la digestión tríptica de HVHAm302S. Los dos péptidos (b₁6+P2 y y₁17+P2) que portan el enlace disulfuro se anotaron en los picos de MS (espectrometría de masas) y se marcaron con asteriscos. Los datos relacionados se presentan en la Tabla 2. La Figura 3C es un espectro CID-MS² del ion del péptido enlazado por disulfuro a m/z 1042,66 (6+) del péptido tríptico HVLP324S
- 40 correspondiente al péptido enlazado por disulfuro LLCFAASTLQSGVPSR (P1) (SEQ ID NO: 43), FSCSGSGTDFTLTISNLQPEDFATYYCQQSYSTPR (P2) (SEQ ID NO: 44) y VTITCR (P3) (SEQ ID NO: 42) que se observó a partir de la inspección del cromatograma de LC-MS. Se observaron iones del fragmento y muy informativos a partir de P2 con P3 como una modificación a través de un enlace disulfuro. También se observó una serie del ión y casi completa de P1. El enlace disulfuro se confirmó adicionalmente mediante un espectro ETD-MS² del ion del péptido
- 45 [M + 5H]⁵⁺ a m/z 1250,99 (5+) del mismo péptido enlazado por disulfuro de HVLP324S a través del cual se observaron todos los iones P1, P2 y P3 intactos a m/z 691,47 (1+), 1648,86 (1+) y 1956,85 (2+), respectivamente, en cantidades relativamente altas tras la disociación de los enlaces disulfuro de los tres fragmentos de péptidos mediante el ETD (datos no mostrados).
- 50 La Figura 4A muestra cromatogramas de exclusión por tamaño de dominios de V_H y sus correspondientes versiones mutantes de Cys (HVHAm302/HVHAm302S, HVHAm427/HVHAm427S, HVHAm431/HVHAm431S y HVHPC235/HVHPC235S). La Figura 4B muestra cromatogramas de exclusión por tamaño de 4 dominios de V_H mutantes de Cys adicionales (HVHP414S, HVHP420S, HVHP426S y HVHP429S). Anteriormente se demostró que las versiones de tipo silvestre correspondientes eran monómeros no agregados (To et al., 2005). La Figura 4C muestra
- 55 cromatogramas de exclusión por tamaño de dominios de V_L humanos y sus versiones mutantes de Cys. Para cada cromatograma en las Figuras 4A, B y C, se restó la absorbancia de fondo y se normalizaron todos los picos con respecto al pico monomérico (mostrado por las puntas de flecha) que se ajustó al 100%. Los picos a la izquierda de los picos monoméricos se consideraron como picos agregados.
- 60 La Figura 5 muestra el despliegue térmico de las V_H. Las V_H mutantes de tipo silvestre y Cys se marcaron con símbolos rellenos y sin relleno, respectivamente (HVHAm302 y HVHAm302S (cuadrado); HVHAm431 y HVHAm431S (círculo); HVHPC235 y HVHPC235S (triángulo)). Las temperaturas de despliegue de punto medio calculadas, T_m, de V_H se registran en la Tabla 4.
- 65 La Figura 6 muestra el despliegue térmico de V_L de tipo silvestre (Figura 6A) o mutante de Cys (Figura 6B). Las T_m calculadas se registran en la Tabla 4. En la Figura 6C, las curvas de despliegue térmico de HVLP389 y HVLP325, que

tenían las Tm más bajas y más altas, respectivamente, se compararon lado a lado con sus versiones mutantes de Cys, HVLP389S y HVLP325S.

La Figura 7 muestra el análisis de unión SPR de VH contra la proteína A inmovilizada. En la Figura 7A, la concentración 5 de cada V_H en µM fue la siguiente: 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,35 (HVHAm302); 0,2; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 y 3,88 (HVHAm427); 0,5; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,81 (HVHAm431); 0,01; 0,01; 0,02; 0,05; 0,25; 0,25; 0,5; 1,0 y 2,5 (HVHAmC235); 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 5,4 y 8,22 (HVHAm302S); 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,0 y 3,08 (HVHAm427S); 0,5; 1,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,5; 10,0 y 13,3 (HVHAm431S); 0,025; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,4; 0,8; 0,8; 0,8; 1,5; 1,5; 3,0; 6,0 y 9,9 (HVHAmC235S). Las KD calculadas se registran en la Tabla 4. RU, Unidad de resonancia. La Figura 7B es un diagrama de velocidad cinética con un diagrama de diagonales de isoafinidad para las VH de tipo silvestre y mutantes. Las 10 velocidades cinéticas (kasociación y Kdisociación) determinadas por los análisis SPR se trazan en un plano bidimensional en

escala logarítmica, de modo que las V_H ubicados en la misma línea diagonal tienen valores de K_D idénticos.

La Figura 8 muestra los sensogramas de Biacore de las VL para la proteína L. inmovilizada. En la Figura 8A, la 15 concentración de cada V_L fue la siguiente: 0,2; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 5 y 10 µM (HVLP389, HVLP351 y HVLP364); 1; 2; 3; 5; 7,5 y 10 nM (HVLP342); 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 5 y 10 µM (HVLP335); 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2 y 5 µM (HVLP325); 0,2; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3 y 5 µM (HVLP3103) y 1; 2; 4; 6; 8 y 10 nM (HVLP324). Los sensogramas para las uniones de HVLP324 y HVLP342 al sitio de baja afinidad de la proteína L no están incluidos; aunque las K_D calculadas se registran en la Tabla 4. En la Figura 8B, la concentración de los V_L mutantes de Cys fue: 0,05; 0,1; 0,2; 0,2; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4 y 7 µM (HVLP389S); 0,1; 0,2; 0,2; 0,4; 0,6; 1; 2; 4; 6 y 8 µM (HVLP335S); 0,05; 0,1; 0,2; 0,2; 0,4; 0,6; 1; 2; 4 y 6 µM 20

- (HVLP351S); 0,1; 0,2; 0,2; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 7 y 10 μM (HVLP3103S); 4; 8; 8; 16; 32; 64; 120; 240 nM (HVLP324S); 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,5; 3; 6; 12 µM (HVLP325S); 2; 4; 8; 16; 16; 32; 64; 120; 240 nM (HVLP342S). Las K_D calculadas se registran en la Tabla 4.
- 25 La Figura 9 muestra la resistencia a la GI proteasa (pepsina, quimotripsina y tripsina) de las V_L. La Figura 9A compara los perfiles de resistencia a la proteasa de las VL de tipo silvestre (círculos sin relleno) con aquellos de las VL mutantes de Cys (círculos con relleno) en diferentes relaciones de proteasa a proteína. En la Figura 9B, se muestra un gráfico del % de resistencia a la proteasa frente a la T_m para V_L de tipo silvestre (círculos sin relleno) frente a mutantes de Cys (círculos con relleno).
- 30

La Figura 10 muestra el dibujo esquemático del vector fd-tetVL24S. Un gen HVLP324S que porta una secuencia enlazadora en su extremo 3' se preparó mediante PCR, se digirió con enzimas de restricción ApaLI y Notl y posteriormente se clonó en ADN del fago fd-tetGIIID (Tanha et al., 2001) que se linealizó mediante enzimas de restricción ApaLI y Notl. Esto coloca a HVLP324S con el enlazador entre las secuencias guía del gen III del fago y del

- 35 marco de lectura abierto del gen III. La secuencia enlazadora de ADN codifica un polipéptido GSGSKAAA (SEQ ID NO: 86) en el que el residuo de lisina proporciona un sitio de escisión de tripsina (marcado con una flecha). Esto permite eluir los fagos unidos de los antígenos objetivo mediante la adición de tripsina después de la etapa de unión en el barrido de bibliotecas de despliegue en fagos de anticuerpos.
- 40 La Figura 11 muestra la construcción de una biblioteca HVLP324S sintética. La secuencia de aminoácidos de HVLP324S (SEQ ID NO: 10), un andamio de V_L humana usada para la construcción de la biblioteca, se numeró de acuerdo con el sistema Kabat (Kabat et al., 1991). Se subrayaron las posiciones de aminoácidos en las CDR (1, 2 y 3) a ser aleatorizadas. Los residuos de Cys no canónicos se marcaron con puntos. Los codones de HVLP324S en las CDR seleccionadas para mutagénesis in vitro se muestran junto con sus codones de aleatorización correspondientes.
- 45 La posición del aminoácido 28 (en CDR1) estaba restringida a los codones de Ser o Gly (mostrados como RGC) y la posición 54 (en CDR2) estaba restringida a los codones de Arg o Leu (mostrados como CKN). Para la mutagénesis de CDR3, se usaron 3 oligonucleótidos con varias longitudes (VL24-CDR3/3a/3b; véase la Tabla 6, Ejemplo 8), creando longitudes de CDR3 de 9, 10 u 11 aminoácidos. De conformidad con la nomenclatura IUPAC, las siguientes letras se usaron para designar ácidos nucleicos degenerados en varias posiciones dentro de los oligonucleótidos, en los que
- 50 N: nucleótidos A, T, G o C; R: nucleótidos A o G; K: nucleótidos T o G.

La Figura 12 muestra la selección de fagos de las VL que se unen a lisozima humana. La frecuencia (%) de las VL de lisozima antihumana seleccionada de barridos de fagos (ronda 3 y 4) bajo dos condiciones de selección diferentes (temperatura ambiente y 65 °C - 2 h) se mostró mediante columnas rectangulares grises o negras, respectivamente.

55

La Figura 13 muestra secuencias de aminoácidos de las V_L de lisozima antihumana y albúmina de suero antihumana. Las secuencias de aminoácidos de HVLP324S (SEQ ID NO: 10) se alinean con 8 VL de lisozima antihumana y 1 VL de albúmina de suero antihumano seleccionadas para análisis biofísico detallado. Las CDR y las FR se designaron mediante numeración de Kabat (Kabat et al., 1991).

60

La Figura 14 muestra el estado de no agregación y la termoestabilidad de las V_L de lisozima antihumana. (A) Cromatografía de exclusión por tamaño Superdex^{MR} 75 (SEC) de las V_L de lisozima antihumana y de albúmina de suero antihumana. Para cada cromatograma, se restó la absorbancia de fondo y se normalizaron todos los picos con respecto al pico monomérico (puntas de flecha) que se ajustó al 100%. Los picos a la izquierda del pico monomérico se consideran como un pico de agregación. Los valores de % de agregación y % de monómeros se calcularon mediante la integración del área de los cromatogramas como se describió. (B) Curvas de transición de despliegue

térmico de las V_L de lisozima antihumana y de albúmina de suero antihumano. El gráfico de la fracción plegada frente a la temperatura se obtuvo como se describió anteriormente. Las temperaturas correspondientes al punto medio de las curvas de transición no desplegadas ($F_{0,5}$) se tomaron como las temperaturas de fusión (T_m). El intervalo de T_m se muestra con una flecha de doble punta. (C) Una curva de correlación de T_m versus % de monómero. Los datos fueron graficados se analizaron con Graphpad Prizm (versión 4.02).

La Figura 15 muestra el análisis de SPR de las V_L de lisozima antihumana. Los sensogramas de Biacore que muestran la unión de las V_L de lisozima humana a lisozima antihumana inmovilizada a diversos intervalos de concentraciones indicadas en cada sensograma: 10, 25, 25, 100, 200, 200, 500, 750 y 2000 nM para HVLHLAQ; 100, 250, 500, 1000, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000 y 10000 nM para HVLHLDS; 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 15000 y 20000 nM

- 10 1000, 2500, 5000, 7500, 10000 y 10000 nM para HVLHLDS; 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 15000 y 20000 nM para HVLHLEM; 10, 25, 50, 100, 250, 250, 500, 750 y 1000 nM para HVLHLNE; 50, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1000 y 2500 nM para HVLHLQI; 10, 25, 50, 100, 200, 200, 500, 750 y 1000 nM para HVLHLNN; 100, 250, 500, 750, 1000, 1000 y 2500 nM para HVLHLQI; 10, 25, 50, 100, 200, 200, 500, 750 y 1000 nM para HVLHLRN; 50,100, 250, 500, 1000, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 10000, 15000 y 20000 nM para HVLHLRN; 50,100, 250, 500, 1000, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 10000, 15000 y 20000 nM para HVLHLRN; 50,100, 250, 500, 1000, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 10000, 15000 y 20000 nM
- 15

5

La Figura 16 muestra la purificación por IMAC de las V_L de lisozima antihumana y análisis de SDS-PAGE (A) Perfiles de elución de V_L de lisozima antihumana después de la purificación por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). Los picos eluidos correspondientes a las V_L purificadas están marcados por un cuadro rectangular. mAU, unidad de miliabsorbancia. (B) Perfiles de SDS-PAGE de V_L purificadas por IMAC en condiciones

20 reductoras (+DTT). Las V_L purificadas se dializaron en solución salina regulada con fosfato (PBS) antes del análisis mediante SDS-PAGE. El asterisco denota la V_L que ha perdido su etiqueta His. Los estándares de proteína (carril M) están marcados con sus respectivos pesos moleculares en kDa.

La Figura 17 muestra un análisis de SPR de V_L de albúmina de suero antihumano. Sensograma de Biacore que muestra la unión de V_L de albúmina de suero antihumano a la albúmina de suero humana inmovilizada a diversos intervalos de concentraciones indicados en el sensograma: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,5; 0,75, 1, 1, 2 y 4 μM

Descripción detallada de la invención

- 30 La invención se define por las reivindicaciones y cualesquiera otros aspectos o realizaciones expuestos en el presente documento que no entren dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para información. La presente invención se refiere a la modificación genética de dominios de inmunoglobulina. Más específicamente, la presente invención está dirigida a la modificación genética de dominios de inmunoglobulina para mejorar las propiedades biofísicas de la inmunoglobulina. Se proporcionan composiciones de materia y métodos para elaborar y usar tales composiciones.
- 35

40

La presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido que comprende un andamio de V_L que comprende uno o más de un enlace disulfuro no canónico en la región marco (FR), en la que el enlace disulfuro no canónico proporciona una estabilidad mejorada y no agregación del polipéptido. En una realización, el polipéptido es un andamio de V_L. En una realización, el polipéptido comprende el fragmento de sdAb de un dominio de V_L. El sdAb puede derivarse de una región V_L como se describe en este documento.

El andamio de inmunoglobulina puede ser una región variable de una cadena ligera ("VL"). En una realización, la V_L puede ser de la familia kappa o lambda. En una realización, el andamio de inmunoglobulina es de un animal no humano. En una realización, el animal no humano incluye todos los vertebrados, especialmente los vertebrados seleccionados entre aviares, anfibios, reptiles, mamíferos, camélidos, pollos, ratas, ratones, conejos, cabras, ovejas, vacas, gatos, perros, caballos o primates no humanos. En una realización, el andamio de inmunoglobulina es de humano. En una realización, el andamio de inmunoglobulina es de camélido. En una realización, la especie de camélido se selecciona del grupo que consiste en llama, alpaca y camello. En una realización, el andamio de camélido se deriva de una región V_L.

50

65

En una realización, el andamio de inmunoglobulina es "humanitaria" (también alternativamente denominada "humanizada"), es decir, un sdAb que se originó a partir de una especie distinta a la humana que ha tenido residuos de aminoácidos inmunogénicos o potencialmente inmunogénicos reemplazados por aminoácidos que son menos inmunogénicos o no inmunogénicos en el contexto de un sdAb administrado a un sujeto humano. Cualquier método

- 55 conocido en la técnica para crear anticuerpos humanizados se contempla en la invención, incluyendo pero sin limitarse a la tecnología de humanización de Kalobios. Téngase en cuenta que cuando un andamio se humaniza, un residuo de aminoácido inmunogénico puede ser reemplazado por cualquier otro residuo de aminoácido menos inmunogénico independientemente de si esto constituye o no un cambio conservado de aminoácidos. Se entiende que los andamios humanizados de la invención retienen los residuos de Cys no canónicos descritos en el presente documento, así como
- 60 cualquier enlace disulfuro nativo (canónico).

Como se usa en el presente documento, el término "V_H" o "V_L", también denominado en el presente documento como "dominios de V_H o V_L", se refiere a la región variable de una cadena pesada de anticuerpo o una cadena ligera de anticuerpo, respectivamente. En una realización, el dominio de V_H o V_L está en el formato de un "anticuerpo de un solo dominio" (sdAb). Como se usa en el presente documento, "sdAb" se refiere a un solo dominio de inmunoglobulina que retiene el pliegue de inmunoglobulina; es decir, es un dominio variable en el que hasta tres regiones determinantes de

complementariedad (CDR) junto con hasta cuatro regiones marco (FR) forman el sitio de unión al antígeno. Las CDR del dominio variable de V_H o V_L se denominan en le presente documento como CDR1, CDR2 y CDR3. Las FR del dominio variable de V_H o V_L se denominan en le presente documento como FR1, FR2, FR3 y FR4. Existen varios esquemas para la identificación de las regiones determinantes de la complementariedad, siendo las dos más comunes

- 5 las de Kabat y de Chothia y Lesk. Kabat et al., (1991) definen las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) con base en la variabilidad de secuencia en las regiones de unión a antígeno de los dominios de V_H y/o V_L. Chothia y Lesk (1987) definen los "bucles hipervariables" (H o L) en función de la ubicación de las regiones del bucle estructural en los dominios de V_H y V_L. Como estos esquemas individuales definen CDR y regiones de bucle hipervariables que son adyacentes o se superponen, los expertos en la técnica de anticuerpos a menudo utilizan los
- 10 términos "CDR" y "bucle hipervariable" de manera intercambiable, y pueden usarse así en este documento. La mayoría de la variabilidad de secuencia en dominios variables (V_H o V_L) ocurre en los CDR/bucles; las regiones fuera de los CDR/bucles se denominan regiones marco (FR). Las FR proporcionan integridad estructural al dominio variable y asegura la retención del pliegue de inmunoglobulina. Las FR y CDR/bucles se definen en el presente documento de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., 1991). En una realización, la numeración de las
- 15 posiciones con las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 de los polipéptidos descritos en el presente documento es como se proporciona en la Figura 1A para un dominio de V_H y como se proporciona en la Figura 1B para un dominio de V_L.

Los dominios de V_H o V_L humanos pueden obtenerse a partir de secuencias de cadena pesada o ligera de lg humana
 (Holliger y Hudson, 2005; Holt, et al., 2003; Jespers et al., 2004; To et al., 2005). Se conocen técnicas similares en la técnica para obtener dominios de V_H o V_L de especies no humanas. Además, los dominios de V_L de la invención de la presente invención incluyen V_L producida de forma recombinante, así como aquellas V_L generadas mediante modificación adicional de dicha V_L mediante maduración por afinidad, estabilización, solubilización (por ejemplo, camelización) u otros métodos de modificación genética de anticuerpos. La presente invención también abarca homólogos, derivados o variantes que retienen o mejoran la estabilidad y las características de no agregación de la

25 homólogos, derivados o variantes que retienen o mejoran la estabilidad y las características de no agregación de la V_L.

La invención proporciona nuevos dominios de V_L que comprenden un andamio que comprende residuos de Cys no canónicos. Como se usa en el presente documento, un "andamio" o, alternativamente, un "andamio de inmunoglobulina" comprende las regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) de la V_L, en la que el marco proporciona el andamio principal del polipéptido para las diversas CDR (CDR1, CDR2, CDR3). Como se usa en el presente documento, el término "andamio" ignora las regiones CDR con el propósito de describir la porción marco de la composición de la invención.

35 El andamio de inmunoglobulina descrita en el presente documento puede comprender una secuencia de polipéptidos que comprende al menos dos residuos de Cys no canónicos introducidos en las regiones marco FR2 y FR3 de una región variable de anticuerpo. En una realización, el polipéptido comprende un residuo de Cys en una posición seleccionada de los residuos 46 a 49 de regiones FR2 de V_L y un residuo de Cys en una posición seleccionada de los residuos 62 a 66 de regiones FR3 de V_L de un dominio sdAb de V_L. Como se usa en el presente documento,

40 "introducido" o "introducción" significa incorporar un cambio en la composición de polipéptidos o la secuencia de nucleótidos que codifica la composición de polipéptidos usando cualquier método adecuado conocido por un experto en la técnica, y especialmente incluyendo tecnología recombinante. En una realización, los residuos de Cys se introducen en el constructo de V_L reemplazando un codón existente en un gen, una secuencia de codificación y/o un ARNm con un codón que es específico para un residuo de cisteína.

En una realización, la composición de la invención comprende un andamio de inmunoglobulina seleccionada de un andamio de V_L, en la que el andamio de V_L comprende al menos un enlace disulfuro no canónico en la FR, en la que el enlace disulfuro no canónico se forma entre los residuos de Cys introducidos en las posiciones 48 y 64, según la numeración de Kabat.

50

Como se usa en este documento, un constructo de V_L "de la invención" o un fragmento de sdAb comprende al menos un puente disulfuro no canónico que comprende al menos un residuo de Cys en la posición 48 y al menos un residuo de Cys en la posición 64.

- 55 En una realización, el polipéptido comprende al menos un residuo de Cys en la posición 48 y al menos un residuo de Cys en la posición 64 de un dominio de V_L. En una realización, el dominio de V_L de la invención comprende un fragmento de sdAb. En una realización, la invención proporciona una biblioteca de expresión que comprende el fragmento de sdAb de V_L de la invención, en el que los fragmentos de sdAb de la invención comprenden una multiplicidad de secuencias de CDR. En una realización, la invención y una multiplicidad de secuencias de CDR adecuadas
- bit comprende el andamio de inmunoglobulina de vL de la invención y una multiplicidad de secuencias de CDR adecuadas para proporcionar bibliotecas con diversidades de al menos 10⁵, al menos 10⁶, al menos 10⁷, al menos 10⁸, al menos 10⁹ o más de 10⁹ clones por biblioteca. En una realización, la posición de las regiones CDR del fragmento de sdAb de V_L de la invención seleccionado del grupo de las SEQ ID NOs: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 están en las posiciones proporcionadas en la Figura 1B.
- 65

En una realización, los residuos de CDR de los polipéptidos de la invención pueden ser cualquier secuencia adecuada y pueden tener un número variable de residuos distinto del número proporcionado en las Figuras 1A y 1B. Cada una de CDR1, CDR2 y CDR3 puede variar en secuencia y longitud de acuerdo con las pautas conocidas por los expertos en la técnica de anticuerpos. Sin desear limitarse a ninguna referencia específica, se proporcionan ejemplos de pautas

- 5 en las publicaciones de Kabat y Chothia y Lesk citadas en este documento. En un ejemplo no limitativo, el diseño y la construcción de una biblioteca de fagos con base en el andamio HVLP324S se proporciona en la Figura 11 y en el Ejemplo 8 y la biblioteca se caracteriza en el Ejemplo 9.
- Las composiciones de V_L de la presente invención proporcionan andamios en la construcción de bibliotecas o anticuerpos adicionales. En una realización, las regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) de la V_L se pueden usar para transportar diversas CDR, es decir, en las que las FR son como se proporcionan y en las que la secuencia y el número de residuos de la región CDR son como se proporcionan o varían en uno o más, o en todos, los residuos específicos de CDR. De esta manera, las bibliotecas de V_L sintéticas pueden construirse en andamios individuales insertando oligonucleótidos adecuados que comprenden secuencias aleatorizadas para proporcionar CDR/bucles aleatorios.
- 15 Dichas bibliotecas pueden ser bibliotecas de despliegue tales como despliegue en fagos, despliegue en ribosomas o despliegue en levadura. Este enfoque es rutinario en la técnica y se ha descrito en muchas publicaciones (por ejemplo, pero sin limitarse a Arbabi-Ghahroudi et al., 2009a y las referencias citadas allí). Las bibliotecas se pueden usar opcionalmente para la modificación genética adicional de anticuerpos o para maduración de afinidad *in vitro* (Davies y Riechmann, 1996b; Yau et al., 2005). Alternativamente, una biblioteca existente basada en un sdAb natural puede
- 20 usarse para modificar genéticamente un enlace o enlaces disulfuro en cada miembro de la biblioteca mediante empalme por extensión por superposición - reacción en cadena de polimerasa (SOE-PCR) (Arbabi-Ghahroudi, et al., 2010 y las referencias citadas allí; Ho et al., 1989) u otros métodos (Kunkel et al., 1987; Sidhu et al., 2000).

En otra alternativa más, la V_L puede usarse como un andamio para incorporar secuencias de CDR específicas; por
ejemplo, y sin querer limitarse de ninguna manera, se puede construir un anticuerpo humanizado a partir de cualquier anticuerpo no humano mediante el uso de tecnología recombinante para comprender además el puente disulfuro no canónico de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento. Este constructo puede modificarse luego para unirse a un objetivo específico insertando los segmentos de codificación de CDR apropiados (responsables de las propiedades de unión deseadas, y que pueden variar en secuencia y longitud de acuerdo con las pautas citadas
en este documento y conocidas por los expertos en las técnicas de anticuerpos) en el andamio de anticuerpos humanizados de acuerdo con la presente invención. Como sabría una persona experta en la técnica, estas técnicas de avertar mediante alención esténdera y métodos de ADN recembinante para comprendera entrevisión.

- se logran mediante clonación estándar y métodos de ADN recombinante usando vectores apropiados y de expresión en células (de mamífero o de otro tipo). Dichos métodos y técnicas son bien conocidos por los expertos en la materia, y no se describen en el presente documento.
- 35

Los andamios de V_L de la presente invención comprenden uno o más de un enlace disulfuro no canónico en las regiones marco. Un enlace disulfuro es una fuerza covalente que estabiliza las proteínas mediante el acoplamiento de dos grupos tiol entre residuos de cisteína (Betz, 1993). Por "no canónico", se entiende que el enlace disulfuro no se encuentra en la V_L humano natural, sino que se introduce utilizando técnicas de modificación genética molecular. El

- 40 enlace disulfuro natural (o "canónico") que conecta dos láminas β dentro de un dominio variable está altamente conservado en las superfamilias de V_L (Amzel y Poljak, 1979; Williams y Barclay, 1988). Los enlaces disulfuro conservados se forman entre Cys23 y Cys88 en las V_L, en las que los residuos están numerados de acuerdo con Kabat (véase la Figura 1). En la presente invención, uno o más de un enlace disulfuro no canónico adicional se modifica genéticamente en el dominio de V_L. Preferiblemente, el enlace disulfuro modificado genéticamente se forma entre un
- 45 Čys de una primera lámina beta y un Cys de una segunda lámina beta cercana en el pliegue de la inmunoglobulina. Por ejemplo, esto se puede lograr mediante la introducción de un número apropiado de un par o pares de Cys en ubicaciones en las regiones marco que formarán un enlace disulfuro en la proteína expresada y completamente plegada. Los residuos de Cys pueden introducirse en regiones marco que son adyacentes en el andamio tridimensional del dominio variable. Por ejemplo, y sin querer limitarse de ninguna manera, los residuos de Cys podrían introducirse
- 50 en la región de la lámina beta de FR2 y la región de la lámina beta de FR3. Los residuos de Cys se introducen en las regiones marco adyacentes en ubicaciones que están dentro del intervalo para el acoplamiento de los grupos tiol. Por ejemplo, y sin querer limitarse de ninguna manera, los residuos de Cys pueden introducirse en una de las posiciones 46-49 (4 posiciones) y una de las posiciones 62-66 (5 posiciones) para V_L (con base en la numeración de Kabat), siempre y cuando los respectivos pares de Cys estén lo suficientemente cerca como para formar un enlace disulfuro.
- 55 En otro ejemplo no limitativo, los residuos de Cys pueden introducirse en las posiciones 48 y 64 para V_L (con base en la numeración de Kabat).

La Cys puede introducirse en las regiones marco de dominios de V_L usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Sin desear estar limitado, la Cys puede introducirse mediante mutación puntual o inserción a través de métodos de ADN recombinante; por ejemplo, y sin querer limitarse de ninguna manera, la Cys puede introducirse mediante empalme por extensión por superposición (SOE)-PCR (Arbabi-Ghahroudi, et al., 2010 y referencias en el mismo; Ho et al., 1989).

El uno o más de un enlace disulfuro no canónico en los andamios de V_L proporciona una estabilidad mejorada y la no agregación del anticuerpo. La no agregación se refiere a la molécula existente en un estado monomérico; por ejemplo, y sin querer limitarse de ninguna manera, los monómeros producen esencialmente un pico con cromatografía de

exclusión por tamaño (SEC). Las moléculas de agregación forman dímeros, trímeros y agregados de orden superior. La estabilidad de un anticuerpo incluye características biofísicas tales como la termoestabilidad, la eficiencia de replegamiento térmico y químico y la resistencia a la proteasa. Otros factores a considerar al evaluar los andamios de V_L de la presente invención incluyen niveles de expresión y solubilidad. Como se sabe en la técnica, la solubilidad se

5 refiere al número de moléculas por volumen (por ejemplo, en molaridad o mg/mL) que pueden disolverse en un líquido antes de la precipitación; en el caso de los sdAb, y en el contexto de la presente invención, el número de moléculas monoméricas es de particular importancia.

La adición de un enlace disulfuro no canónico puede mejorar una o más de una de las características biofísicas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, y sin querer limitarse a la teoría, la introducción de un enlace disulfuro no canónico en un dominio de V_L puede mejorar la estabilidad (por ejemplo, mayor temperatura de fusión y resistencia a la proteasa, al estabilizar el marco); y/o mejorar la no agregación (al reducir las interacciones intermoleculares y la formación de agregados).

- 15 El andamio de V_L en la que se introducen enlaces disulfuro no canónicos puede ser de cualquier origen de línea germinal adecuado. Por ejemplo, y sin querer estar limitado de ninguna manera, la V_L puede ser de la familia lambda o kappa, por ejemplo kappa 1 o kappa 3, o su composición puede derivarse de varias combinaciones de secuencias de línea germinal del segmento V y J. (To et al., 2005; base de datos V BASE del Centro para Modificación Genética de Proteínas MRC, http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/).
- 20

En una realización, los andamios de V_L de la presente invención pueden incluir, pero no están limitadas a andamios que comprenden las regiones marco de secuencias seleccionadas del grupo que consiste en

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGDTVSDESMTWVRQAPGKGLEWVCAISSSGGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVTDNRSCQTSLCTSTTRSWGQGTMVTVSS (HVHAm302S; SEQ ID NO:2);

25

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGVTLSPECMAWVRQAPGKGLEWVCAISSSGGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVSCEGENAFWGQGTMVTVSS (HVHAm427S; SEQ ID NO:4);

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGYTVSSECMGWVRQAPGKGLEWVCAISSSSGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDSKNCHDKDCTRPYCSWGQGTMVTVSS (HVHAm431S; SEQ ID NO:6);

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGFSVISESMTWVRQAPGKGLEWVCAISSSGGSTYYADSVKGRFTCS RDNSKNTVHLQMNSLRAEDTAVYYCAAKKIDGARYDYWGQGTMVTVSS (HVHPC235S; SEQ ID NO:8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPKLLCFAASTLQSGVPSRFSCSGSGTDF TLTISNLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGHGTKVTVL (HVLP324S; SEQ ID NO:10);

EIVLTQSPTTLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLAWYQQRPGQAPRLLCFDTSNRAPGVPARFSCRGSGTLF TLTISSLEPEDSAVYFCQQRSSGLTFGGGTKVTVL (HVLP325S; SEQ ID NO:12);

35

40

30

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSSLAWYQQKPGQAPRLLCYGTSNRATGIPDRFSCSGSGT HFTLTINRLEPGDFAVYYCQQYGSSPRTFGQGTKVEIK (HVLP335S; SEQ ID NO:14);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTDLDWFQQRPGRAPHRLCYGASSLQGGVPSRFSCSGSGTE FTLTISGLQPEDFATYYCLQHHTYPRTFGLGTKVTVL (HVLP342S; SEQ ID NO:16);

EIVMTQSPVTLSLSPGERATLSCRASQSVGTSLAWYQQKPGQAPRLLCYDASNRATGISARFSCSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQRYNWPRTFGGGTKVTVL (HVLP351S; SEQ ID NO:18); ETTLTQSPATLSVSPGERATFSCRASQSVSNNLAWYQQKPGQAPRLLCYGASSRTTGIPDRFSCSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDTSPRTFGQGTKVEIK (HVLP364S; SEQ ID NO:20);

QSVVTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSSYNIGENSVSWYQQLPGTAPKLLCYGNDKRPSGIPDRFSCSKSGTS ATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSNLRASVFGGGTKVTVL (HVLP389S; SEQ ID NO:22);

ETTLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRNNLAWYQQRPGQAPRLLCYGASTRATGIPARFSCSGSGTD FTLTISSLQVEDVAVYYCQQYYTTPKTFGQGTKVEIK (HVLP3103S; SEQ ID NO:24),

o secuencias sustancialmente idénticas a las mismas, con la condición de que la secuencia sustancialmente idéntica retenga los enlaces disulfuro canónicos y no canónicos y en donde la secuencia en las regiones de las CDR puede ser cualquier secuencia adecuada y puede tener un número de residuos adecuado pero variable en cada una de CDR1, CDR2 y CDR3. En el caso de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14,16, 18,20, 22 y 24, los residuos que comprenden las CDR son como se proporcionan en las Figuras 1A y 1B.

La solicitud describe además el polipéptido de inmunoglobulina que comprende la región de el andamio de una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGSGGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEPRSVSGLRGVVDSWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:70

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGSGGSTYYADSVKGRFT CSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGTDMEVWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO:71)

QLQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGSGGSTYYADSVKGRFT CSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGKGGSSGYDHPDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:72)

QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGSGGSTYYADSVKGRFT CSRDNSKNSLYLQMNSLGAEDTAVYYCARSWSGSSYGGDLDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:73)

QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISSSGGSTYYADSVKGRFTC SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVREEYRCSGTSCPGAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:74)

25

30

20

5

10

15

EVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFTFINYAMSWVRQAPDKGLDWVCTISNNGGATYYADSVKGRFTC SRDNSNNTLYLQMNSLRPDDTAVYYCAKGPINTGRYGDWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:75)

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVCAISGGGDHTYYADSVKGRFT CSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGMVRGVSSAPFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:76)

EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVCGISGSGASTYYADSVKGRFT CSRDNSKNTLYLQMNSLRAGDTALYYCARQSITGPTGAFDVWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:77)

QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWFRQAPGKGLEWVCFIRSKAYGGTTEYAASVKGRF TCSRDDSKSIAYLQMNSLRAEDTAMYYCARRAKDGYNSPEDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:78)

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMTWVRQAPGKGLEWVCRIKTKTDGGTTDYAAPVKGR FTCSRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDRDHSSGSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:79) DVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCTASGFPFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVCRITSKTDGGTTDYVAPVKGR FTCSRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDQANAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:80)

QMQLVQSGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSRMSWFRQAPGMGLEWVCVIYSGGSTYYADSVRGRFSC SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAREREGAVTREDWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:81)

5

10

QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGKGLEWVCFIYSGGSTYYADSVKGRFTCS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESRVGGGAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:82)

у

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIVDGYAMHWVRQAPGQGLEWVCVTNNGGSTSYADSVKGRFT CSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSITGPTGAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:83)

o secuencias sustancialmente idénticas a las mismas, o fragmentos de las mismas, con la condición de que la secuencia sustancialmente idéntica, o fragmento de la misma, conserve los enlaces disulfuro tanto canónicos como no canónicos y en la que la secuencia en las regiones de las CDR puede ser cualquier secuencia adecuada y puede
 tener un número adecuado pero variable de residuos en cada una de las CDR1, CDR2 y CDR3. En el caso de las SEQ ID NOs: 70 a 83, los residuos que comprenden las CDR son como se proporcionan en los clones de tipo silvestre correspondientes como se proporciona en la Figura 2 de la publicación PCT WO2006/099747.

- Las secuencias sustancialmente idénticas también deberían retener o mejorar la estabilidad y las características de
 no agregación de la V_H o V_L. Como se señala a lo largo del texto, los andamios de la invención no se limitan a los residuos enumerados en las regiones CDR, que están delimitadas en las Figuras 1A y 1B para los clones enumerados en el presente documento.
- Una secuencia sustancialmente idéntica puede comprender una o más mutaciones conservadoras de aminoácidos. Se sabe en la técnica que una o más mutaciones conservadoras de aminoácidos en una secuencia de referencia pueden producir un péptido mutante sin un cambio sustancial en las propiedades fisiológicas, químicas o funcionales en comparación con la secuencia de referencia; en tal caso, las secuencias de referencia y mutantes se considerarían polipéptidos "sustancialmente idénticos". La mutación conservadora de aminoácidos puede incluir adición, eliminación o sustitución de un aminoácido; una sustitución conservadora de aminoácidos se define en el presente documento como la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido con propiedades químicas similares
- (por ejemplo, tamaño, carga o polaridad).
- En un ejemplo no limitante, una mutación conservadora puede ser una sustitución de aminoácidos. Tal sustitución conservadora de aminoácidos puede sustituir un aminoácido básico, neutro, hidrófobo o ácido por otro del mismo grupo. Por el término "aminoácido básico" se entiende aminoácidos hidrófilos que tienen un valor de pK de cadena lateral mayor que 7, que típicamente están cargados positivamente a pH fisiológico. Los aminoácidos básicos incluyen histidina (His o H), arginina (Arg o R) y lisina (Lys o K). Por el término "aminoácido neutro" (también "aminoácido polar"), se entiende aminoácidos hidrófilos que tienen una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en el que el par de electrones compartidos en común por dos átomos está más cerca
- 40 de uno de los átomos. Los aminoácidos polares incluyen serina (Ser o S), treonina (Thr o T), cisteína (Cys o C), tirosina (Tyr o Y), asparagina (Asn o N) y glutamina (Gln o Q). El término "aminoácido hidrófobo" (también "aminoácido no polar") incluye aminoácidos que exhiben una hidrofobicidad mayor que cero según la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg (1984). Los aminoácidos hidrófobos incluyen prolina (Pro o P), isoleucina (Ile o I), fenilalanina (Phe o F), valina (Val o V), leucina (Leu o L), triptófano (Trp o W), metionina (Met o M), alanina (Ala o
- 45 Á) y glicina (Gly o G). "Aminoácido ácido" se refiere a aminoácidos hidrófilos que tienen un valor de pK de cadena lateral de menos de 7, que típicamente están cargados negativamente a pH fisiológico. Los aminoácidos ácidos incluyen glutamato (Glu o E) y aspartato (Asp o D).
- La identidad de secuencia se usa para evaluar la similitud de dos secuencias; se determina calculando el porcentaje de residuos que son iguales cuando las dos secuencias están alineadas para una correspondencia máxima entre las posiciones de residuos. Se puede usar cualquier método conocido para calcular la identidad de secuencia; por ejemplo, el software de ordenador está disponible para calcular la identidad de secuencia. Sin desear ser limitante, la identidad de secuencia puede calcularse mediante software tal como el servicio BLAST2 del NCBI mantenido por el Instituto Suizo de Bioinformática (y como se encuentra en http://ca.expasy.org/tools/blast/), BLAST-P, Blast-N, o
- 55 FASTA-N, o cualquier otro software apropiado conocido en la técnica. En una realización, el cálculo del porcentaje de identidad se limita a la comparación de las regiones marco y no tiene en cuenta los residuos dentro de las CDR. En

una realización, el cálculo del porcentaje de identidad compara todos los residuos en un polipéptido, incluidos los de las regiones marco y las CDR.

- Como se indica a lo largo del texto, los andamios descritos en el presente documento no se limitan a los residuos enumerados en las regiones CDR, que están delimitadas en las Figuras 1A y 1B para los clones enumerados en el presente documento como las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24; y están delimitadas en la Figura 2 de la publicación PCT WO2006/099747 para las secuencias de tipo silvestre correspondientes a los clones enumerados en le presente documento como las SEQ ID NOs: 70 a 83.
- 10 Las secuencias sustancialmente idénticas de la presente invención pueden ser al menos 90% idénticas; en otro ejemplo, las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% (o cualquier porcentaje entre ellas) idénticas a nivel de aminoácidos a las secuencias descritas en el presente documento. En una realización adicional, una secuencia sustancialmente idéntica puede contener una, dos, tres o cuatro diferencias de aminoácidos en la región marco cuando se alinea con una composición inventiva proporcionada
- 15 en este documento. Es importante destacar que las secuencias sustancialmente idénticas conservan la estabilidad y las propiedades biofísicas de la secuencia de referencia. En una realización no limitante, la diferencia en la identidad de secuencia puede deberse a una mutación o mutaciones conservadoras de aminoácidos. En una realización, las secuencias sustancialmente idénticas consisten en los residuos que comprenden FR1, FR2, FR3 y FR4 y no considera los residuos que comprenden uno o más de CDR1, CDR2 y CDR3.
 20
- Los andamios de V_L pueden incluirse como parte de proteínas o fragmentos de anticuerpos más grandes, tales como uno o más de un sdAb, scFv, Fab, F(ab)₂ y/o inmunoglobulina madura, que incluyen pero no se limitan a una IgG, IgE , y/o IgM, con el fin de aumentar sus propiedades biofísicas, tal como la no agregación, la estabilidad, el nivel de expresión y la solubilidad. Como se usa en el presente documento, una "inmunoglobulina madura" comprende una cadena ligera, dicha cadena ligera que comprende una región variable y constante, y una cadena pesada, dicha
- cadena pesada que comprende una región variable y constante. En una realización, la inmunoglobulina madura se selecciona del grupo que consiste en una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE y/o IgM. En una realización, la secuencia introducida de este constructo de anticuerpo más grande es humano o está humanizado. El enfoque anterior también se puede aplicar a derivados de V_L tales como constructos de fusión elaborados por fusiones de las V_L con otros polipéptidos tales como toxinas, las V_L con la misma o diferente especificidad, dominios de Fc, etc. con el fin de
- aumentar sus propiedades biofísicas tales como la solubilidad, no agregación, nivel de expresión y estabilidad.
- Los andamios de V_L de la presente invención también pueden fusionarse con secuencias adicionales para ayudar en la expresión, detección o purificación de un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo. Se puede usar cualquiera
 de tales secuencias o etiquetas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, y sin querer ser limitante, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una secuencia de direccionamiento o señal (por ejemplo, pero sin limitarse a ompA), una etiqueta de detección (por ejemplo, pero sin limitarse a c-Myc), un etiqueta de purificación (por ejemplo, pero sin limitarse a His₅ o His₆), un fragmento Fc o una combinación de los mismos. En otro ejemplo, la secuencia adicional puede ser un sitio de reconocimiento de biotina tal como el descrito por Cronan et al., en el documento WO 95/04069 o Voges et al., en el documento WO/2004/076670. Como también saben los expertos en la materia, las secuencias enlazadoras pueden usarse junto con las secuencias o etiquetas adicionales.
- Los andamios de V_L de la presente invención también pueden estar en una presentación multivalente. La multimerización se puede lograr mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, y sin querer
 limitarse de ninguna manera, la multimerización se puede lograr utilizando moléculas de autoensamblaje como se describe en Zhang et al., (2004a; 2004b) y el documento WO2003/046560. El método descrito produce pentacuerpos expresando una proteína de fusión que comprende el andamio de V_H o V_L de la presente invención y el dominio de pentamerización de la subunidad B de una familia de toxinas AB₅ (Merritt y Hol, 1995); el dominio de pentamerización se ensambla en un pentámero, a través del cual se forma una presentación multivalente del anticuerpo o fragmento
- 50 del mismo. Además, el dominio de pentamerización puede enlazarse a el andamio de V_L utilizando un enlazador; dicho enlazador debe ser suficientemente largo y de composición adecuada para proporcionar una unión flexible de las dos moléculas, pero no debe obstaculizar las propiedades biofísicas de el andamio de V_L.

Otras formas de presentación multivalente también están abarcadas por la presente invención. Por ejemplo, y sin querer estar limitado, el andamio de V_L puede presentarse como al menos un dímero, un trímero, un tetrámero, un pentámero, un hexámero, un neptámero, un octámero o cualquier otro oligómero adecuado. Esto puede lograrse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, conexión de enlace directo (Nielson et al., 2000), interacción c-jun/Fos (de Kruif y Logtenberg, 1996), interacción de "botón en ojales" (Ridgway et al., 1996) o la clonación secuencial de unidades repetitivas de la región de codificación del clon de la invención y los enlazadores del polipéptido corto adecuado conocidos en la técnica.

Otro método conocido en la técnica para la multimerización es dimerizar la composición de V_L usando un dominio de Fc. Cuando se aplica *in vivo*, los sdAb monoméricos se eliminan rápidamente de la circulación (Bell et al., 2010). Para resolver este problema y proporcionarles a V_H o V_L la capacidad de inducir una respuesta inmune después de la unión al antígeno, los andamios de V_L pueden fusionarse a un fragmento de región constante de anticuerpo ("Fc") para generar anticuerpos guiméricos de cadena pesada (Bell et al., 2010). En este enfoque, el gen de Fc se inserta en un

14

vector junto con el gen de VL para generar una proteína de fusión sdAb-Fc (Bell et al., 2010; Igbal et al., 2010); la proteína de fusión se expresa de forma recombinante y luego se purifica. Dichos anticuerpos son fáciles de modificar genéticamente y de producir (Zhang et al., 2009), pueden extender en gran medida la vida media en suero de V_H o V_L, y pueden ser excelentes reactivos de formación de imágenes de tumores (Bell et al., 2010). En una realización, la porción de Fc es humana.

La presente invención también abarca secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas como se describe en el presente documento. En una realización, el ácido nucleico comprende una secuencia que codifica un andamio de inmunoglobulina seleccionado de un andamio de VL, en la que el andamio de VL comprende al menos un enlace disulfuro no canónico en la FR formado entre los residuos de Cys introducidos en las posiciones 48 y 64, con base en 10 la numeración de Kabat. En una realización, el ácido nucleico codifica una o más de las secuencias seleccionadas de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 70-83. En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende cualquier codón del código degenerado que codifica el residuo de aminoácido apropiado. En una realización, la región codificante de la secuencia de ácido nucleico es de codón optimizado. En una realización, el 15 ácido nucleico está en un vector de expresión. En una realización, el vector de expresión está en una célula u organismo huésped capaz de expresar dicho ácido nucleico.

Como es bien sabido por los expertos en la técnica, es posible mejorar la expresión de una secuencia de ácido nucleico en una célula u organismo huésped reemplazando los ácidos nucleicos que codifican un aminoácido particular (es 20 decir, un codón) con otro codón que se expresa mejor en el organismo huésped. Una razón por la que surge este efecto se debe al hecho de que diferentes organismos muestran preferencias por diferentes codones. En particular, los organismos bacterianos y los organismos de levadura prefieren diferentes codones de plantas y animales. El

proceso de alterar la secuencia de un ácido nucleico para lograr una mejor expresión basada en la preferencia del

- codón se denomina optimización del codón. Se han generado métodos estadísticos para analizar el sesgo de uso de 25 codones en varios organismos y se han desarrollado muchos algoritmos informáticos para implementar estos análisis estadísticos en el diseño de secuencias de genes con codones optimizados (Lithwick y Margalit, 2003). En una realización, la secuencia de ácido nucleico puede ser de codón optimizado para la expresión en células de mamífero. En una realización, la secuencia de ácido nucleico puede ser de codones optimizado para la expresión en diversos microorganismos. En una realización, la secuencia de ácido nucleico es de codón optimizado para la expresión en E.
- 30 coli. En una realización, la secuencia de ácido nucleico es de codón para la expresión en levadura. En una realización, la secuencia de ácido nucleico es de codón optimizado para la expresión en levadura y para la presentación en la superficie de anticuerpos, es decir, el transporte entre la presentación en fagos del anticuerpo y presentación en levadura del anticuerpo. La presente invención también abarca vectores que comprenden los ácidos nucleicos como se acaba de describir. Además, la invención abarca células que comprenden el ácido nucleico y/o el vector como se 35 describe.

40

5

La presente invención abarca además el andamio de VL inmovilizado sobre una superficie usando diversas metodologías; por ejemplo, y sin querer estar limitado, el andamio de VL puede estar enlazada o acoplada a la superficie a través de acoplamiento de etiqueta His, unión a biotina, unión covalente, adsorción y similares. La superficie sólida puede ser cualquier superficie adecuada, por ejemplo, pero sin limitarse a la superficie del pozo de una placa de microtitulación, canales de chips de sensores de resonancia de plasmón superficial (SPR), membranas, perlas (tales como perlas magnética o con base en sefarosa u otras resina de cromatografía), vidrio, una película o cualquier otra superficie útil.

- 45 La presente invención proporciona además una VL de la invención unida a una molécula de carga; el anticuerpo o fragmento del mismo puede entregar la molécula de carga a un sitio deseado. La molécula de carga puede ser cualquier tipo de molécula que pueda usarse para diagnosticar, tratar o detectar un biomarcador. En una realización, el marcador de carga es una molécula que puede reducir y/o inhibir el crecimiento de células objetivo. En una realización, las células objetivo son células asociadas con una enfermedad proliferativa. En una realización, la
- 50 enfermedad proliferativa es un cáncer, que incluye varios tipos de tumores, en el que las células objetivo expresan un marcador reconocido por la porción del dominio de VL de la invención. Por lo tanto, en una realización, la molécula de carga es un agente terapéutico o de diagnóstico. En una realización, la molécula de carga está unida a un agente terapéutico o de diagnóstico.
- 55 Por ejemplo, y sin querer limitarse de ninguna manera, el agente terapéutico puede ser un radioisótopo, que puede usarse para radioinmunoterapia; una toxina, tal como una inmunotoxina; una citoquina, tal como una inmunocitoquina; una citotoxina; un inductor de apoptosis; una enzima o cualquier otra molécula terapéutica adecuada conocida en la técnica. Como alternativa, un agente de diagnóstico puede incluir, entre otros, un radioisótopo, una etiqueta paramagnética, un fluoróforo, una etiqueta de afinidad (por ejemplo, biotina, avidina, etc.) fusionada a una molécula
- 60 detectable con base en proteínas, o cualquier otro agente adecuado que pueda detectarse mediante métodos de formación de imágenes. En un ejemplo específico, no limitante, el anticuerpo o fragmento del mismo puede estar unido a un agente fluorescente tal como FITC o puede estar genéticamente fusionado a la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP).
- 65 El anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse a la molécula de carga usando cualquier método conocido en la técnica (tecnología recombinante, conjugación química, etc.).

La presente invención también proporciona un método para mejorar la estabilidad de los anticuerpos de un solo dominio, que comprende introducir uno o más enlaces disulfuro no canónicos en la región marco. En una realización, el método comprende introducir al menos dos residuos de Cys no canónicos en las regiones marco de la

- 5 inmunoglobulina de interés. En una realización, los dos residuos de Cys reemplazan a los residuos en la FR2 y FR3 de una región variable de anticuerpo. En una realización, el método comprende introducir un residuo de Cys en una posición seleccionada de los residuos 46 a 49 de regiones FR2 de V_L y un residuo de Cys en una posición seleccionada de los residuos 62 a 66 de regiones FR3 de V_L de un dominio de sdAb de V_L.
- 10 En una realización, el método comprende introducir al menos un residuo de Cys no canónico en la posición 48 y al menos un residuo de Cys no canónico en la posición 64 de un dominio de V_L.

En una realización, el método comprende la creación de una biblioteca de expresión que comprende el fragmento de sdAb de V_L de la invención que comprende un puente disulfuro entre los residuos de Cys no canónicos en las posiciones 48 y 64, en las que los fragmentos de sdAb de la invención comprenden una multiplicidad de secuencias CDR. Se puede usar cualquier método adecuado conocido en la técnica para el reemplazo de la creación de la biblioteca de anticuerpos de secuencias de CDR. En una realización, la posición de las regiones CDR es como se define por Kabat. En una realización, la posición de las regiones CDR es como se define por Chothia y Lesk. En una realización, la biblioteca de expresión es un codón optimizado para la expresión en levadura. En una realización, la

20 realización, la biblioteca de expresión es un codón optimizado para la expresión en levadura. En una realización, la biblioteca de expresión es un codón optimizado para la expresión en *E. coli*.

En una realización, las mutaciones pueden introducirse mediante el enfoque SOE-PCR (Arbabi-Ghahroudi et al., 2010 y las referencias citadas allí; Ho et al., 1989) o por otro método (Kunkel et al., 1987; Sidhu et al., 2000, Hussack et al., 2012 (c)). Alternativamente, los genes para los mutantes se pueden obtener comercialmente, ya sea solos o dentro del vector de clonación y expresión objetivo (Kim et al., 2012).

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben usarse para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Clonación, expresión y purificación de las V_H y V_L mutantes

25

30

Los dominios de V_H y V_L agregados y no agregados, así como sus mutantes homólogos de doble cisteína se clonaron,
 expresaron y purificaron. V_H y V_L utilizadas, así como sus correspondientes mutantes de Cys, se enumeran en la Tabla
 y se muestran en la Figura 1.

V _H *	Mutante Cys de V _H
HVHAm302 (SEQ ID NO:1)	HVHAm302S (SEQ ID NO:2)
HVHAm427 (SEQ ID NO:3)	HVHAm427S (SEQ ID NO:4)
HVHAm431 (SEQ ID NO:5)	HVHAm431S (SEQ ID NO:6)
HVHPC235 (SEQ ID NO:7)	HVHPC235S (SEQ ID NO:8)
HVHP44	HVHP44S (SEQ ID NO:70)
HVHB82	HVHB82S (SEQ ID NO:71)
HVHP421	HVHP421S (SEQ ID NO:72)
HVHP419	HVHP419S (SEQ ID NO:73)
HVHP430	HVHP430S (SEQ ID NO:74)
HVHP429	HVHP429S (SEQ ID NO:75)
HVHM41	HVHM41S (SEQ ID NO:76)
HVHM81	HVHM81S (SEQ ID NO:77)
HVHP428	HVHP428S (SEQ ID NO:78)
HVHP420	HVHP420S (SEQ ID NO:79)
HVHP414	HVHP414S (SEQ ID NO:80)
HVHP423	HVHP423S (SEQ ID NO:81)
HVHP413	HVHP413S (SEQ ID NO:82)
HVHP426	HVHP426S (SEQ ID NO:83)
V_*	Mutante de Cys de V _L
HVLP324 (SEQ ID NO:9)	HVLP324S (SEQ ID NO:10)
HVLP325 (SEQ ID NO:11)	HVLP325S (SEQ ID NO:12)

Tabla 1. V_H y V_L y mutantes construidos.

(continuación)			
VL*	Mutante de Cys de V _L		
HVLP335 (SEQ ID NO:13)	HVLP335S (SEQ ID NO:14)		
HVLP342 (SEQ ID NO:15)	HVLP342S (SEQ ID NO:16)		
HVLP351 (SEQ ID NO:17)	HVLP351S (SEQ ID NO:18)		
HVLP364 (SEQ ID NO:19)	HVLP364S (SEQ ID NO:20)		
HVLP389 (SEQ ID NO:21)	HVLP389S (SEQ ID NO:22)		
HVLP3103 (SEQ ID NO:23)	HVLP3103S (SEQ ID NO:24)		

* Mencionado en este documento como "tipo silvestre". Si no se proporciona una SEQ ID NO, entonces la secuencia de tipo silvestre se proporciona en la publicación PCT WO2006/099747, especialmente como se muestra en la Figura 2 de la publicación. Las V_H de tipo silvestre, HVHAm302, HVHAm427, HVHAm431 y HVHPC235, se prepararon como se describe en Arbabi-Ghahroudi et al., (2009b). Se prepararon 14 V_H de tipo silvestre adicionales, HVHP44, HVHB82, HVHP421, HVHP419, HVHP430, HVHP429, HVHM41, HVHM81, HVHP428, HVHP420, HVHP414, HVHP423, HVHP413, y HVHP426 y las V_L de tipo silvestre como se describe en el documento WO 2006/099747 de Tanha. Los plásmidos que contienen genes para estos dominios de tipo silvestre (excluyendo los 14 V_H mencionados anteriormente; véase más adelante) se usaron como plantillas para construir las correspondientes versiones mutantes por SOE-PCR.

Los constructos de la invención, también denominados en este documento como "mutantes de Cys", de las V_H y V_L (HVHAm302, HVHAm427, HVHAm431 y HVHPC235) se crearon con empalme por extensión de solapamiento (SOE) -PCR (Ho et al., 1989; Kim et al., 2012; Arbabi-Ghahroudi et al., 2010) para introducir un par de Cys en las posiciones

- PCR (Ho et al., 1989; Kim et al., 2012; Arbabi-Ghahroudi et al., 2010) para introducir un par de Cys en las posiciones 49 y 69 (V_H) o en las posiciones 48 y 64 (V_L) según lo definido por la numeración de Kabat (Kabat et al., 1991) y como se proporciona en la Figura 1A para un dominio de V_H y la Figura 1B para un dominio de V_L. Brevemente, para generar mutantes de V_H, se prepararon subfragmentos de clones con mutación de Cys, luego se ensamblaron para formar mutantes de Cys de longitud completa por SOE-PCR. Por ejemplo, en el caso de HVHAm302S, los subfragmentos 302S-1 y 302S-2 se generaron por separado mediante PCR estándar utilizando el plásmido que contiene el gen
 - HVHAm302 de tipo silvestre como plantilla de ADN y los siguientes pares de cebadores:

M13RPa (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3 ') (SEQ ID NO: 37)

15 KT131 (5'-ACCACTACTACTAATAG CGCAGACCCACTCCAGCCCCTTC-3') (SEQ ID NO: 38) (para el subfragmento 302S-1) y

M13FP (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTC ACGAC-3') (SEQ ID NO: 39)

20 KT129 (5'-GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCTGCTCCAGAGACAAT TCCAAGAAC-3') (SEQ ID NO: 40) (para el subfragmento 302S-2),

En segundo lugar, usando 302S-2 como plantilla, el fragmento 302S-2-2 se prepara por PCR usando el siguiente par de cebadores de PCR: M13FP y

25

45

KT130 (5'-TGCGCTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCG-3') (SEQ ID NO: 41).

- Esta ETAPA agregó la región superpuesta a 302S-2. Posteriormente, los subfragmentos 302S-1 y 302S-2-2 se ensamblaron para crear un fragmento de V_H de longitud completa con mutaciones de Cys por SOE-PCR usando el par de cebadores M13RP o b/M13FP. Otros mutantes de V_H se generaron a partir de su correspondiente plásmido de V_H de tipo silvestre usando los mismos procedimientos y cebadores; los mutantes de V_L se generaron usando el mismo procedimiento SOE-PCR que para los mutantes de V_H, excepto que se usaron diferentes cebadores de PCR específicos del gen de V_L y las plantillas de plásmido de V_L de tipo silvestre correspondientes. Las versiones mutantes
- 35 de Cys de las 14 V_H no agregadas, HVHP44, HVHB82, HVHP421, HVHP419, HVHP430, HVHP429, HVHM41, HVHM81, HVHP428, HVHP420, HVHP414, HVHP423, HVHP413 y HVHP426 se sintetizaron mediante DNA2.0 (Menlo Park, CA, EE. UU.). Se denominan como HVHP44S, HVHB82S, HVHP421S, HVHP419S, HVHP430S, HVHP429S, HVHP429S, HVHM41S, HVHM81S, HVHP428S, HVHP420S, HVHP414S, HVHP423S, HVHP413S y HVHP426S, respectivamente. Para estos 14 constructos, el marco y las regiones CDR son iguales, a aquellas de las secuencias
- 40 de tipo silvestre correspondientes, que se proporcionan en la publicación PCT WO2006/099747, especialmente como se muestra en la Figura 2 de la publicación.

Los mutantes de Cys de longitud completa se clonaron en un vector de expressión, se expresaron, se purificaron y se determinaron sus concentraciones como se describe en otra parte (Sambrook et al., 1989; To, et al., 2005; Arbabi-Ghahroudi et al 2009a ; 2009b; 2010).

El enlace disulfuro adicional no tuvo efecto adverso sobre el rendimiento de expresión de las V_H y V_L mutantes de Cys; los sdAb mutantes y de tipo silvestre tuvieron un rendimiento comparable en cantidades de miligramos. De hecho, en

algunos ensayos de expresión, HVHAm302S y HVHAm431S tuvieron rendimientos de expresión significativamente más altos que sus contrapartes de tipo silvestre (véase los perfiles de elución de IMAC en la Figura 2A).

En los geles de SDS-PAGE no reductores, las V_H y V_L mutantes migraron más lentamente que sus contrapartes de tipo silvestre (Figura 2B, ejemplos mostrados para los pares de V_H HVHAm302/HVHAm302S y HVHPC235/HVHPC235S). Las diferencias migratorias desaparecieron en condiciones reductoras. Tal patrón de movilidad en SDS-PAGE también se ha visto en el caso de las V_HH y se sugirió como un indicio de que se han formado enlaces disulfuro Cys49/Cys69 en mutantes de Cys (Hussack et al., 2011). Dado que los pares de tipo silvestre/mutante tienen esencialmente los mismos pesos moleculares, las diferencias de migración de gel entre las V_H de tipo silvestre y mutantes se deben a sus diferencias conformacionales como consecuencia de los enlaces

- disulfuro adicionales modificados genéticamente en mutantes (Kim y Tanha, 2010). Además, el HVHAm302 de V_H de tipo silvestre forma agregados (véanse las bandas diméricas en la Figura 2B), que se confirmó adicionalmente mediante transferencia Western usando anticuerpo anti-His (Figura 2B y datos no mostrados). Las bandas diméricas desaparecen para la correspondiente V_H mutante, HVHAm302S (Figura 2B). Esto muestra que el enlace disulfuro modificado genéticamente mejora la no agregación de V_H y es consistente con los hallazgos por cromatografía de
- exclusión por tamaño (véase más adelante y la Figura 4A).

Ejemplo 2: mapeo de enlaces disulfuro de mutantes de Cys

20 Como el enlace disulfuro introducido en los mutantes de Cys de V_H y V_L no es natural para el anticuerpo, se verificó la presencia de enlace disulfuro en la posición mutada antes de la caracterización adicional de los mutantes de V_H y V_L.

Con base en el conocimiento de los dos residuos de Cys (Cys22 y Cys92) que forman un enlace disulfuro nativo en las V_H de tipo silvestre (Amzel y Poljak, 1979; Williams y Barclay, 1988) y los residuos mutados de los mutantes, podría predecirse la ubicación de los enlaces disulfuro. Como había algunos sitios de escisión de tripsina presentes entre los enlaces disulfuro pronosticados en las V_H, fue posible tripsinizar los mutantes de Cys y utilizar espectrometría de masas para verificar la presencia del enlace disulfuro modificado genéticamente.

La determinación del enlace de disulfuro para las V_H y V_L se llevó a cabo como se describe en otra parte (Hussack et al., 2012 (b); Kim y Tanha, 2012; Wu et al., 2009). La determinación del enlace d disulfuro para HVHAm302 y HVHAm302S se realizó exactamente como se describe en Kim y Tanha (2012). Brevemente, los mutantes de Cys de V_H se concentraron en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, usando un dispositivo de filtro centrífugo Ultrafree-0.5 con membrana biomax-5 (MWCO 5000; Millipore, Nepean, ON, Canadá) y se sometieron a digestión con tripsina (Roche Diagnostics Canadá, Laval, QC, Canadá) a una concentración de 0,5 mg/mL en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, y se analizaron por SDS-PAGE para el éxito de la digestión con tripsina y posteriormente se sometieron a un análisis de espectrometría de masas de péptidos (Figura 3 y Tabla 2).

Los resultados mostraron que los péptidos unidos por disulfuro producidos por digestión tríptica de V_H podrían identificarse mediante el método de espectrometría de masas empleado (Figura 3B y Tabla 2). Se determinó que todos
 los pesos moleculares de las proteínas recombinantes tenían una precisión de masa de 40 ppm usando ESI-MS de infusión. La cobertura de identificación de cada proteína a partir del análisis de sus digeridos trípticos usando nanoRPLC-MS² con DDA (análisis dependiente de datos) fue más del 30%. Los iones de péptidos unidos por disulfuro aparecieron prominentes en el barrido de inspección del experimento DDA. Las secuencias de péptidos unidas por disulfuro esperadas de las V_H se confirmaron todas por nueva secuenciación manual.

45

Tabla 2. Determinación de enlaces disulfuro de las V_H por espectrometría de masas. Se muestran los principales péptidos trípticos que contienen enlaces disulfuro, con cisteínas conectadas representadas en negrita y subrayadas; las secuencias restantes en la V_H se pierden por tripsinización. Los espacios dentro de los dobletes peptídicos denotan discontinuidad de la secuencia.

V _H	Péptidos trípticos	PM _{for}	PM _{exp}	ΔPM	SEQ ID NO
	S <u>C</u> QTSL <u>C</u> TSTTR	1284,56	1284,57	-0,01	25
HVHAm302		3630,55	3630,52	0,02	26 27
	S <u>C</u> QTSL <u>C</u> TSTTR	1284,56	1284,57	-0,01	28
HVHAm302S	GLEWV <u>C</u> AISSSGGSTYYADSVK FT <u>C</u> SR	2889,288	2889,30a	-0,02a	29 30
	LSCAASGDTVSDESMTWVR AEDTAVVYYCVTDNR	3630,54	3630,52	0,02	31 32
HVHPC235S	GLEWV <u>C</u> AISSSGGSTYYADSVK FT <u>C</u> SR	2889,30a	2889,23a	0,07a	33

(continuación)						
V _H	Péptidos trípticos	PM _{for}	PM _{exp}	ΔPM	SEQ ID NO	
	LS <u>C</u> AASGFSVISESMTWVR AEDTAVYY <u>C</u> AAK	3331,52	3331,43	0,09	35 36	
HVHP4205	QAPGQGVEWV <u>C</u> VTNNGGSTSADSVK	3277.47a	3277.32a	0.04a	84	
	FT <u>C</u> SR	,	, –		85	

^aLa coincidencia muy estrecha entre PM_{for} y PM_{exp} indica la presencia del enlace disulfuro Cys49-Cys69. PM_{for}: peso molecular de la fórmula (esperado); PM_{exp}: peso molecular determinado experimentalmente por MS; ΔPM se calcula: (PM_{for} - PM_{exp}). PM_{for}, PM_{exp}, y ΔPM se presentan en Daltons (Da).

- 5 que los iones del fragmento del péptido que contienen enlace disulfuro, y₁17 + P2 y b₁6 + P2, se observaron claramente a m/z 1153,85 (2+) y a m/z 649,78 (2+), respectivamente (Figura 3 y Tabla 2). Esto confirmó la presencia del enlace disulfuro modificado genéticamente entre Cys49 y Cys69 en HVHAm302S. También se determinó la presencia del enlace disulfuro modificado genéticamente entre Cys49 y Cys69 en HVHPC235S (Tabla 2). Sin embargo, los enlaces disulfuro de HVHAm427S y HVHAm43S no pudieron confirmarse por espectrometría de masas, ya que eran altamente
- 10 resistentes a la digestión con proteasas (tripsina o pepsina). Sin embargo, el aumento drástico de T_m (Tabla 4), así como el cambio de movilidad en SDS-PAGE (Figura 2B) de HVHAm427S y HVHAm431S en comparación con sus respectivas formas de tipo silvestre indica la presencia del enlace disulfuro modificado genéticamente tanto en HVHAm427S como en HVHAm431S.
- 15 Como otro representante, uno de las 14 V_H mutantes (HVHP426S) también fue elegido para la determinación de la formación de enlaces disulfuro Cys 49/Cys 69. Como en el caso de otras V_H, los resultados de la MS mostraron que HVHP426S había formado un enlace disulfuro entre Cys 49 y Cys 69 (Tabla 2).

Un análisis de espectrometría de masas similar en las V_L mutantes confirmó la presencia del enlace disulfuro 20 modificado genéticamente entre las posiciones Cys48 y Cys64 en todas las V_L (Tabla 3).

	la discontinuidad de la secuencia.			,	
۸	Péptidos trípticos	PM _{for}	PMexp	ΔPM ^a	SEQ ID NO
HVLP324S	VTIT <u>C</u> R LLCFASTLQSGVPSR	6249,91	6249,96	-0,05	42, 43,
	FSCSGSGTDFTLTISNQPEDFATYYCQQSYSTPR				44
HVLP325S	ATLSCR GSGTLFTLTISSLEPEDSAVYFCQQR	3495,66	3495,40	0,26	45, 46
	LLCFDTSNR FSCR	1576,71	1576,68	0,03	47, 48
HVLP335S	LLCYGTSNR FSCSGSGTHFTLTIVR	2750,29	2750,32	-0,03	49, 50
	ATLSCR LEPGDFAVYYCQQYGSSPR	2826,27	2826,20	0,07	51, 52
HVLP342S	VTITCR	6136,85	6136,80	0,05	53, 54,
					55
HVLP351S	ATLSCR	5049,26	5049,00	0,26	56, 57, 58
HVLP364S	LLCYGASSRTR FSCSGSGTDFTLTISR	2644,22	2644,32	-0,10	59, 60
	ATFSCR LEPEDFAVYYCQQYDTSPR	3004,30	3004,35	-0,05	61, 62
HVLP3103S	LLCYGNDK FSCSK	1492,67	1492,59	0,08	63, 64
	VTIS <u>C</u> SGSSYNIGENSVSWYQQLPGTAPK	6221,84	6222,12	-0,28	65,
	SGTSATLGITGLQTGDEADYY <u>C</u> GTWDSNLR				66
HVLP324S	ATLSCR	5528,56	5528,52	0,04	67, 68
	FSCSGSGTDFTLTISSLQVEDVAVYYCQQYYTTPK				69
^a La coincidencia I	muy estrecha entre PMfor y PMexp indica la presencia del enlace disulfuro Cys4	18-Cys64.			
PMfor: peso molec	ular de la fórmula (esperado); PMexe: peso molecular determinado experimenta	Imente por MS	; APM se calcula	a: (PMfor - PM	exp). PMfor, PMexp,
v APM se present	an en Dattons (Da).				

Tabla 3. Determinación de enlaces disulfuro de las VL por espectrometría de masas (MS). Se muestran los principales péptidos trípticos que contienen enlaces disulfuro, con cisteínas conectadas representadas por subrayado (y cursiva) y en negrita; en el caso de HVLP324S, HVLP342S, HVLP351S y HVLP3103S, otro

El análisis de el andamio cristalino ha confirmado la presencia del puente disulfuro entre los residuos de Cys-Cys no canónicos además del puente disulfuro entre los residuos de Cys-Cys canónicos en todas los constructos de V_H y V_L ensayados.

5 Ejemplo 3: cromatografía de exclusión de tamaño analítica

La cromatografía de exclusión por tamaño (o cromatografía de filtración en gel) separa las proteínas por tamaño molecular y volumen hidrodinámico (Porath y Flodin, 1959). Por lo tanto, este método es útil para evaluar el estado de agregación de proteínas en solución. La cromatografía de exclusión por tamaño que emplea Superdex^{MR} 75 se usa

- 10 para evaluar el estado de agregación de los dominios de V_H (o V_L). Las V_H no agregados (o V_L) deberían producir cromatogramas con un único pico simétrico con volúmenes de elución esperados para una V_H (o V_L) monomérica. Por el contrario, los perfiles cromatográficos de las V_H agregadas, además de los picos monoméricos, consisten en picos adicionales, por ejemplo, agregados grandes, agregados diméricos, que se eluyen antes. El porcentaje de monómero puede calcularse mediante la integración del área de los picos y usarse como una medida cuantitativa de la tendencia
- 15 de agregación de V_H (o V_L) (cuanto mayor es el % de monómero de una V_H (o V_L), menor es su tendencia de agregación y viceversa, mayor es el % de agregados de una V_H (o V_L cuanto mayor es su tendencia de agregación).

La cromatografía de exclusión por tamaño de V_H y V_L, así como sus correspondientes mutantes de Cys, se llevó a cabo como se describió previamente (Sambrook et al., 1989; To, et al., 2005; Arbabi-Ghahroudi et al., 2009a; Arbabi-Ghahroudi et al., 2009b; Arbabi-Ghahroudi et al., 2010; Kim y Tanha, 2012). Brevemente, una columna de exclusión

20 Ghahroudi et al., 2009b; Arbabi-Ghahroudi et al., 2010; Kim y Tanha, 2012). Brevemente, una columna de exclusión de tamaño Superdex^{MR} 75 se lavó con 50 mL de ddH₂O filtrada y desgasificada y posteriormente se equilibró con 50 mL de PBS filtrado y desgasificado a una velocidad de bombeo de 0,5 mL/min. Las muestras fueron filtradas a través de unidad de filtro desechable de 0,22 µm y posteriormente sometida a cromatografía de exclusión por tamaño en un FPLC AKTA utilizando la columna Superdex con regulador PBS a un caudal de 0,5 mL/min, según las instrucciones

25 del fabricante. Los eluatos correspondientes a los picos se recogieron usando un colector de fracciones AKTA con 0,5 mL de volumen de fracción por tubo. Después de la cromatografía de exclusión por tamaño, se graficó A₂₈₀ versus el volumen de elución usando el software de gráficos GraphPad Prism (versión 4.02 para Windows; Software GraphPad, San Diego, CA) (Figura 4). El pico monomérico y los picos de agregados se integraron para obtener el % de monómero o el % de agregado.

30

35

Los valores de absorbancia (A₂₈₀) en los cromatogramas de exclusión por tamaño (SEC) se normalizaron y se graficaron contra a los volúmenes de elución. La normalización de la absorbancia se realizó de acuerdo con la siguiente fórmula:

En la que % A₂₈₀ es la absorbancia normalizada, A₂₈₀N es la absorbancia en cualquier volumen de elución, A₂₈₀M es la absorbancia máxima y A₂₈₀B es la absorbancia de referencia.

- 40 Los resultados (Figura 4A) muestran que la mutación mejoró enormemente la no agregación de proteínas en las tres V_H agregados, HVHAm302, HVHAm427 y HVHAm431. Mientras que las V_H de tipo silvestre mostraron picos de elución tempranos típicos para V_H agregadas (aproximadamente 22% para HVHAm302 y HVHAm427, y 25% para HVHAm431) además de los picos monoméricos, estos picos de elución temprana desaparecieron en los mutantes correspondientes, que consistieron esencialmente en picos monoméricos; esto indica que la modificación genética de
- 45 enlace disulfuro convirtió las V_H agregadas en V_H no agregadas. La V_H no agregada, HVHPC235, mantuvo su característica de no agregación cuando Cys mutaba a HVHPC235S como se muestra por su cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 4A). La Figura 4B muestra los perfiles de SEC representativos de los 14 mutantes de V_H de las V_H, HVHP44S, HVHB82S, HVHP421S, HVHP419S, HVHP430S, HVHP429S, HVHP429S, HVHP418, HVHP423S, HVHP423S, HVHP426S. Como se puede observar en los 4 casos
- 50 examinados (HVHP414S, HVHP420S, HVHP426S y HVHP429S), los mutantes permanecieron sin agregarse de forma similar a sus V_H de tipo silvestre progenitores. Esto demuestra nuevamente que en el caso de las V_H no agregadas, mientras que la modificación genética de disulfuro no compromete el carácter de no agregación de las V_H, mejora enormemente su estabilidad como se muestra a continuación.
- 55 Las V_L de tipo silvestre estaban esencialmente libres de agregados y daban picos simples simétricos. Los mutantes de Cys de V_L también fueron monoméricos con la excepción de HVLP364S, que mostró una ligera agregación (11% de agregado dimérico). Por lo tanto, en general, el enlace disulfuro modificado genéticamente no comprometió el carácter de no agregación de las V_L (Figura 4C).
- 60 Ejemplo 4: Mediciones de termoestabilidad por espectroscopía de dicroísmo circular (CD)

Para evaluar si el enlace disulfuro adicional modificado genéticamente en la V_H y V_L mutantes mejoraría la estabilidad de la proteína, se evaluó la estabilidad térmica mediante la medición de la temperatura de fusión (T_m) mediante espectroscopía de CD.

Para todas las V_H y V_L mutantes, se usó un espectropolarímetro Jasco J-815 equipado con un sistema de control de temperatura de tipo termoeléctrico Peltier (Jasco, Easton, MD, EE. UU.) para llevar a cabo los experimentos. Se usó una cubeta de CD con una longitud de paso de 1 mm. Los espectros se registraron en un intervalo de longitud de onda de 180-260 nm con una velocidad de barrido de 50 nm/min, tiempo de integración digital (DIT) de 4 s, un ancho de

- 5 banda de 1 nm, separación de datos de 1 nm y un tiempo de integración de 1 s. Para medir la temperatura de fusión o T_m (Greenfield, 2006a; 2006b), los espectros de CD se registraron en un intervalo de temperatura de 30 °C a 96 °C. Todos los espectros de CD se restaron del blanco correspondiente a los espectros del regulador. Las mediciones se realizaron con concentraciones de 50 µg/mL de V_H en regulador de fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4. La desnaturalización de proteínas inducida por calor se controló a 210 nm para todas las VL mutantes de Cys y para
- 10 HVHAm431, HVHAm431S y HVHP419S; a 205 nm para HVHAm427, HVHAm427S, HVHAm302, HVHAm302S, HVHB82, HVHP421, HVHP426, HVHP428, HVHP429, HVHP420S, HVHP429S, HVHM81S, HVHP430S, HVHP421S, HVHP426S, HVHP428S, HVHM41, y HVHP414S; a 220 nm para HVHPC235; a 200 nm para HVHPC235S, HVHP430, HVHP413, HVHP423, HVHM81, HVHP419, HVHP420, y HVHB82S; a 202 nm para HVHP44, HVHP414, y HVHP423S; a 208 nm para HVHP44S; y a 209 nm para HVHM41S por cambios en la elipticidad. La fracción plegada (ff) se obtuvo 15
- mediante una fórmula como se describe (Greenfield, 2006a; 2006b):

ff = $([\theta]_T - [\theta]_U)/([\theta]_F - [\theta]_U)$ fórmula l

- en la que $[\theta]_T$ es la elipticidad molar a cualquier temperatura, $[\theta]_F$, es la elipticidad molar de la proteína completamente 20 plegada a 30 °C y [θ]_U es la elipticidad molar de la proteína desplegada a 90 °C. La temperatura de fusión (T_m) se obtuvo como punto medio de la curva desplegada (fracción plegada (ff) versus temperatura) mediante un ajuste de curva de regresión no lineal (ecuación sigmoidal de Boltzman) utilizando el software de gráficos GraphPad Prism (versión 4.02 para Windows) y se registraron en la Tabla 4.
- 25 Para VL de tipo silvestre, se usó un espectropolarímetro Jasco J-810 con un accesorio de baño NESLAB RTE-111. Se usó una celda circular con una longitud de paso de 0.02 cm. Los espectros se registraron con una velocidad de barrido de 100 nm/min, un ancho de banda de 1 nm y un tiempo de integración de 1 s. Los espectros de CD se registraron en un intervalo de temperatura de 25 °C a 85 °C para HVLP342, HVLP351 y HVLP3103, de 25 °C a 80 °C para HVLP324, HVLP325, HVLP364 y HVLP389, y de 25 °C a 90 °C para HVLP335. Los cambios inducidos por calor en la elipticidad 30 molar se monitorizaron a 203 nm para HVLP325 y HVLP389 y a 218 nm para HVLP324, HVLP335, HVLP342, HVLP351, HVLP364 y HVLP3103. Las mediciones se realizaron en regulador de fosfato de sodio con concentraciones que oscilaban entre 4,1 x 10⁻⁵ M y 5,7 x 10⁻⁵ M. Todos los espectros de CD se restaron de los espectros del regulador correspondiente al blanco y se obtuvo la temperatura de fusión (Tm) como anteriormente. descrito para las VH y las VL
- 35

mutantes.

Tabla 4. Constantes de afinidad, K_D y temperaturas de fusión, T_m, de las V_H, V_L y mutantes de Cys correspondientes. Para las V_L, las K_D son contra proteína L, para las V_H contra proteína A

		Teenaa proteina 7 a
VL	K _D (μM)	T _m (°C)
HVLP324	0,2; 0,07 ª	59,1
HVLP324S	0,09 ^a	73,4
HVLP325	1	64,6
HVLP325S	1	82,5
HVLP335	2	57,9
HVLP335S	2	79,0
HVLP342	0,6, 0,04 ^a	52,6
HVLP342S	0,05 ª	63,8
HVLP351	2	54,1
HVLP351S	0,7	71,9
HVLP364	3	52,4
HVLP364S	no determinada	72,3
HVLP3103	1	55,8
HVLP3103S	1	76,4
HVLP389	1	49,3
HVLP389S	0,4, 1 °	66,3
HVHAm302 b	3,0	52,8
HVHAm302S	10	65,4
HVHAm427b	1,6	70,9
HVHAm427S	4	84,2 ^e
HVHAm431b	4	69
HVHAm431S	8	84,6 ^e

VL HVHPC235 HVHP44 HVHP44S HVHB82 HVHB82S HVHP421 HVHP421S	K _D (μM) 0,3 1,3 g 4,2 0,2 g 1,2 1,0 g 2,8 1,6 g	Tm (°C) 55,8 64,2 74,5 57,9 72,9 57,3 69,7
HVHPC235 HVHP44 HVHP44S HVHB82 HVHB82S HVHP421 HVHP421S	0,3 1,3 ^g 4,2 0,2 ^g 1,2 1,0 ^g 2,8 1,6 ^g	55,8 64,2 74,5 57,9 72,9 57,3 69,7
HVHP44 HVHP44S HVHB82 HVHB82S HVHP421 HVHP421S	1,3 ^g 4,2 0,2 ^g 1,2 1,0 ^g 2,8 1,6 ^g	64,2 74,5 57,9 72,9 57,3 69,7
HVHP44S HVHB82 HVHB82S HVHP421 HVHP421S	4,2 0,2 ^g 1,2 1,0 ^g 2,8 1,6 ^g	74,5 57,9 72,9 57,3 69,7
HVHB82 HVHB82S HVHP421 HVHP421S	0,2 ^g 1,2 1,0 ^g 2,8 1,6 ^g	57,9 72,9 57,3 69,7
HVHB82S HVHP421 HVHP421S	1,2 1,0 ^g 2,8 1,6 ^g	72,9 57,3 69,7
HVHP421 HVHP421S	1,0 ^g 2,8 1,6 ^g	57,3 69,7
HVHP421S	2,8 1,6 ^g	69,7
	1,6 ^g	
HVHP419		56,9
HVHP419S	4,8 (3,2) ^d	67,4
HVHP430	2,3 ^g	71,2/72,5 ^f
HVHP430S	7,7	82,7
HVHP429	1,3 ^g	58,5
HVHP429S	5,5 (3,4) ^d	71,8
HVHM41	0,5 g	60,8
HVHM41S	1,5 (1,8) ^d	72,2
HVHM81	1,3 ^g	65,8/67,9 ^f
HVHM81S	2,1	76,8
HVHP428	1,8 ^g	62,3
HVHP428S	1,6	73,1
HVHP420	1,2 ^g	57,8
HVHP420S	2,2	67,3
HVHP414	1,6 ^g	55,3
HVHP414S	1,8	64,7
HVHP423	3,0 ^g	55,0
HVHP423S	no determinada	70,7
HVHP413	0,3 ^g	54,2
HVHP413S	1,5	no determinada
HV _H P426	0,8 ^g	62,3/63,1 ^f
HVHP426S	3,4	79,9
HVHP235S	3	72,3
 ^a Los valores de K_D más pequ HVLP324S, HVLP342 y HVLP34. ^b Véase Tabla 1 en Arbabi-Ghahr ^c Se obtuvieron 2 K_D muy cercana ^d Los valores entre paréntesis monómero. ^e Representa la T_m mínima estima (véase los perfiles de la curva de 	ueños corresponden 2S a los sitios de alta roudi et al., (2009b). as. se obtuvieron con ada debido a una meu fusión en la Figura 5	a la unión de HVLP324. afinidad en la proteína L. mayor concentración de seta inferior no tan definida A).

^g K_D tomadas de To et al., 2005.

- Las temperaturas de fusión (T_m) de las V_H (HVHAm302 y HVHAm302S, HVHAm427 y HVHAm427S, HVHAm431 y HVHAm431S, HVHPC235 y HVHPC235S, HVHP44 y HVHP44S, HVHB82 y HVHB82S, HVHP421 y HVHP421S,
 HVHP419 y HVHP419S, HVHP430 y HVHP430S, HVHP429 y HVHP429S, HVHM41 y HVHM41S, HVHM81 y HVHM81S, HVHP428 y HVHP428S, HVHP420 y HVHP420S, HVHP414 y HVHP414S, HVHP423 y HVHP423S, HVHP413 y HVHP413S, y HVHP426 y HVHP426S) y las V_L fueron determinadas con base en los datos de elipticidad asumiendo un sistema de dos estados, que está de acuerdo con las curvas de desnaturalización observadas correspondientes a una transición aguda en la desnaturalización (Figuras 5 y 6 y Tabla 4). Los valores de T_m se
- 10 tomaron en el punto medio de las curvas de desnaturalización sigmoidal de la fracción plegada (ff) versus la temperatura. A diferencia de HVHAm302 y HVHC235, tanto HVHAm427 como HVHAm431 tenían T_m considerablemente más altas, probablemente debido a la presencia de posibles enlaces disulfuro entre CDR1-CDR3 (Figura 1A y Tabla 4). En el caso de las V_H de HVHAm302 y HVHAm302S, HVHAm427 y HVHAm427S, HVHAm431 y HVHAm431S, HVHPC235S, se encontró que las V_H mutantes tenían una T_m significativamente más
- 15 alta en comparación con sus contrapartes correspondientes de tipo silvestre (Tabla 4), (prueba t pareada, dos colas, p = 0,0008), lo que significa los efectos estabilizadores del enlace disulfuro modificado genéticamente. Las V_H de tipo silvestre tenían T_m, de 52,8 °C 70,9 °C que se incrementaron a 65,4 °C 84,6 °C para las V_H mutantes. Esto corresponde a aumentos de T_m (ΔT_m) de 12,6 °C 16,5 °C. Patrones similares se observaron en el caso de las V_H de HVHP44 y HVHP44S, HVHB82 y HVHB82S, HVHP421 y HVHP42IS, HVHP419 y HVHP419S, HVHP430 y

HVHP430S, HVHP429 y HVHP429S, HVHM41 y HVHM41S, HVHM81 y HVHM81S, HVHP428 y HVHP428S, HVHP420 y HVHP420S, HVHP414 y HVHP414S, HVHP423 y HVHP423S, HVHP413 y HVHP413S, y HVHP426 y HVHP426S en los que las V_H de tipo silvestre tenían T_m de 54,2 °C - 72,5 °C mientras que los homólogos mutantes tenían T_m de 64,7 °C - 82,7 °C. Esto corresponde a incrementos de T_m (ΔTm) de 8,9 °C - 16,8 °C, para las V_H mutantes

- 5 (Tabla 4). Al comparar los patrones de enlaces disulfuro de las V_H mutantes versus las de tipo silvestre (Tabla 2), es claro que los aumentos de T_m se deben realmente a la presencia de enlaces disulfuro adicionales de Cys49/Cys69. Sin desear limitarse a la teoría, el enlace disulfuro en HVHAm427S podría causar una alteración conformacional para acercar los módulos conformacionales, tales como las láminas beta, (actuando a través del contacto de corto o largo alcance) para inducir fuerzas químicas adicionales, tales como la interacción hidrófoba. o puentes salinos, para estabilizar aún más el andamio a ese nivel.
- 10

Las T_m de las V_L estaban en el intervalo de 49,3 °C - 64,6 °C, un intervalo observado en otros sdAb (Jespers et al., 2004; Tanha et al., 2006) (Figura 6 y Tabla 4). Como en el caso de las V_H mutantes, para todas las V_L mutantes, las T_m aumentaron drásticamente en un promedio de 17 °C (intervalo: 11.2 °C -21.1 °C) en comparación con las T_m de las

VL de tipo silvestre. Las Tm de las VL mutantes estaban en el intervalo de 63,8 °C - 82,5 °C en comparación con 49,3 15 °C - 64,6 °C para las VL de tipo silvestre. Por lo tanto, la Tm del mutante menos termoestable, HVLP342S, era comparable a la del tipo silvestre más termoestable, HVLP325 (Figura 6C); HVLP325S tenía la T_m más alta (82,5 °C). mientras que HVLP342S tenía la más baja (63,8 °C). El efecto de la modificación genética de disulfuro en la estabilidad de las V_L parece ser universal, ya que estabiliza las V_L de tipo lambda y kappa e independientemente de su origen de 20 secuencia de línea germinal.

Ejemplo 5: Resonancia de plasmón superficial (SPR)

- La propiedad de unión de proteína A y proteína L de las V_H y las V_L, respectivamente, se usó en análisis de unión de 25 SPR para explorar cualquier posible cambio estructural sutil debido a los enlaces disulfuro modificados genéticamente en mutantes de V_H y V_L. La proteína A se usa a menudo para controlar la integridad conformacional de las V_H (Starovasnik et al., 1999). Se llevaron a cabo procedimientos estándar para el análisis por SPR de las V_H y las V_L.
- Las V_H y las V_L se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño con Superdex^{MR} 75 10/300 (GL) (GE 30 Healthcare) en regulador HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%) con un caudal de 0,5 mL/min antes del análisis BIACORE y picos de monómeros purificados recogidos incluso en ausencia de evidencia de material agregado. Se determinaron por SPR las cinéticas de unión para la interacción de las V_H con la proteína A (Pierce, Nepean, ON, Canadá) y las V_L con la proteína L (Pierce) utilizando el sistema biosensor BIACORE 3000 (GE Healthcare).
- 35

Para las V_H, HVHAm302, HVHAm302S, HVHAm427, HVHAm427S, HVHAm431 y HVHAm431S, la proteína A y la ovoalbúmina (como proteína de referencia) (Sigma, Oakville, ON, Canadá) de 540 RU y 1350 RU, respectivamente, fueron inmovilizadas en chips sensores CM5 de grado investigación (GE Healthcare). Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a razón de 50 µg/mL en regulador de acetato 10 mM, pH 4,5, usando el kit de acoplamiento de aminas 40 suministrado por el fabricante (GE Healthcare). Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 ºC en regulador HBS-EP a un caudal de 50 µL/min. Las superficies se regeneraron lavando con el regulador de operación.

Para HVHPC235 y HVHPC235S, se inmovilizaron aproximadamente 1.100 RU y 1.000 RU de proteína A recombinante y ovoalbúmina (proteína de referencia), respectivamente, en el chip sensor CM5 de grado investigación. Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a razón de 50 µg/mL en regulador de acetato 10 mM (pH 4,0 o pH 4,5 para proteína 45 A u ovoalbúmina, respectivamente) usando el kit de acoplamiento de aminas suministrado por el fabricante. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C en regulador HBS-EP a un caudal de 20 µL/min o 40 µL/min para HVHPC235 o HVHPC235S, respectivamente.

- Para las V_H mutantes (HVHP44S, HVHB82S, HVHP421S, HVHP419S, HVHP430S, HVHP429S, HVHM81S, 50 HVHP428S, HVHP420S, HVHM41S, HVHP423S, HVHP413S, HVHP426S, y HVHP414S), se inmovilizaron aproximadamente 1.170 RU y 1.2400 RU de proteína A recombinante y ovoalbúmina (proteína de referencia). respectivamente, en el chip sensor CM5 de grado investigación. Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a razón de 50 µg/mL en regulador de acetato 10 mM (pH 4,5 para proteína A y ovoalbúmina) usando el kit de acoplamiento de 55 aminas suministrado por el fabricante. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C en regulador HBS-EP a un caudal de 20 µL/min o 40 µL/min para HVHB82S, HVHP421S, HVHP429S, HVHM41S, HVHM81S, HVHP423S, HVHP413S, HVHP426S, y HVHP414S o HVHP44S, HVHP419S, HVHP430S, HVHP428S y HVHP420S, respectivamente. La propiedad de unión a la proteína A de las contrapartes de tipo silvestre se determinó previamente
- (To et al., 2005). 60

Para las VL de tipo silvestre, se inmovilizaron 600 RU de proteína L u 800 RU de una proteína de referencia Fab en chips sensores CM5 de grado investigación (GE Healthcare). Para las mutantes de VL, se inmovilizaron aproximadamente 400 RU de proteína L recombinante u ovoalbúmina (proteína de referencia). Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a concentraciones de proteína de 20 o 50 µg/mL en regulador de acetato 10 mM, pH 4,5, utilizando

el kit de acoplamiento de aminas suministrado por el fabricante (GE Healthcare). Todas las mediciones se llevaron a 65

cabo a 25 °C en regulador HBS-EP a un caudal de 40 o 50 μL/min. Las superficies se regeneraron lavando con el regulador de operación. Todos los datos fueron evaluados utilizando el software BIA Evaluation 4.1 (GE Healthcare).

El análisis por SPR mostró que la gran mayoría de las VH mutantes (HVHAm302S, HVHAm427S, HVHAm431S,
 HVHPC235S, HVHB82S, HVHP421S, HVHP419S, HVHP430S, HVHP429S, HVHM81S, HVHP420S, HVHM41S,
 HVHP423S, HVHP413S, HVHP426S, y HVHP44S) unidas a proteína A con menos afinidad, reflejada por valores de K_D más altos, en comparación con sus contrapartes de tipo silvestre (Figura 7 y Tabla 4) (solo dos V_H mutantes [HVHP428S y HVHP414S] mostraron más o menos los mismos valores de K_D que sus contrapartes de tipo silvestre).
 La reducción en la unión a la proteína A (aumento en los valores de K_D) varía desde 1,6 veces para el par

- 10 HVHM81/HVHM81S hasta 10 veces para el par HVHPC235/HVHPC235S (Figura 7A y Tabla 4). Esto demuestra que el enlace disulfuro modificado genéticamente altera algo las conformaciones estructurales de las V_H. Sin desear estar ligados a la teoría, los sitios de unión a la proteína A, que se sabe que residen dentro de las FR1 y FR3 de las V_H (Starovasnik et al., 1999; Riechmann y Davies, 1995), pueden haberse visto comprometidos por la introducción de las Cys en las cadenas beta de FR2 y FR3. Curiosamente, las V_H mutantes mostraron constantes de velocidad de disociación (kdisociación) consistentemente mayores en comparación con sus contrapartes de tipo silvestre, lo que resultó
- 15 disociación (k_{disociación}) consistentemente mayores en comparación con sus contrapartes de tipo silvestre, lo que resultó en el aumento de la constante de unión de equilibrio (K_D) (Figura 7B).

Se encontró que los mutantes de Cys de V_L se unieron a la proteína L con afinidades similares a sus contrapartes de tipo silvestre (Figura 8 y Tabla 4), lo que indica que el enlace disulfuro no afectó el andamio general de las V_L.

Ejemplo 6: estabilidad a la proteasa

El efecto del enlace disulfuro modificado genéticamente sobre la estabilidad a la proteasa de las V_L y V_H se evaluó utilizando las principales proteasas GI tripsina, quimotripsina y pepsina. Después de las reacciones de digestión con
 las proteasas GI, se examinaron las V_L y las V_H para detectar la aparición de escisión enzimática por SDS-PAGE y espectrometría de masas. Las digestiones se realizaron esencialmente como se describió (Hussack et al., 2011).

Para las V_L, se realizaron experimentos de digestión en un volumen total de 30 µL con 6 µg de V_L a 37 °C durante 1 h con una relación de enzima a sdAb de 1:200, 1:40, 1:20 y 1:10 (tripsina/quimotripsina), o 1:200, 1:20, 1:10 y 1:4 (pepsina). Los experimentos de digestión tríptica y quimotríptica se llevaron a cabo utilizando enzimas de grado de secuenciación (Hoffmann-La Roche Ltd. Mississaura, ON, Canadá) de acuerdo con las instrucciones del fabricante

- secuenciación (Hoffmann-La Roche Ltd., Mississauga, ON, Canadá), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
 Las reacciones de digestión con pepsina (Sigma) se realizaron a ~pH 2,0 donde se ajustó el pH mediante la adición de un volumen apropiado de HCI 400 mM. En los experimentos de control, las enzimas se reemplazaron con un volumen igual de regulador de reacción. Las reacciones se detuvieron agregando un volumen igual de regulador de muestra SDS-PAGE (que contenía ditiotreitol 0.2 M) y ebullendo la mezcla a 95 °C durante 5 min. Posteriormente, las
- 35 muestra SDS-PAGE (que contenía ditiotreitol 0,2 M) y ebullendo la mezcla a 95 °C durante 5 min. Posteriormente, las muestras se sometieron a análisis mediante SDS-PAGE y el porcentaje de sdAb intactos después de las digestiones con proteasa se determinaron mediante análisis de densidad de puntos como se describe en Hussack et al., 2012(a) y se compararon con los controles para calcular el porcentaje de las V_L con andamio intacto después de la digestión con proteasas.
- 40

45

60

65

20

30

Para las V_H, se realizaron experimentos de digestión con tripsina/quimotripsina/pepsina en un volumen total de 30 μ L con 6 μ g de V_H y su contraparte V_H mutante en paralelo a 37 °C durante 1 h con una relación de enzima a sdAb de 1 :20 y duplicado por dos ensayos independientes. Las digestiones y análisis se llevaron a cabo como se describió para las V_L.

Los resultados se muestran en la Figura 9A. No se observaron diferencias significativas entre las V_L de tipo silvestre y mutantes en términos de resistencia a la tripsina o la quimotripsina (prueba t de pares emparejados de Wilcoxon, valores de P de dos colas = 0,2969 [tripsina] y 0,0625 [quimotripsina]), pero la diferencia en resistencia a la pepsina fue significativa (prueba t de pares emparejados de Wilcoxon, valor de P de dos colas = 0,0078). Las V_L mutantes

- 50 probadas mostraron una resistencia mejorada contra pepsina, una de las cuales, HVLP3103S, mostró un aumento dramático de 0% de resistencia (tipo silvestre) a casi 90% de resistencia (mutante). La media de resistencia a la pepsina fue del 51% para las V_L mutantes frente al 11% para las V_L de tipo silvestre con una relación de pepsina a V_L de 1:20. En la misma proporción, la mediana de la resistencia a la pepsina fue del 54% para las V_L mutantes frente al 1,5% para las V_L de tipo silvestre. Por lo tanto, la modificación genética de enlaces disulfuro de sdAb aumentó su
- 55 resistencia a la pepsina significativamente sin afectar sus propiedades de resistencia a la tripsina y la quimotripsina.

La correlación entre la estabilidad térmica y la resistencia a la proteasa se exploró adicionalmente graficando la resistencia a la proteasa (%) frente a T_m (Figura 9B). En general, las V_L con mayor T_m mostraron una mayor resistencia a la pepsina (dos colas, valor de P = 0,0012, R² (Spearman) = 0,7344). Dicha correlación no se observó en el caso de la tripsina y la quimotripsina (dos colas, valor P = 0.5245, R² (Spearman) = -0,1719 [tripsina]; dos colas, valor P = 0,5407, R² (Spearman) = -0,1653 [quimotripsina]).

En el caso de las V_H que se muestran en la Tabla 5, las V_H mutantes mostraron una mayor resistencia (% de la mediana) a las tres proteasas GI (77% y 82% [tripsina], 69% y 75% [quimotripsina] y 96% y 98% [pepsina], para las V_H de tipo silvestre y mutantes, respectivamente), aunque las diferencias no fueron tan significativas (prueba t de pares emparejados de Wilcoxon, valores de P de dos colas = 0,0899 [tripsina], 0,7896 [quimotripsina] y 0,7832 [pepsina]).

Mientras que la mayoría de las V_H mutantes mostraron resistencia sin cambios o ligeramente mejorada contra la pepsina, dos V_H mutantes (HVHM81S y HVHP423S) mostraron una resistencia disminuida del 100% (tanto para HVHM81 como para HVHP423) hasta 53% (para HVHM81S) y hasta 68% (para HVHP423S), aunque la resistencia a la pepsina de HVHM81S parecía estar subestimada debido a la incapacidad de la herramienta de análisis de densidad de puntos para reconocer las bandas de proteínas correctamente. Curiosamente, se mostraron grandes mejoras en términos de resistencia a la tripsina de dos V_H mutantes (HVHP44S y HVHP413S) donde su resistencia a la tripsina mejoró de 5% y 29% (HVHP44 y HVHP413, respectivamente) hasta 57% y 100% (HVHP44S y HVHP413S, respectivamente). Tomados en conjunto, los mutantes son tan resistentes a las proteasas como las contrapartes de

10

tipo silvestre.

5

Tabla 5. Resistencia a la proteasa GI de las V_H

Vн	Resistencia a tripsina (%)	Resistencia a quimotripsina (%)	Resistencia a pepsina (%)
HVHP44	5 ± 2	69 ± 1	95 ± 9
HVHP44S	57 ± 2	63 ± 7	100 ± 10
HVHB82	92 ± 5	100 ± 19	100 ± 16
HVHB82S	87 ± 7	64 ± 17	95 ± 28
HVHP421	74 ± 7	59 ± 7	97 ± 25
HVHP421S	100 ± 10	78 ± 31	100 ± 22
HVHP419	72 ± 7	52 ± 2	87 ± 11
HVHP419S	75 ± 3	52 ± 1	85 ± 6
HVHP430	95 ± 8	100 ± 19	100 ± 3
HVHP430S	100 ± 19	74 ± 24	100 ± 3
HVHP429	89 ± 6	70 ± 7	95 ± 28
HVHP429S	82 ± 12	86 ± 2	100 ± 5
HVHM41	11 ± 3	96 ± 32	100 ± 16
HVHM41S	22 ± 18	68 ± 13	93 ± 16
HVHM81	86 ± 4	95 ± 8	100 ± 4
HVHM81S	75 ± 1	95 ± 6	53 ± 3a
HVHP428	92 ± 1	65 ± 2	87 ± 1
HVHP428S	98 ± 4	82 ± 3	90 ± 13
HVHP420	80 ± 12	52 ± 0	77 ± 2
HVHP420S	100 ± 14	52 ± 10	100 ± 2
HVHP414	72 ± 6	35 ± 3	9 ± 7
HVHP414S	74 ± 1	49 ± 9	57 ± 15
HVHP423	61 ± 6	88 ± 21	100 ± 15
HVHP423S	82 ± 15	97 ± 29	68 ± 30
HVHP413	29	63	100
HVHP413S	100	76	100
HVHP426	84 ± 3	69 ± 2	85 ± 6
HVHP426S	76 ± 3	97 ± 15	100 ± 1
^a La resisten	icia a la pepsina es una su	lbestimación.	

Ejemplo 7: Identidades de secuencia entre las V_H y entre las V_L

15 Se determinaron las identidades de secuencia entre las V_H, así como las V_L. Solo las secuencias de FR se incluyeron en el análisis, es decir, se excluyeron las secuencias de CDR.

Las secuencias de pares de V_H o pares de V_L se alinearon usando ClustalW (Thompson et al., 1994), y el porcentaje de identidad entre los pares de V_H o pares de V_L se calculó usando el editor de alineación de secuencias BioEdit.

20

25

Las consecuencias biofísicas de las sustituciones de pares de Cys en las posiciones 49 y 69 para las V_H y 48 y 64 para las V_L son universales independientemente de su secuencia, origen de línea germinal y longitud y composición de las CDR. Las V_H tienen diversos orígenes de línea germinal y longitudes de CDR y composición de aminoácidos. En particular, la longitud y composición de CDR3 es más diversa. Sin embargo, independientemente de estas variaciones estructurales, la introducción de pares de Cys en las posiciones 49 y 69 conduce a la formación del enlace disulfuro Cys49/Cys69 y a mejoras significativas en la no agregación, la estabilidad térmica y la estabilidad a la

proteasa de las V_H sin comprometer los rendimientos de expresión. Las 32 V_L descritas en el documento WO 2006/099747 son diversas: pertenecen a las familias kappa y lambda y tienen diversos orígenes de línea germinal del segmento V y del segmento J y composiciones y longitudes de aminoácidos de la CDR. La longitud de CDR3, en 30 particular, varía de 6 a 11 aminoácidos. Se seleccionaron 8 V_L no agregadas que representan diferentes clases (Figura

50 particular, varia de 6 a 11 aminoacidos. Se seleccionaron o v_L no agregadas que representan diferences clases (rig

1B) de las 32 mencionados anteriormente para evaluar las consecuencias biofísicas de la sustitución de Cys48/Cys64. Como en el caso de las V_H, un análisis lado a lado de las 8 V_L y sus versiones mutantes de Cys mostró que, independientemente de las variaciones estructurales, la introducción de pares de Cys en las posiciones 48 y 64 conduce a la formación del enlace disulfuro Cys48/Cys64 y mejoras significativas en la estabilidad térmica y la estabilidad a la proteasa de las V_L sin comprometer su estado de no agregación o rendimientos de expresión.

Ejemplo 8: Construcción de una biblioteca de despliegue en fagos de V_L estabilizada con disulfuro

La biblioteca de despliegue en fagos de V_L de HVLP324S se construyó en dos etapas mediante el método descrito
 por Hussack et al., (2012 (c)). Primero, se construyó una biblioteca con una CDR3 aleatorizada con base en el andamio de V_L de HVLP324S (Figura 10). Luego, la biblioteca aleatorizada de CDR3 se utilizó como andamio para construir la biblioteca final con las 3 CDR aleatorizadas.

(i) Construcción de la biblioteca de despliegue en fagos de V_L aleatorizada con CDR3

15

5

El ADNcs del fago que contiene uridina en lugar de timidina (plantilla dU-ADNcs) se preparó como se describe (Hussack et al., 2012 (c)), excepto que el fago usado para la preparación del ADNcs fue fd-tetVL24S. fd-tetVL24S es un fago de fd-tetGIIID (Tanha et al., 2001) con el gen de VL de HVLP324S en su genoma y fusionado con el gen de p3 del fago (Figura 10). La incorporación de uridina en el ADNcs del fago se confirmó valorando el fago contra las

- 20 células de *E. coli* TG1 y CJ236 como se describe (Hussack et al., 2012 (c)). Se preparó un total de 75 µg de ADNcs de fd-tetVL24S en ddH₂O. La síntesis *in vitro* del ADN heterodúplex con aleatorización simultánea de CDR3 usando los cebadores VL24-CDR3, VL24-CDR3a y VL24-CDR3b se realizó como se describe (Hussack et al., 2012 (c)). Los cebadores se fosforilaron (Hussack et al., 2012 (c)) y se usaron en reacciones de hibridación. Se realizaron tres reacciones de hibridación separadas a 93 °C durante 5 min, 50 °C durante 15 min, 20 °C durante 20 min en un volumen
- total de 15 µL con 8,2 µL de 121,5 ng/µL de dU-ADNcs de fd-tetVL24S, 0,33 µL de cebadores fosforilados VL24-CDR3, VL24-CDR3a o VL24-CDR3b, 1 µL de la mezcla (2 µL de regulador TM 10x [Tris-HCI 500 mM, MgCl₂ 100 mM, pH 7,5], 2 µL de ATP 10 mM, 1 µL de DTT 100 mM, 15 µL de ddH₂O) y 1,5 µL de regulador TM 10x. El ADN circular cerrado covalentemente (CCC-ADN) se sintetizó como se describe (se preparó un total de 100 µg de CCC-ADN en ddH₂O y se concentró mediante un SpeedVac^{MR} a 82,5 µg en 255 µL (323 ng/µL). Se llevaron a cabo 23 transformaciones 11
- 30 µL de CCC-ADN más 350 µL de *E. coli* TG1 electrocompetente como se describe. Después de la incubación en medio SOC, los materiales de transformación se valoraron y se cultivaron en 1 L de 2xYT/tetraciclina (12,5 µg/mL) durante la noche a 37 °C y 180 rpm. Por la mañana, las células se recogieron y los patrones de bibliotecas congeladas como se describe. La densidad celular de los patrones de bibliotecas congeladas se estimó mediante mediciones de A_{600 nm}. El fago de la biblioteca amplificada se purificó a partir del sobrenadante, se valoró (véase Hussack et al (c)) y utilizado
- 35 como material de partida para construir la biblioteca final (véase Sección (ii)). A partir de los experimentos de valoración de los materiales de transformación (véase mas arriba), se determinó el tamaño de la biblioteca (número de transformantes) era de 2,3 x 10⁸.
 - (ii) Construcción de la biblioteca de despliegue en fagos de V_L aleatorizada con CDR1/CDR2/CDR3
- 40 En la segundo etapa de la construcción de la biblioteca, CDR1 y CDR2 fueron aleatorizados. La plantilla de dU-ADNcs se preparó comenzando con 4 x 10¹² ufc del fago anterior de la biblioteca aleatorizada con CDR3 (véase Hussack et al (c)). Se obtuvieron 200 µg de ADNcs a partir de 2 mL de fago (2 x 10⁹/µL). La incorporación de uridina en el ADNcs del fago se confirmó como anteriormente. La plantilla de dU-ADNcs se usó en la segunda ronda de mutagénesis que
- 45 usó oligonucleótidos mutagénicos VL24-CDR1 y VL24S-CDR2. La etapas de hibridación y síntesis de CCC-ADN fueron esencialmente idénticas a los descritas anteriormente. Se preparó un total de 300 µg de CCC-ADN en 1 mL de ddH₂O. Se llevaron a cabo 77 transformaciones (13 µL de CCC-ADN más 200 µL de *E. coli* TG1 electrocompetente como se describe. Después de la incubación en medio SOC, los materiales de transformación se valoraron y se cultivaron en 3 L de 2xYT/tetraciclina (5 µg/mL) durante la noche a 180 RPM y 37 °C. Se elaboraron patrones de bibliotecas
- 50 congeladas y se estimó su densidad celular como se describió anteriormente. El fago de la biblioteca se purificó del sobrenadante en un volumen final de 20 mL de PBS, se valoró contra TG1 y se almacenó congelado a -80 °C en partes alícuotas de 500 μL para futuros barrido de primera ronda como el fago de entrada. Se determinó que el tamaño de la biblioteca era de 1 x 10⁸ transformantes. Se sometieron a secuenciación 78 clones de V_L de las placas de valoración de la biblioteca (biblioteca no amplificada) como se describe en Hussack et al., (c).
- 55

Se usó V_L de HVLP324S como el andamio para la construcción de una biblioteca de V_L sintética estabilizada con disulfuro. HVLP324S es la versión mutante del HVLP324 descrito anteriormente pero con un enlace disulfuro adicional entre Cys48 y Cys64. La biblioteca de despliegue en fagos de V_L de HVLP324S se construyó mediante la introducción de diversidad en 16 (CDR3 = 9 aminoácidos), 17 (CDR3 = 10 aminoácidos) y 18 (CDR3 = 11 aminoácidos) ubicaciones

- 60 en todas las 3 CDR esencialmente como se describió para una biblioteca de despliegue en fagos de V_L de HVLP324 descrita anteriormente (Figura 11, Hussack et al., (c)). El tamaño de la biblioteca fue modesto con 1 x 10⁸ transformantes. El análisis de secuencia de 78 clones de V_L de la biblioteca no amplificada mostró que se había introducido diversidad en todas las posiciones de CDR con una aleatorización sesgada a favor de los residuos de aminoácidos de V_L (HVLP324S) parental. La secuenciación de 78 clones mostró que 2 eran idénticos a HVLP324S de
- 65 tipo silvestre, 8 tenían secuencias de tipo silvestre para CDR1, 2 tenían secuencias de tipo silvestre para CDR2, 18 tenían secuencias de tipo silvestre para CDR3, 9 tenían secuencias de tipo silvestre tanto para CDR1 como para

CDR2, 1 tenía secuencia de tipo silvestre tanto para CDR2 como para CDR3, y 2 tenían secuencias de tipo silvestre tanto para CDR1 como para CDR3. La presencia de estos clones en la biblioteca contribuye al sesgo de secuencia mencionado anteriormente.

5 Un análisis de distribución de longitud de CDR3 de los 76 clones de la biblioteca mostró que la mayoría (71%) de los clones de la biblioteca tenían una longitud de CDR3 de 9 aminoácidos. Los clones con longitudes de CDR3 de 10 y 11 aminoácidos estaban en 18% y 11%, respectivamente.

Se proporcionan detalles adicionales del diseño, construcción y caracterización de la biblioteca en la leyenda y la figura
 para la Figura 11). Los oligonucleótidos específicos utilizados son los que se proporcionan en la Tabla 6, en la que se utiliza nomenclatura IUPAC para designar los residuos de nucleótidos degenerados en la indicación de las posiciones por N, K y R.

		los para cionación molecular.	
Nombre	Secuencia (5'->3')	Propósito	SEQ ID
VL24-CDR1	AGA GTC ACC ATC ACT TGC NNK GCA AGT CAG RGC ATT	Mutagénesis	87
	NNK NNK NNK TTA NNK TGG TAT CAG CAG AAA CCA		
V _L 24S-CDR2	CCT AAA CTC CTG TGC TTT NNK GCA TCC NNK CKN	Mutagénesis	88
	NNK AGT GGG GTC CCA TCA AGG		
VL24-CDR3	TTT GCA ACT TAC TAC TGT NNK CAG NNK NNK NNK	Mutagénesis	89
	NNK CCT NNK ACG TTC GGC CAC GGG ACC		
V∟24-CDR3a	TTT GCA ACT TAC TAC TGT NNK CAG NNK NNK NNK	Mutagénesis	90
	NNK CCT NNK NNK ACG TTC GGC CAC GGG ACC		
V _L 24-CDR3b	TTT GCA ACT TAC TAC TGT NNK CAG NNK NNK NNK	Mutagénesis	91
	NNK CCT NNK NNK NNK ACG TTC GGC CAC GGG ACC	_	
-96GIII	CCC TCA TAG TTA GCG TAA CGA TCT	Secuenciación por PCR de colonias	92
fdTGIII	GTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCT	Secuenciación por PCR de colonias	93
HV∟24-BamHI	TTG TTC GGA TCC TAG GAC GGT CAC	Subclonación	94
	СТ		
HV _L 24-BbsI	TAT GAA GAC ACC AGG CCG ACA TCC	Subclonación	95
	AG		
KT124	TGT GCT ACC ACC ACT ACT ACT AAT AGC GCA GAC CCA	Mutagénesis	96
	CTC CAG CCC CTT CCC TGG		1
KT125	CAC GGT GTT CTT GGA ATT GTC TCT GGA GCA GGT GAA	Mutagénesis	97
	TCG GCC CTT CAC GGA GTC		
M13RPb	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Secuenciación por PCR de colonias	98
N: A, T, G, o C			
K: T o G			
R: A o G			

Tabla 6. Listado de oligonucleótidos utilizados para clonación molecular

15

Ejemplo 9: Validación de la biblioteca de despliegue en fagos de V_L estabilizada con disulfuro

Para validar la biblioteca de despliegue en fagos V_L HVLP324S, la biblioteca se sometió a selección para aglutinantes a dos antígenos de prueba diferentes, a saber, lisozima humana y albúmina de suero humano (HSA). Los aglutinantes candidatos positivos (las V_L desplegadas en fagos) identificados mediante ensayos de unión inicial (ELISA de fagos) se subclonaron en vectores para expresión en *E. coli*. Los aglutinantes de V_L se expresaron, purificaron y analizaron por afinidad y estabilidad.

Ejemplo 9a: barrido

- La selección de V_L de lisozima antihumana se realizó mediante técnicas de barrido estándar (véase, por ejemplo, Lee et al., 2007; Arbabi-Ghahroudi et al., 2009a). Brevemente, se recubrió un pozo de microtitulación Nunc (VWR International, Ltd., Mississauga, ON, Canadá) con 100 μL de lisozima humana de 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON, Canadá) en PBS estéril (Na₂HPO₄ 3,2 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, KCl 1,3 mM, NaCl 135 mM, pH 7,4) durante la noche a 4 °C. El pozo se lavó 3 veces con PBS estéril, se secó sobre una toalla de papel y se bloqueó con 150 μL de leche al 2% (p/v) en PBS estéril (MPBS al 2%) a 37 °C durante 2 h. El agente de bloqueo se retiró del pozo y se añadieron 100 μL de fago de biblioteca (fago amplificado preparado en el Ejemplo 8, Sección (ii) en MPBS al 1% (5 x 10¹¹ ufc; preincubado a 37 °C durante 1,5 h) al pozo y se incubaron durante 1,5 h a 37 °C. Después de 10 lavados con PBST (Tween-20 al 0,05% (v/v) en PBS estéril), los fagos se eluyeron incubando el pozo con 100 μL de trietilamina 124 mM recién preparada durante 10 minutos a temperatura ambiente, pipeteando hacia arriba y hacia abajo a los 8
- 35 124 mM recién preparada durante 10 minutos a temperatura ambiente, pipeteando hacia arriba y hacia abajo a los 8 minutos. La solución de fago eluida se neutralizó en un microtubo de 1,5 mL mezclándolo con 50 μL de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 y se mantuvo en hielo hasta la fase de infección. Se prepararon 2 x 5 mL de células *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial (DO₆₀₀ = ~ 0,5) (Arbabi-Ghahroudi et al., 2009a) en tubos Falcon estériles de 50 mL de los cuales 2 mL se infectaron a 37 °C durante 30 minutos con 145 μL de fago eluido (se mantuvieron a un lado 5 μL para determinar

el título del fago eluido como se describe a continuación). Las células infectadas se centrifugaron a 4.000 rpm y 4 °C durante 20 min utilizando el rotor y la centrífuga Sorval Legend RT (Thermo Fisher Scientific, Nepean, ON, Canadá), se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de 2xYT y se extendió igualmente en 3 placas de Petri grandes con agar 2xYT/5 µg/mL de tetraciclina (2xYT/Tet). Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante la

- 5 noche. Al día siguiente, los fagos amplificados se recuperaron de las placas de Petri grandes. Brevemente, se añadieron de 10 a 15 mL de PBS estéril (volumen agregado de acuerdo con la densidad de la colonia) a cada placa, las células se rasparon usando un esparcidor de vidrio y se recogieron en tubos Falcon estériles de 50 mL. Las células fueron raspadas una vez más como antes y agrupadas con las anteriores. La suspensión se fraccionó en sedimento celular y sobrenadante por centrifugación durante 20 minutos a 4.000 rpm y 4 °C usando un rotor y una centrífuga
- Sorval Legend RT (Thermo Fisher Scientific). Los fagos amplificados se purificaron del sobrenadante esencialmente como se describe (Lee et al., 2007). Brevemente, al sobrenadante del fago que fue prefiltrado con un filtro estéril de 0,22 µm se le añadió 1/5 de volumen de PEG-8000 al 20%/NaCl 2,5 M en tubos Falcon estériles de 50 mL, y la mezcla se incubó en hielo durante 1 h. La solución se centrifugó durante 20 minutos a 4.000 rpm y 4 °C utilizando un rotor y una centrífuga Sorval Legend RT (Thermo Fisher Scientific). El sedimento del fago se redisolvió en 3 mL de PBS
- estéril, se transfirió a un tubo Falcon estéril de 15 mL, se mezcló con 1/5 volúmenes de PEG-8000 al 20%/NaCl 2,5 M (0,6 mL) y se incubó en hielo durante 20 minutos. La solución de fago se centrifugó a 4.000 rpm y 4 °C durante 20 minutos usando un rotor y una centrífuga Sorval Legend RT (Thermo Fisher Scientific), y el sedimento de fago se disolvió en 0,5 1 mL de PBS estéril, el volumen de disolución depende del tamaño del sedimento. La solución de fago se dividió en partes alícuotas en volúmenes de 0,1 mL en un microtubo estéril de 1,5 mL. El título del fago amplificado se determinó como se describe a continuación.

Para la segunda ronda de barrido, en paralelo con el barrido convencional descrito anteriormente, también se realizó un barrido térmico en el que el fago amplificado en PBS estéril de la primera ronda se calentó a 65 °C durante 2 h en un microtubo estéril de 1,5 mL, posteriormente se centrifugó, y el sobrenadante del fago se añadió al pozo recubierto con lisozima humana para la unión (en la segunda ronda de barrido). Todos las etapas restantes fueron los mismos para ambos métodos de barrido. Se continuaron los barridos paralelos durante dos rondas más. Los lavados fueron 12x, 15x y 15x para la segunda, tercera y cuarta rondas de barrido, respectivamente.

- El barrido (barrido convencional) contra albúmina de suero humano se realizó como se describe para lisozima humana,
 excepto que no se realizó un barrido térmico en paralelo. Después del barrido, se realizó un ELISA de fagos estándar (Harrison et al., 1996; Tanha et al., 2001; Hussack et al., 2012 (c)) en clones de placas de valoración (obtenidas de fagos eluidos) para identificar las V_L de despliegue en fagos positivas para la unión con lisozima humana o albúmina de suero.
- 35 Ejemplo 9b: determinación del título del fago

50

Se usaron técnicas estándar para determinar los títulos del fago. Para determinar el título del fago eluido, se realizaron diluciones del fago eluido en PBS a 10⁻¹ - 10⁻⁴ (se añadieron 2 μL de fago a 18 μL de PBS para hacer la dilución 10⁻¹ y así sucesivamente). Se mezclaron 10 μL de cada dilución con 100 μL de células *E. coli* TG1 en crecimiento
exponencial (DO₆₀₀ = ~0,5), y las mezclas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos para que ocurriera la infección de las células *E. coli* TG1 por el fago. Las células TG1 infectadas se sembraron en placas de Petri con agar 2xYT/Tet y se incubaron a 37 °C durante la noche. El número de colonias se usó para determinar el título (ufc/mL) del fago eluido. Se realizó PCR de colonias en colonias para verificar la presencia de insertos (los resultados positivos dieron un tamaño de alrededor de 500 pb) y para proporcionar plantillas para la secuenciación de ADN usando cebadores fdTGIII
y -96GIII (Tabla 6). Las secuencias fueron analizadas y manipuladas por DNASTAR Lasergene 8.

Brevemente, para determinar el título del fago amplificado (fago de entrada), se hicieron diluciones de fago a 10⁻³, 10⁻⁶, 10⁻⁸ y 10⁻¹⁰. Se mezclaron 10 μL de cada fago diluido con 100 μL de células TG1 en crecimiento exponencial, y las mezclas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos para que ocurriera la infección de las células por el fago. Posteriormente, usando esparcidores desechables estériles, las células infectadas con fagos se extendieron sobre placas de Petri con medio de agar 2xYT/Tet y se dejaron en una superficie limpia durante 5 minutos. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C. Por la mañana, los títulos de colonias en las placas se usaron para determinar el título del fago amplificado.

- 55 Para mostrar la utilidad de la biblioteca, la biblioteca se analizó contra la lisozima humana y la albúmina de suero humano durante cuatro rondas. En el caso del barrido contra la lisozima humana, se realizó un barrido convencional en la primera ronda seguido de barrido convencional y barrido térmico en paralelo a partir de la segunda ronda en adelante. En el enfoque de barrido térmico, el fago de entrada se incubó a 65 °C durante 2 h, se centrifugó para eliminar cualquier posible agregado, y el sobrenadante se añadió al pozo recubierto con lisozima para la unión. En el
- 60 enfoque de barrido convencional, el fago de entrada (amplificado) se añadió directamente al pozo recubierto con lisozima sin el tratamiento térmico. El barrido térmico se aplicó para ver si se enriquece preferentemente para aglutinantes de V_L estables (termoestables y/o no agregados) en comparación con el barrido convencional que se esperaba que fuera indiscriminado con respecto a aglutinantes de V_L estables.
- 65 La Tabla 7 muestra los resultados del barrido contra lisozima humana con respecto al título del fago de salida (o el título del fago eluido). En general, los títulos de fagos de salida son 3 a 4 órdenes de magnitud más bajos para el

enfoque de barrido térmico en comparación con el convencional. Esto puede deberse a los títulos de fagos de entrada más bajos utilizados y a una mayor pérdida de fagos (posiblemente agregando las V_L desplegadas en fagos) para agregación durante el tratamiento térmico (datos no mostrados).

5 Tabla 7. Títulos de fagos para barridos realizados a temperatura ambiente (barrido convencional) versus condiciones de selección de 65 °C-2 h (barrido térmico). Los datos son para barrido contra lisozima humana. ufc: unidades formadoras de colonias

iornadoras de colonias.						
Ronda de barrido	Temperatura ambiente		65 °C - 2 h			
	entrada (ufc)	salida (ufc)	entrada (ufc)	salida (ufc)		
1	5 x 10 ¹¹	7 x 10 ⁴	N/A	N/A		
2	4 x 10 ¹⁰	2 x 10⁵	4 x 10 ¹⁰	2 x 10 ²		
3	7 x 10 ¹¹	2 x 10 ⁸	2 x 10 ¹⁰	6 x 10 ⁴		
4	5 x 10 ¹¹	6 x 10 ⁷	5 x 10 ¹⁰	7 x 10 ⁴		

- El ELISA de fagos y los análisis de secuencia de las rondas 3 y 4 identificaron 9 VL de lisozima antihumana con afinidades variables a la lisozima humana inmovilizada (Figura 13 y Tabla 8). Después de 4 rondas de barrido, del total de 177 VL (101 VL y 76 VL para las rondas 3 y 4, respectivamente) analizadas, sobrevivieron 5 clones del total de 9 identificados en la ronda 3: HVLHLRN; HVLHLDS; HVLHLNE; HVLHLNN; HVLHLFL (Figura 12). Estos se representaron en 54,2% y 25% para HVLHLRN y HVLHLDS, respectivamente, seguidos por 8,3%, 8,3% y 4,2% para
- 15 HVLHLNE, HVLHLNN, y HVLHLFL, respectivamente, en el enfoque de barrido térmico (65 °C, 2 h). Por el contrario, con el enfoque de barrido convencional (temperatura ambiente [RT]), HVLHLRN y HVLHLDS no estaban representados, y HVLHLNE, HVLHLNN, y HVLHLFL se produjeron con frecuencias relativas de 28,6%, 42,9% y 28,6%, respectivamente (Figura 12) HVLHLRN y HVLHLDS también fueron los clones predominantes en la ronda 3 de barrido térmico y marginalmente presentes en la ronda 3 del barrido convencional. HVLHLYS, HVLHLAQ, HVLHLQI, y HVLHLEM no se seleccionaron ni con el barrido convencional ni con el barrido térmico ni en el barrido de
- la ronda 4.

Tabla 8. Propiedades de las V_L de lisozima antihumana y de albúmina de suero antihumana aisladas de las rondas 3 v 4 del barrido

j i dei saintae				
VL	<i>K</i> ⊳(µM)	T _m (°C)	Monómero/Ag.	Selección
HVLHLRN (SEQ ID NO: 101)	0,05	74	Monómero	65°C - 2 h
HVLHLDS (SEQ ID NO: 100)	6,1	68,3	Monómero	65°C - 2 h
HVLHLEM (SEQ ID NO: 104)	>73	72,2	Monómero	RT
HVLHLAQ (SEQ ID NO: 103)	0,2	66,5	Ag. (7%)	RT
HVLHLQI (SEQ ID NO: 105)	2,6	62	Ag. (17%)	RT
HVLHLNE (SEQ ID NO: 102)	0,06	62	Ag. (13%)	RT/65 °C - 2 h
HVLHLYS (SEQ ID NO: 106)	6,4	66,8	Ag. (7%)	RT
HVLHLNN (SEQ ID NO: 99)	0,2	62,6	Ag. (12%)	RT/65 °C - 2 h
HVLHLFL (SEQ ID NO: 108	ND	ND	ND	RT/65 °C - 2 h
HVLHSA1 (SEQ ID NO: 107)	0,8	71	Monómero	RT
ND, no determinado; RT, temperatura ambiente; Ag., agregado. Los % son % de agregados.				

25

Después de 4 rondas de barrido contra la albúmina de suero humana, el cribado de 50 clones mediante ELISA de fagos y la secuenciación revelaron una V_L predominante, a saber, HVLHSA1 (Figura 13; Tabla 8) que fue positiva mediante ELISA de fagos para la unión a la albúmina de suero humana.

30 Todos los 10 aglutinantes de V_L de fagos antilisozima y antialbúmina se procesaron posteriormente para una caracterización adicional como se describe a continuación.

Ejemplo 9c: Caracterización biofísica de las VL de lisozima antihumana y albúmina de suero antihumana

- 35 Partiendo de los clones de V_L desplegados en fagos, se clonaron, expresaron y purificaron las V_L mediante técnicas estándar como se describió anteriormente para otros dominios de anticuerpos. Las V_L se analizaron posteriormente mediante cromatografía de exclusión por tamaño para determinar el estado de agregación, mediante CD para termoestabilidad, y mediante resonancia de plasmón superficial para su afinidad y especificidad de unión.
- 40 Nueve V_L de lisozima antihumana y V_L de HVLHSA1 (Figura 13; Tabla 8) se clonaron y se expresaron en *E. coli* y se purificaron mediante técnicas estándar como se describe para otros dominios. Como las V_L tenían etiquetas His6 en sus terminales C, se purificaron por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. La Figura 16A muestra los perfiles del cromatograma de IMAC de las V_L purificadas que muestra el intervalo de A₂₈₀ de 400 mAU (HVLHLEM) a 2400 mAU (HVLHLRN) para los picos de elución más altos. Los perfiles SDS-PAGE de las V_L muestran que las V_L

son muy puras (Figura 16B). El rendimiento de la expresión de HVLHSA1 también fue alto según su perfil de cromatograma de IMAC (datos no mostrados). Por lo tanto, las V_L pueden expresarse con altos rendimientos en *E. coli* con alta pureza.

- 5 Posteriormente, se analizó el comportamiento de agregación de las V_L mediante cromatografía de exclusión por tamaño Superdex^{MR}75. El % de agregación (o % de monómero) para cada V_L también se determinó como se describe (Arbabi-Ghahroudi et al., 2010). Como se muestra en la Figura 14A, 3 V_L de lisozima antihumana (HVLHLRN, HVLHLEM y HVLHLDS) eran puramente monoméricas (no agregadas), mientras que el resto de los aglutinantes de V_L se estaban agregando con % de agregados que variaban del 7% al 17% (Tabla 8) V_L de HVLHSA1 también se
- 10 analizó por cromatografía de exclusión por tamaño como se describe para otros dominios. El cromatograma produjo un pico monomérico simétrico que demuestra que la V_L era 100% monómero no agregado (Figura 14A; Tabla 8). Estos resultados muestran que las bibliotecas de V_L (o V_H) con la característica de enlace disulfuro Cys48/Cys64 (o Cys49/Cys69) no canónica producen aglutinantes no agregados.
- Para obtener una medida de la termoestabilidad de los aglutinantes de V_L, las temperaturas de fusión (T_m) de las V_L se determinaron mediante CD como se describió anteriormente para otros dominios. La Figura 14B muestra los perfiles de fusión de las V_L de lisozima antihumana que están en el intervalo de 62 °C a 74 °C. Las T_m calculadas se registran en la Tabla 8. La T_m de HVLHSA1 antialbúmina también se determinó y se muestra que es alta: 71 °C (Figura 14B; Tabla 8). Estas T_m son significativamente más altas que las V_L sin el enlace disulfuro no canónico, lo que demuestra
- 20 que las bibliotecas de V_L (o V_H) con la característica de enlace disulfuro Cys48/Cys64 (o Cys49/Cys69) no canónico producen aglutinantes más estables. En el caso del barrido de lisozima humana, HVLHLRN y HVLHLDS que no se agregan (Tabla 8) y tienen las T_m más altas también fueron los clones que se enriquecieron de manera muy significativa a través de la agregación, menos termoestables por barrido térmico y no por barrido convencional. Esto demuestra que si bien ambos enfoques de barrido producen aglutinantes termoestables no agregados, el barrido térmico es más
- 25 eficiente para enriquecerlos. (El hecho de que HVLHLEM, que no era agregante y termoestable y, sin embargo, incluso no se seleccionó en la ronda 4 mediante barrido térmico, podría deberse a su muy baja afinidad durante la etapa de unión del barrido [Figura 12; Tabla 8]). La Figura 14C muestra que existe una fuerte correlación positiva entre T_m y % de monómero de las V_L antilisozima y antialbúmina (R² = 0,8568; valor P (dos colas) = 0,0013, Spearman r = 0,9061), lo que significa que cuanto mayor sea la T_m de una V_L, más probable es que la V_L no se agregue. Esto también significa
- 30 que, dado que las bibliotecas de V_L/V_H con la característica de enlace disulfuro no canónica producen aglutinantes de V_L/V_H más termoestables que las bibliotecas sin esta característica, también producen más aglutinantes de V_L/V_H no agregados. Como agentes terapéuticos, los aglutinantes de V_L/V_H no agregados y termoestables son más eficaces.

También se determinaron las afinidades (K_D) de las V_L de lisozima antihumana con su antígeno, la lisozima humana. 35 La unión de la lisozima humana a los aglutinantes de VL de lisozima antihumana inmovilizados se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando BIACORE 3000 (GE Healthcare). 298 unidades de resonancia (RU), 312 RU, 295 RU, 339 RU, 315 RU, 412 RU, 370 RU, 345 RU y 349 RU de cada aglutinante de V_L (HVLHLAQ, HVLHLNE, HVLHLEM, HVLHLYG, HVLHLRN, HVLHLNN, HVLHLQI, HVLHLYS, y HVLHLDS, respectivamente) se inmovilizaron en un chip sensor CM5 de grado investigación. Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a 40 concentraciones de 10 µg/mL en acetato 10 mM a pH 4,5 usando el kit de acoplamiento de aminas suministrado por el fabricante. La lisozima humana se pasó a través de una columna Superdex 75 (GE Healthcare) en regulador HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%) con un caudal de 0,5 mL/min para eliminar cualquier posible agregado antes del análisis Biacore. Para los estudios de unión, los análisis se llevaron a cabo a 25 °C en HEPES 10 mM, pH 7,4 que contenía NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%. Los caudales utilizados fueron 20 µL/min. Para la regeneración, las superficies se lavaron durante 15 minutos con el 45 regulador de operación. Los datos se analizaron con el software BIAevaluation 4.1. Los perfiles de unión y las K_D calculadas se muestran en la Figura 15 y la Tabla 8. A partir de los perfiles de SPR (Figura 15), se puede ver que las VL de lisozima antihumana se unen de hecho a su antígeno objetivo, la lisozima, confirmando los resultados de unión obtenidos por ELISA de fagos. Las afinidades de unión calculadas (KD) son diversas, con un buen número de ellas 50 con altas afinidades ($K_D = 0.05 \ \mu M - 0.2 \ \mu M$).

La K_D de la V_L contra la albúmina de suero humano se determinó por resonancia de plasmón superficial como se describe para otros dominios anteriores. Brevemente, la unión de la V_L a la albúmina de suero humana inmovilizada se determinó mediante SPR usando el BIACORE 3000 (GE Healthcare). Aproximadamente 1.600 RU de albúmina de suero humano, 1.900 RU de albúmina de suero bovino y 2.200 RU de ovoalbúmina se inmovilizaron en un chip sensor

- CM5 de grado investigación. Se preparó una superficie bloqueada con etanolamina, como referencia, exactamente de la misma manera que las superficies proteicas. Las inmovilizaciones se llevaron a cabo a concentraciones de 20 μg/mL en regulador de acetato 10 mM pH 4,5 usando el kit de acoplamiento de aminas suministrado por el fabricante. La VL se pasó a través de una columna Superdex 75 (GE Healthcare) para eliminar cualquier posible agregado antes del
- 60 análisis Biacore. Para los estudios de unión, los análisis se llevaron a cabo a 25 °C en HEPES 10 mM, pH 7,4 que contenía NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%. Los caudales utilizados fueron de 40 μL/min y los volúmenes de muestra fueron de 60 μL. Para la regeneración, la superficie se lavó durante 10 minutos con el regulador de operación. Los datos se analizaron con el software BIAevaluation 4.1. La Figura 17 muestra claramente que la V_L se une a su antígeno objetivo, albúmina de suero humana. Se determinó que la K_D calculada era de 0,8 μM (Tabla 8).
- 65 La unión fue específica ya que la V_L no se unió a la ovoalbúmina ni a la albúmina de suero bovino.

Por lo tanto, los resultados muestran que los dominios de V_H y V_L con enlaces disulfuro no canónicos son factibles como andamios para construir bibliotecas sintéticas de V_H/V_L que son fuentes de aglutinantes de antígenos con alta afinidad, estabilidad (no agregación y termoestabilidad), y rendimientos de expresión.

5 Ejemplo de referencia 10: Construcción de una biblioteca de despliegue en fagos de V_H estabilizada con disulfuro

Los experimentos se diseñaron para crear una biblioteca de despliegue en fagos de V_H con CDR aleatorizadas construidas en un andamio de V_H estabilizada por un enlace disulfuro adicional en las posiciones 49 y 69. Para construir la biblioteca, se usó una biblioteca de despliegue en fagos de V_H (HVHP430LGH3) como plantilla para introducir un enlace disulfuro adicional reemplazando dos residuos de aminoácidos seleccionados (49Ser y 69Ile) con

- 10 introducir un enlace disulfuro adicional reemplazando dos residuos de aminoácidos seleccionados (49Ser y 69Ile) con cisteínas utilizando el método descrito anteriormente para la biblioteca de V_L y previamente (Sidhu et al., 2000; Hussack et al (c)). La biblioteca de despliegue en fagos de HVHP430LGH3 es una biblioteca con base en vectores de fagémidos con los genes de V_H humanos aleatorizados con CDR clonados en el fagémido pMED-1 y fusionados con el gen de la proteína 3. (Publicación PCT WO2009/079093 "dominios de V_H humanos no agregados").
- 15

El procedimiento para construir la biblioteca de despliegue en fagos de V_H estabilizados con disulfuro se realizó esencialmente como se describió anteriormente y en Hussack et al., (c) y Sidhu et al., 2000). Brevemente, la construcción se realizó mediante dos rondas separadas de mutagénesis dirigida al sitio en los dos residuos de aminoácidos seleccionados para ser reemplazados por cisteínas. En primer lugar, se preparó dU-ADNcs (ADN de

- 20 fago de cadena sencilla que contiene uridina) usando *E. coli* CJ236 infectado con fago (4 x 10¹² ufc (unidad formadora de colonias)) de la biblioteca de HVHP430LGH3. Después de confirmar la incorporación de uridina en el dU-ADNcs mediante la determinación de títulos contra *E. coli* TG1 y CJ236 como se describió anteriormente y en Hussack et al (c), una serie de reacción de síntesis de ADN *in vitro* que incluye la fosforilación del cebador KT124 para hibridación para mutagenizar 49Ser por 49Cys, ligación y polimerización se realizaron posteriormente usando 20 µg del dU-
- 25 ADNcs. La reacción de síntesis de ADN *in vitro* dio como resultado 23 μg de ADN heterodúplex en total. Las siguientes 10 transformaciones separadas usando 50 μL de células competentes *E. coli* TG1 con 564 ng del ADN heterodúplex para cada transformación produjo la diversidad de 1,1 x 10¹⁰ ufc en total. Las selecciones clonales por PCR con cebadores (M13RPa o b y -96GIII) revelaron que aproximadamente el 50% (8 de 16) de los clones tenían la mutación 49Ser por 49Cys. Para la siguiente ronda de mutagénesis, se preparó el fago de la biblioteca de fagémidos mutados
- 30 49Ser por 49Cys ((HVHP430LGH3C1)) rescatándolos con fago auxiliar M13K07, lo que resultó en el título de fago de 2,1 x 10¹³ ufc/mL. Posteriormente, se preparó dU-ADNcs a partir de *E. coli* CJ236 usando el fago (4 x 10¹² ufc) de (HVHP430LGH3C1) que fue seguido por una reacción de síntesis de ADN *in vitro* con 8 µg del dU-ADNcs y el cebador KT125 que se hibrida para mutagenizar otro residuo de aminoácido (69lle por 69Cys), dando como resultado 12 µg de ADN heterodúplex en total. Las siguientes 22 transformaciones separadas usando 50 µL de células competentes
- 35 E. coli TG1 con 230 ng del ADN heterodúplex para cada transformación produjo un tamaño de biblioteca de 5,3 x 10⁹ ufc en total. Para determinar el porcentaje de la biblioteca que representa los genes de V_H que tienen mutaciones dobles (49Ser por 49Cys y 69lle por 69Cys), se seleccionaron 65 colonias por PCR con cebadores (M13RP a o b y 96GIII), se secuenciaron y analizaron, revelando que 28% (18 de 65) de los clones tenían mutaciones dobles (49Ser por 49Cys), 35% (23 de 65) tenían mutaciones sencillas (49Ser por 49Cys), 15% (10 de 65) tenían
- 40 la mutación sencilla 69lle por 69Cys, y 22% (14 de 65) no tenían mutaciones. Por lo tanto, el tamaño de la biblioteca con ambas mutaciones Cys (HVHP430LGH3C2) se corrigió a 1,5 x 10⁹ ufc (= 5,3 x 10⁹ x 28%) de acuerdo con el resultado de la selección clonal. La biblioteca de despliegue en fagos HVHP430LGH3C2 se amplificó en 300 mL de 2xYT, las células de la biblioteca se resuspendieron en 15 mL de glicerol al 10%, y posteriormente se mantuvieron como alícuotas de 1 mL a -80°C.
- 45

La diversidad de la biblioteca es alta (5,3 x 10^9 transformantes) con las mutaciones estabilizadoras adicionales 49Ser por 49Cys y 69lle por 69Cys en todos sus miembros de V_H. La biblioteca debería proporcionar aglutinantes con alta estabilidad a los antígenos objetivo, debido a la presencia de enlaces disulfuro Cys49/Cys69 en sus miembros de V_H, utilizando las técnicas de selección y barrido estándar conocidas en el arte.

50 Referencias

Amzel, L. M., y Poljak, R. J. (1979) Three-dimensional Structure of immunoglobulins. Annu. Rev. Biochem. 48, 961-997.

Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., y Tanha, J. (2009a) Selection of non-aggregating VH binders from synthetic V_H phage-display libraries. Methods Mol. Biol. 525, 187-216.

Arbabi-Ghahroudi, M., To, R., Gaudette, N., Hirama, T., Ding, W., MacKenzie, R., y Tanha, J. (2009b) Aggregation resistant VHs selected by in vitro evolution tend to have disulfide-bonded loops and acidic isoelectric points. Protein Eng. Des. Sel. 22, 59-66.

Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., y Tanha, J. (2010) Site-directed mutagenesis for improving biophysical properties of VH domains. Methods Mol. Biol. 634, 309-330.

65

Bell, A., Wang, Z. J., Arbabi-Ghahroudi, M., Chang, T. A., Durocher, Y., Trojahn, U., Baardsnes, J., Jaramillo, M. L., Li, S., Baral, T. N., O'Connor-McCourt, M., Mackenzie, R., y Zhang, J. (2010) Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. Cancer Lett. 289, 81-90.

5 Betz, S. F. (1993) Disulfide bonds and the stability of globular proteins. Protein Sci. 2, 1551-1558.

Bloom, J. D., Labthavikul, S. T., Otey, C. R., y Arnold, F. H. (2006) Protein stability promotes evolvability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 5869-5874.

10 Chothia, C., y Lesk, A. M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196,901-917.

Davies, J., y Riechmann, L. (1994) 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. FEBS Lett. 339, 285-290.

Davies, J., y Riechmann, L. (1995) Antibody VH domains as small recognition units. Biotechnology N. Y. 13, 475-479.

Davies, J., y Riechmann, L. (1996a) Single antibody domains as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. Protein Eng. 9, 531-537.

- Davies, J., y Riechmann, L. (1996b) Affinity improvement of single antibody V_H domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding. Immunotechnology 2, 169-179.
- de Kruif, J., y Logtenberg, T. (1996) Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semisynthetic antibody phage display library. J. Biol. Chem. 271, 7630-7634.

Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy M., y Wall R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J. Mol. Biol. 179, 125-142.

30 Greenfield, N. J. (2006a) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary Structure. Nat. Protoc. 1, 2876-2890.

Greenfield, N. J. (2006b) Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism. Nat. Protoc. 1, 2891-2899.

35 Harrison, J. L., Williams, S. C., Winter, G., y Nissim, A. (1996) Screening of phage antibody libraries. Methods Enzymol. 267, 83-109.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., y Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension
 using the polymerase chain reaction. Gene 77, 51-59.

Holliger, P., y Hudson, P. J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat. Biotechnol. 23, 1126-1136.

45 Hoogenboom, H. R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nat. Biotechnol. 23, 1105-1116.

Holt, L. J., Herring, C., Jespers, L. S., Woolven, B. P., y TomLinson, I. M. (2003) Domain antibodies: proteins for therapy. Trends Biotechnol. 21, 484-490.

50 Horwich, A. (2002) Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. J. Clin. Invest. 110, 1221-1232.

Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L., Chan, W. y Wetzel, R. (1994) A role of destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 5446-5450.

- Hussack, G., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, C. R., y Tanha, J. Isolation and Characterization of Clostridium difficile toxin-specific single-domain antibodies. Methods Mol Biol. 2012; 911:211-39. doi: 10.1007/978-1-61779-968-6_14.
- (a). Hussack, G., MacKenzie, C. R., y Tanha, J. Functional characterization of single-domain antibodies with an engineered disulfide bond. Methods Mol Biol. 2012; 911:417-29. doi: 10.1007/978-1-61779-968-6_25.

(b). Hussack, G., Keklikian, A., Alsughayyir, J., Hanifi-Moghadam, P., Arbabi-Ghahroudi, M., van Faassen, H., Hou, S. T., Sad, S., MacKenzie, R., y Tanha, J. A VL single-domain antibody library yields a high-propensity of non-aggregating binders. Protein Eng Des Sel. Junio de 2012; 25(6): 313-8. doi: 10.1093/protein/gzs014. Epub abril 6 de 2012.

65

55

15

(c). Hussack, G., Hirama, T., Ding, W., MacKenzie, R. & Tanha, J. (2011). Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. PLoS ONE, 6, e28218.

- Iqbal, U., Trojahn, U., Albaghdadi, H., Zhang, J., O'Connor-McCourt, M., Stanimirovic, D., Tomanek, B., Sutherland,
 G., y Abulrob, A. (2010) Kinetic analysis of novel mono- and multivalent VHH-fragments and their application for molecular imaging of brain tumours. Br. J. Pharmacol. 160, 1016-1028.
 - Jespers, L., Schon, O., Famm, K., y Winter, G. (2004) Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. Nat. Biotechnol. 22, 1161-1165.
- 10

15

50

60

Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M, Gottesman, K. S., y Koeler, C. (ed.) (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. US Department of Health and Humano Services, US Public Health Service, Bethesda, MD.

Kazlauskas, R. J., y Bornscheuer, U. T. (2009) Finding better protein engineering strategies. Nat. Chem. Biol. 5, 526-529.

Kim, D. Y, y Tanha, J. (2010) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for screening nonaggregating human antibody heavy chain variable domains. Anal. Biochem. 403, 117-119.

20 Kim, D. Y. Ding, W., y Tanha, J. Solubility and stability engineering of human VH domains. Methods Mol. Biol. 2012: 911: 355-72.

Kim, D. Y., Ding, W., Hirama, T., Ryan, R., MacKenzie, R., y Tanha, J. Disulfide linkage engineering for improving biophysical properties of VH domains. Protein Engineering, Design and Selection, 2012; Vol 25, (10).

- 25 Kunkel, T.A., Roberts, J. D, y Zakour, R. A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Methods Enzymol. 154,367-382.
- Lee, C. M., Iorno, N., Sierro, F., y Christ, D. (2007) Selection of human antibody fragments by phage display. Nat. 30 Protoc. 2, 3001-3008.

Lithwick G, Margalit H (2003) Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. Genome Research 13: 2665-73.

35 Merritt, E. A., y Hol, W. G. (1995) AB5 toxins. Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 165-171.

Mitraki, A., y King, J. (1992) Amino acid substitutions influencing intracellular protein folding pathways. FEBS Lett. 307, 20-25.

40 Nielsen, U. B., Adams, G. P., Weiner, L. M., y Marks, J. D. (2000) Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells es independent of the intrinsic antibody affinity. Cancer Res. 60, 6434-6440.

Porath, J., y Flodin, P. (1959) Gel filtration: a method for desalting and group separation. Nature 183, 1657-1659.

45 Riechmann, L., y Davies, J. (1995) Backbone assignment, secondary Structure and protein A binding of an isolated, human antibody VH domain. J. Biomol. NMR. 6, 141-152.

Ridgway, J. B., Presta, L. G., y Carter, P. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng. 9, 617-621.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (ed.) (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sidhu, S. S., Lowman, H. B., Cunningham, B. C., y Wells, J. A. (2000) Phage display for selection of novel binding peptides. Methods Enzymol. 328, 333-63.

Starovasnik, M. A., O'Connell, M. P., Fairbrother, W. J., y Kelley, R. F. (1999) Antibody variable region binding by Staphylococcal protein A: thermodynamic analysis and location of the Fv binding site on E-domain. Protein Sci. 8, 1423-1431.

- Tanha, J., Nguyen, T.D., Ng, A., Ryan, S., Ni, F., y Mackenzie, R. (2006) Improving solubility and refolding efficiency of human VHs by a novel mutational approach. Protein Eng. Des. Sel. 19, 503-509.
- Tanha, J., Xu, P., Chen, Z., Ni, F., Kaplan, H., Narang, S. A. y MacKenzie, C. R. (2001) Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. J. Biol. Chem. 276, 24774-24780.

To, R., Hirama, T., Arbabi-Ghahroudi, M., MacKenzie, R., Wang, P., Xu, P., Ni, F. y Tanha, J. (2005) Isolation of monomeric human VHs by a phage selection. J. Biol. Chem. 280, 41395-41403.

Ward, E. S., Gussow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T., y Winter, G. (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. Nature 341, 544-546.

Wetzel, R., Perry, L. J., Baase, W. A., y Becktel, W. J. (1988) Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 401-405.

10 Williams, A. F., y Barclay, A. N. (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. Annu. Rev. Immunol. 6, 381-405.

Worn, A., y Pluckthun, A. (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. J. Mol. Biol. 305, 989-1010.

- Wu, S. L., Jiang, H., Lu, Q. Dai, S., Hancock, W. S., Karger, B. L. (2009) Mass spectrometric determination of disulphide linkages in recombinant therapeutic proteins using online LC-MS with electron-transfer dissociation. Anal. Chem. 81, 112-122.
- 20 Yau, K. Y. F., Dubuc, G., Li, S., Hirama, T., Mackenzie, C. R., Jermutus, L., Hall, J. C., y Tanha, J. (2005) Affinity maturation of a VHH by mutational hotspot randomization. Immunol. Methods 297, 213-224.

Zhang, J., Li, Q., Nguyen, T.-D., Tremblay, T.-L., Stone, E., To, R., Kelly, J. y MacKenzie, C. R. (2004a) A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents. J. Mol. Biol. 341, 161-169.

Zhang, J., Tanha, J., Hirama, T., Khieu, N. H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.-R. y MacKenzie, C. R. (2004b) Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: A novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. J. Mol. Biol. 335, 49-56.

Zhang, J., Liu, X., Bell, A., To, R., Baral, T. N., Azizi, A., Li, J., Cass, B., y Durocher, Y.(2009) Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. Protein Expr. Purif. 65, 77-82.

WO 95/04069

5

15

25

30

35

45

WO/2004/076670

WO2003/046560

40 WO2006/099747

Listado de secuencias

<110> National Research Council of Canada KIM, Dae-Young TANHA, Jamshid

<120> MODIFICACIÓN GENÉTICA DE DOMINIOS DE INMUNOGLOBULINA

<130> 12181-98

50 <140> 61/437.174

<141> 2011-01-28

<160> 108 55

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

60 <211> 125

<212> PRT

<400> 1

<213> HVHAm302 - Humano

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Thr Val Ser Asp Glu Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Thr Asp Asn Arg Ser Cys Gln Thr Ser Leu Cys Thr Ser Thr Thr 100 105 Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 2 <211> 125 <212> PRT <213> HVHAm302S - Humano

<400> 2
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Thr Val Ser Asp Glu 2.0 Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Thr Asp Asn Arg Ser Cys Gln Thr Ser Leu Cys Thr Ser Thr Thr Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 3 <211> 116 <212> PRT <213> HVHAm427 - Humano <400> 3 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Thr Leu Ser Pro Glu Cys Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ser Cys Glu Gly Glu Asn Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 4 <211> 116 <212> PRT <213> HVHAm427S - Humano <400> 4 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Thr Leu Ser Pro Glu Cys Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ser Cys Glu Gly Glu Asn Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 5 <211> 125 <212> PRT <213> HVHAm431 - Humano <400> 5

ES 2 746 559 T3

	Gln 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Leu	Ile	Lys	Pro	Gly 15	Gly
	Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Tyr	Thr	Val	Ser 30	Ser	Glu
	Cys	Met	Gly 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
	Ser	Ala 50	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly 55	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val
	Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser 75	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr 80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
	Val	Arg	Asp	Ser 100	Lys	Asn	Cys	His	Asp 105	Lys	Asp	Cys	Thr	Arg 110	Pro	Tyr
	Cys	Ser	Trp 115	Gly	Gln	Gly	Thr	Met 120	Val	Thr	Val	Ser	Ser 125			
<210> 6																
<211> 125																
<212> PRT																
<213> HVHAn	n431S	- Hun	nano													
<400> 6																

	Gln 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Leu	Ile	Lys	Pro	Gly 15	Gly
	Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Tyr	Thr	Val	Ser 30	Ser	Glu
	Cys	Met	Gly 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
	Cys	Ala 50	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser 55	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val
	Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser 75	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr 80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
	Val	Arg	Asp	Ser 100	Lys	Asn	Cys	His	Asp 105	Lys	Asp	Cys	Thr	Arg 110	Pro	Tyr
	Cys	Ser	Trp 115	Gly	Gln	Gly	Thr	Met 120	Val	Thr	Val	Ser	Ser 125			
<210> 7																
<211> 119																
<212> PRT																

5

<213> HVHPC235 - Humano

<400> 7

<210> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Val Ile Ser Glu Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val His Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Lys Lys Ile Asp Gly Ala Arg Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 8 <211> 119 <212> PRT <213> HVHPC235S - Humano <400> 8 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Val Ile Ser Glu

Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val His Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Lys Lys Ile Asp Gly Ala Arg Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 9 <211> 107 <212> PRT <213> HVLP324 - Humano <400> 9 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro 70 75 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

15 <210> 10

	<211> 107																
	<212> PRT																
5	<213> HVLP3	24S -	Huma	no													
	<400> 10																
		Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
		Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala 25	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser 30	Thr	Tyr
		Leu	Asn	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys 45	Leu	Leu	Cys
		Phe	Ala 50	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln 55	Ser	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Cys
		Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Asn	Leu	Gln	Pro 80
		Glu	Asp	Phe	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln 90	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro 95	Arg
10		Thr	Phe	Gly	His 100	Gly	Thr	Lys	Val	Thr 105	Val	Leu					
10	<210> 11																
	<211> 106																
15	<212> PRT																
	<213> HVLP3	25 - H	uman	C													
	<400> 11																

	Glu 1	Ile	Val	Leu	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Thr	Thr 10	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 15	Gly
	Glu	Arg	Ala	Thr 20	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala 25	Ser	Gln	Ser	Val	Gly 30	Arg	Tyr
	Leu	Ala	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro 40	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg 45	Leu	Leu	Val
	Phe	Asp 50	Thr	Ser	Asn	Arg	Ala 55	Pro	Gly	Val	Pro	Ala 60	Arg	Phe	Ser	Gly
	Arg 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Leu 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro 80
	Glu	Asp	Ser	Ala	Val 85	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln 90	Arg	Ser	Ser	Gly	Leu 95	Thr
	Phe	Gly	Gly	Gly 100	Thr	Lys	Val	Thr	Val 105	Leu						
<210> 12																
<211> 106																
<212> PRT																
<213> HVLP3	25S -	Huma	no													
<400> 12																

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Cys 4.5 Phe Asp Thr Ser Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Cys Arg Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Arg Ser Ser Gly Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu <210> 13 <211> 108 <212> PRT <213> HVLP335 - Humano <400> 13 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu Pro Gly Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys <210> 14 <211> 108 <212> PRT <213> HVLP335S - Humano <400> 14 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Cys Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu Pro Gly Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys <210> 15 <211> 107 <212> PRT

<213> HVLP342 - Humano

	<400> 15																
		Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
		Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala 25	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg 30	Thr	Asp
		Leu	Asp	Trp 35	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro 40	Gly	Arg	Ala	Pro	His 45	Arg	Leu	Ile
		Tyr	Gly 50	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln 55	Gly	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Gly
		Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Gly	Leu	Gln	Pro 80
		Glu	Asp	Phe	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln 90	His	His	Thr	Tyr	Pro 95	Arg
5		Thr	Phe	Gly	Leu 100	Gly	Thr	Lys	Val	Thr 105	Val	Leu					
	<210> 16																
10	<211> 107																
10	<212> PRT																
	<213> HVLP3	842S -	Huma	no													
15	<400> 16																

	Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
	Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala 25	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg 30	Thr	Asp
	Leu	Asp	Trp 35	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro 40	Gly	Arg	Ala	Pro	His 45	Arg	Leu	Cys
	Tyr	Gly 50	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln 55	Gly	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Cys
	Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Gly	Leu	Gln	Pro 80
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln 90	His	His	Thr	Tyr	Pro 95	Arg
	Thr	Phe	Gly	Leu 100	Gly	Thr	Lys	Val	Thr 105	Val	Leu					
<210> 17																
<211> 107																
<212> PRT																
<213> HVLP3	351 - H	luman	0													

5

<400> 17

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Ser Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Asn Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu <211> 107 <212> PRT <213> HVLP351S - Humano Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Cys Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Ser Ala Arg Phe Ser Cys

<210> 18

<400> 18

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

ES 2 746 559 T3

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Asn Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu <210> 19 <211> 107 <212> PRT <213> HVLP364 - Humano <400> 19 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Thr Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys <210> 20 <211> 107 <212> PRT

<213> HVLP364S - Humano

<400> 20

		Glu 1	Thr	Thr	Leu	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr 10	Leu	Ser	Val	Ser	Pro 15	Gly
		Glu	Arg	Ala	Thr 20	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala 25	Ser	Gln	Ser	Val	Ser 30	Asn	Asn
		Leu	Ala	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg 45	Leu	Leu	Cys
		Tyr	Gly 50	Ala	Ser	Ser	Arg	Thr 55	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp 60	Arg	Phe	Ser	Cys
		Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro 80
		Glu	Asp	Phe	Ala	Val 85	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln 90	Tyr	Asp	Thr	Ser	Pro 95	Arg
		Thr	Phe	Gly	Gln 100	Gly	Thr	Lys	Val	Glu 105	Ile	Lys					
5	<210> 21																
	<211> 110																
10	<212> PRT																
10																	

<213> HVLP389 - Humano

<400> 21

	Gln 1	Ser	Val	Val	Thr 5	Gln	Pro	Pro	Ser	Val 10	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly 15	Gln
	Arg	Val	Thr	Ile 20	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser 25	Ser	Tyr	Asn	Ile	Gly 30	Glu	Asn
	Ser	Val	Ser 35	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu 40	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro 45	Lys	Leu	Leu
	Ile	Tyr 50	Gly	Asn	Asp	Lys	Arg 55	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro 60	Asp	Arg	Phe	Ser
	Gly 65	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr 70	Ser	Ala	Thr	Leu	Gly 75	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln 80
	Thr	Gly	Asp	Glu	Ala 85	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly 90	Thr	Trp	Asp	Ser	Asn 95	Leu
	Arg	Ala	Ser	Val 100	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr 105	Lys	Val	Thr	Val	Leu 110		
<210> 22																
<211> 110																
<212> PRT																
<213> HVLP3	389S -	Huma	no													

	Gln 1	Ser	Val	Val	Thr 5	Gln	Pro	Pro	Ser	Val 10	Ser	Ala	Ala	Pro	Gly 15	Gln
	Arg	Val	Thr	Ile 20	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser 25	Ser	Tyr	Asn	Ile	Gly 30	Glu	Asn
	Ser	Val	Ser 35	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu 40	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro 45	Lys	Leu	Leu
	Cys	Tyr 50	Gly	Asn	Asp	Lys	Arg 55	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro 60	Asp	Arg	Phe	Ser
	Cys 65	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr 70	Ser	Ala	Thr	Leu	Gly 75	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln 80
	Thr	Gly	Asp	Glu	Ala 85	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly 90	Thr	Trp	Asp	Ser	Asn 95	Leu
	Arg	Ala	Ser	Val 100	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr 105	Lys	Val	Thr	Val	Leu 110		
<210> 23																
<211> 107																
<212> PRT																
<213> HVLP3	3103 -	Huma	no													

		Glu 1	Thr	Thr	Leu	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr 10	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 15	Gly
		Glu	Arg	Ala	Thr 20	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala 25	Ser	Gln	Ser	Val	Arg 30	Asn	Asn
		Leu	Ala	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro 40	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg 45	Leu	Leu	Ile
		Tyr	Gly 50	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala 55	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala 60	Arg	Phe	Ser	Gly
		Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Ser	Leu	Gln	Val 80
		Glu	Asp	Val	Ala	Val 85	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln 90	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Pro 95	Lys
		Thr	Phe	Gly	Gln 100	Gly	Thr	Lys	Val	Glu 105	Ile	Lys					
	<210> 24																
5	<211> 107																
	<212> PRT																
	<213> HVLP3	3103S	- Hum	ano													

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Asn 20 25 30 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Cys 35 40 45 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Cys 50 55 60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Val 65 70 75 80 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Thr Thr Pro Lys 85 90 95 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105 <210> 25 <211> 12 <212> PRT <213> Humano <400> 25 Ser Cys Gln Thr Ser Leu Cys Thr Ser Thr Thr Arg 1 5 10 <210> 26 <211> 19 <212> PRT <213> Humano <400> 26 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Thr Val Ser Asp Glu Ser Met Thr 1 5 10 15 Trp Val Arg <210> 27 <211> 14 <212> PRT

5

10

15

20

25

```
<213> Humano
     <400> 27
 5
                    Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Thr Asp Asn Arg
                    1
                                    5
                                                         10
     <210> 28
10
     <211> 12
     <212> PRT
     <213> Humano
15
     <400> 28
                    Ser Cys Gln Thr Ser Leu Cys Thr Ser Thr Thr Arg
                    1
                                       5
                                                               10
20
     <210> 29
     <211> 22
     <212> PRT
25
     <213> Humano
     <400> 29
               Gly Leu Glu Trp Val Cys Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
               1
                                  5
                                                         10
                                                                                15
               Tyr Ala Asp Ser Val Lys
                             20
30
     <210> 30
     <211> 5
35
     <212> PRT
     <213> Humano
40
     <400> 30
                                     Phe Thr Cys Ser Arg
                                                        5
                                     1
     <210> 31
45
     <211> 19
     <212> PRT
50
     <213> Humano
     <400> 31
               Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Thr Val Ser Asp Glu Ser Met Thr
               1
                                5
                                                     10
                                                                          15
55
```

Trp Val Arg <210> 32 <211> 14 5 <212> PRT <213> Humano 10 <400> 32 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Thr Asp Asn Arg 5 1 10 15 <210> 33 <211> 22 <212> PRT 20 <213> Humano <400> 33 Gly Leu Glu Trp Val Cys Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 1 5 10 15 Tyr Ala Asp Ser Val Lys 25 20 <210> 34 <211> 5 30 <212> PRT <213> Humano 35 <400> 34 Phe Thr Cys Ser Arg 5 1 <210> 35 40 <211> 19 <212> PRT 45 <213> Humano <400> 35 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Val Ile Ser Glu Ser Met Thr 5 1 10 15 Trp Val Arg 50 <210> 36 <211> 12

	<212> PRT
5	<213> Humano
-	<400> 36
	Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Lys
10	-210> 37
10	<211> 22
	<212> ADN
15	<213> M13Rpa - Humano
	<400> 37
20	tcacacagga aacagctatg ac 22
20	<210> 38
	<211> 40
25	<212> ADN
	<213> KT131 - Humano
30	<400> 38
	accactacta ctaatagcgc agacccactc cagccccttc 40
	<210> 39
35	<211> 24
	<212> ADN
40	<213> M13FP - Humano
	<400> 39
	cgccagggtt ttcccagtca cgac 24
45	<210> 40
	<211> 51
50	<212> ADN
	<213> KT129 - Humano
	<400> 40
55	gcagactccg tgaagggccg attcacctgc tccagagaca attccaagaa c 51
	<210> 41
60	<211> 56
	<212> ADN
	<213> KT130 - Humano

<400> 41 tgcgctatta gtagtagtgg tggtagcaca tactacgcag actccgtgaa gggccg 56 5 <210> 42 <211> 6 10 <212> PRT <213> Humano <400> 42 15 Val Thr Ile Thr Cys Arg 1 5 <210> 43 <211> 15 20 <212> PRT <213> Humano 25 <400> 43 Leu Leu Cys Phe Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg 1 5 10 15 <210> 44 30 <211> 34 <212> PRT 35 <213> Humano <400> 44 Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn 1 5 10 15 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr 20 25 30 Pro Arg 40 <210> 45 <211>6 45 <212> PRT <213> Humano 50 <400> 45 Ala Thr Leu Ser Cys Arg 1 5

	<210> 46																
	<211> 26																
5	<212> PRT																
	<213> Humar	าด															
	<400> 46																
10		Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
		1				5					10					15	
		Asp	Ser	Ala	Val 20	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln 25	Arg						
	<210> 47																
15	<211> 9																
	<212> PRT																
20	<213> Humar	าด															
20	<400> 47																
					Leu 1	Leu	Суз	s Ph	e As 5	sp T	hr :	Ser	Asn	Arg	J		
25	<210> 48																
	<211> 4																
30	<212> PRT																
30	<213> Humar	าด															
	<400> 48																
							P	he	Ser	Cys	Ar	g					
35							1										
	<210> 49																
40	<211> 9																
	<212> PRT																
	<213> Humar	าด															
45	<400> 49																
					Leu 1	Leu	Суз	з Ту	r G] 5	ly T	hr :	Ser	Asn	Arg	3		
50	<210> 50																
	<211> 16																
	<212> PRT																
55	<213> Humar	าด															
	<400> 50																

Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Val Arg 1 5 10 15 <210> 51 5 <211>6 <212> PRT <213> Humano 10 <400> 51 Ala Thr Leu Ser Cys Arg 1 5 15 <210> 52 <211> 19 20 <212> PRT <213> Humano <400> 52 25 Leu Glu Pro Gly Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser 5 1 10 15 Ser Pro Arg 30 <210> 53 <211>6 <212> PRT 35 <213> HVHPM81S - Humano <400> 53 Val Thr Ile Thr Cys Arg 5 1 40 <210> 54 <211> 15 45 <212> PRT <213> Humano <400> 54 50 Leu Cys Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg 5 1 10 15 <210> 55 55 <211> 35 <212> PRT

```
<213> Humano
     <400> 55
               Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly
               1
                              5
                                                   10
                                                                       15
               Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His His Thr
                                                                   30
                           20
                                               25
               Tyr Pro Arg
5
                       35
    <210> 56
     <211>6
10
     <212> PRT
     <213> Humano
    <400> 56
15
                                 Ala Thr Leu Ser Cys Arg
                                 1
                                                    5
    <210> 57
20
     <211>9
    <212> PRT
25
    <213> Humano
     <400> 57
                          Leu Leu Cys Tyr Asp Ala Ser Asn Arg
                          1
                                             5
30
    <210> 58
     <211> 30
35
    <212> PRT
    <213> Humano
     <400> 58
40
               Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
               1
                               5
                                          10
                                                                       15
               Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
                           20
                                   25
                                                                   30
    <210> 59
45
    <211> 11
     <212> PRT
```

```
<213> Humano
     <400> 59
                      Leu Leu Cys Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Thr Arg
                                         5
                      1
                                                                  10
5
     <210> 60
     <211> 16
10
     <212> PRT
     <213> Humano
     <400> 60
15
          Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
          1
                                                     10
                             5
                                                                              15
     <210> 61
20
     <211>6
     <212> PRT
     <213> Humano
25
     <400> 61
                                  Ala Thr Phe Ser Cys Arg
                                  1
                                                      5
30
     <210> 62
     <211> 19
     <212> PRT
35
     <213> Humano
     <400> 62
40
                Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Thr
                                5
                                                     10
                                                                         15
                1
                Ser Pro Arg
     <210> 63
45
     <211> 8
     <212> PRT
     <213> Humano
50
     <400> 63
                              Leu Leu Cys Tyr Gly Asn Asp Lys
                              1
                                                 5
55
     <210> 64
```

<211> 5 <212> PRT 5 <213> Humano <400> 64 Phe Ser Cys Ser Lys 5 1 10 <210> 65 <211> 29 15 <212> PRT <213> Humano 20 <400> 65 Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Tyr Asn Ile Gly Glu Asn Ser 1 5 10 15 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys 20 25 <210> 66 25 <211> 30 <212> PRT 30 <213> Humano <400> 66 Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp 1 5 10 15 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Asn Leu Arg 20 25 30 35 <210> 67 <211>6 40 <212> PRT <213> Humano <400> 67 45 Ala Thr Leu Ser Cys Arg 5 1 <210> 68 50 <211>9 <212> PRT

```
<213> Humano
     <400> 68
5
                           Leu Leu Cys Tyr Gly Ala Ser Thr Arg
                                               5
                            1
     <210> 69
     <211> 35
10
     <212> PRT
     <213> Humano
15
     <400> 69
                Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
                                5
                1
                                                     10
                                                                           15
                Leu Gln Val Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Thr
                            20
                                                 25
                                                                      30
                Thr Pro Lys
                     35
20
     <210> 70
     <211> 124
     <212> PRT
25
     <213> HVHP44S - Humano
     <400> 70
                Glu Val Gl<br/>n Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gl<br/>n\mbox{Pro} Gly Gly
                1
                                5
                                                      10
                                                                           15
                Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                            20
                                                 25
                                                                       30
                Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                        35
30
                                             40
                                                                  45
```

Cys Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Glu Pro Arg Ser Val Ser Gly Leu Arg Gly Val Val Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser <210> 71 <211> 113 <212> PRT <213> HVHB82S - Humano <400>71 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Thr Asp Met Glu Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

Sei

15 <210>72

<211> 123

<212> PRT

<213> HVHP421S - Humano

<400> 72																
	Gln 1	Leu	Gln	Leu	Gln 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Val	Val	Gln	Pro	Gly 15	Arg
	Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Ser	Tyr
	Ala	Met	Ser 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
	Cys	Ala 50	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly 55	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val
	Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser 75	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr 80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
	Ala	Lys	Asp	Gly 100	Lys	Gly	Gly	Ser	Ser 105	Gly	Tyr	Asp	His	Pro 110	Asp	Tyr
	Trp	Gly	Gln 115	Gly	Thr	Leu	Val	Thr 120	Val	Ser	Ser					
<210> 73																
<211> 122																
<212> PRT																
<213> HVHP	419S -	- Hum	ano													
<400> 73	<u></u>	T	<u></u>	T			0	C]	<u></u>	<u></u>	T	¥7 -]	<u></u>	Dur	<u></u>	C 1
	1	теп	GTU	Leu	5 5	GIU	ser	GIY	GLΥ	GIY 10	Leu	val	GIU	PLO	15	GTÀ
	Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Ser	Tyr
	Ala	Met	Ser 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
	Cys	Ala 50	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly 55	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val

Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Gly Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Trp Ser Gly Ser Ser Tyr Gly Gly Asp Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser <210> 74 <211> 125 <212> PRT <213> HVHP430S - Humano <400>74 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Glu Tyr Arg Cys Ser Gly Thr Ser Cys Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 75 <211> 119

<213> HVHP429S - Humano

<212> PRT

		Glu 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Thr 10	Leu	Val	Gln	Pro	Gly 15	Gly
		Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ile 30	Asn	Tyr
		Ala	Met	Ser 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Asp	Lys	Gly	Leu 45	Asp	Trp	Val
		Cys	Thr 50	Ile	Ser	Asn	Asn	Gly 55	Gly	Ala	Thr	Tyr	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val
		Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser 75	Asn	Asn	Thr	Leu	Tyr 80
		Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
		Ala	Lys	Gly	Pro 100	Ile	Asn	Thr	Gly	Arg 105	Tyr	Gly	Asp	Trp	Gly 110	Gln	Gly
		Thr	Leu	Val 115	Thr	Val	Ser	Ser									
5	<210> 76																
	<211> 123																
	<212> PRT																

<213> HVHM41S - Humano

<400> 76

<400> 75

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Gly Met Val Arg Gly Val Ser Ser Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser <210> 77 <211> 121 <212> PRT <213> HVHM81S - Humano <400>77 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Ile Thr Gly Pro Thr Gly Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 78 <211> 123 <212> PRT <213> HVHP428S - Humano <400> 78 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile 70 75 80 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Lys Asp Gly Tyr Asn Ser Pro Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser <210> 79 <211> 119 <212> PRT <213> HVHP420S - Humano <400>79 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala -30 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Arg Ile Lys Thr Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

> Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Arg Asp His Ser Ser Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser <210> 80 <211> 119 <212> PRT <213> HVHP414S - Humano <400> 80 Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Cys Arg Ile Thr Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Val Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Asp Gln Ala Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser <210> 81 <211> 118 <212> PRT <213> HVHP423S - Humano <400> 81 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Ser
	Arg 1	Met	Ser 35	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Met	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
	Cys	Val 50	Ile	Tyr	Ser	Gly	Gly 55	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala 60	Asp	Ser	Val	Arg
	Gly 65	Arg	Phe	Ser	Cys	Ser 70	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys 75	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu 80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu 85	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr 90	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys 95	Ala
	Arg	Glu	Arg	Glu 100	Gly	Ala	Val	Thr	Arg 105	Glu	Asp	Trp	Gly	Gln 110	Gly	Thr
	Leu	Val	Thr 115	Val	Ser	Ser										
<210> 82																
<211> 119																
<212> PRT																
<213> HVHF	9413S -	Hum	ano													
<400> 82																
	Gln ' 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Leu	Val	Lys	Pro	Gly 15	Gly
	Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Asp	Tyr
	Tyr 1	Met	Ser 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
	Cys	Phe 50	Ile	Tyr	Ser	Gly	Gly 55	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala 60	Asp	Ser	Val	Lys
	Gly 65	Arg	Phe	Thr	Cys	Ser 70	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys 75	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu 80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu 85	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr 90	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys 95	Ala
	Arg	Glu	Ser	Arg 100	Val	Gly	Gly	Gly	Ala 105	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly 110	Gln	Gly
					Т	hr M	et Va 1	al Th 15	nr Va	ıl Se	r Se	r				

<210> 83 <211> 120 5 <212> PRT <213> HVHP426S - Humano <400> 83 10 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg 1 5 10 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Asp Gly Tyr 20 25 30 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45 Cys Val Thr Asn Asn Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys 50 55 60 Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu 75 70 65 80 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95 Arg Gln Ser Ile Thr Gly Pro Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln 100 105 110 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser 115 120 <210> 84 15 <211> 25 <212> PRT <213> Humano 20 <400> 84 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Val Glu Trp Val Cys Val Thr Asn Asn Gly 5 10 1 15 Gly Ser Thr Ser Ala Asp Ser Val Lys 25 20 25 <210> 85 <211> 5 <212> PRT 30

<213> Humano <400> 85 Phe Thr Cys Ser Arg 1 5 5 <210> 86 <211> 8 10 <212> PRT <213> Humano 15 <400> 86 Gly Ser Gly Ser Lys Ala Ala Ala 5 1 <210> 87 20 <211> 69 <212> ADN <213> VL24-CDR1 25 <220> <221> característica nueva 30 <222> (19).(20) <223> n es a, c, g, o t 35 <220> <221> k <222> (21).(21) 40 <223> k es t o g <220> 45 <221> r <222> (31).(31) <223> r es a o g 50 <220> <221> característica nueva 55 <222> (37).(38) <223> n es a, c, g, o t <220> 60 <221> k <222> (39).(39)

<223> k es t o g

<220>

5

15

25

<221> característica nueva

<222> (40).(41)

10 <223> n es a, c, g, o t

<220>

- <221> k
- <222> (42).(42)

<223> k es t o g

20 <220>

<221> característica nueva

- <222> (43).(44)
- <223> n es a, c, g, o t

<220>

30 <221> k

<222> (45).(45)

<223> k es t o g

<220>

35

<221> característica nueva

40 <222> (49).(50)

<223> n es a, c, g, o t

<220> 45

55

60

<221> k

<222> (51).(51)

50 <223> k es t o g

<400> 87

	agagtcacca	tcacttgcnn	kgcaagtcag	rgcattnnkn	nknnkttann	ktggtatcag	60
	cagaaacca						69
<210>	88						
<211>	54						
<212>	ADN						
<213>	VL24S-CDR2 ·	- Humano					

<220>

	<221> característica nueva
5	<222> (19).(20)
5	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
10	<221> k
	<222> (21).(21)
15	<223> k es t o g
10	<220>
	<221> característica nueva
20	<222> (28).(29)
	<223> n es a, c, g, o t
25	<220>
	<221> k
	<222> (30).(30)
30	<223> k es t o g
	<220>
35	<221> k
	<222> (32).(32)
	<223> k es t o g
40	<220>
	<221> característica nueva
45	<222> (33).(35)
	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
50	<221> k
	<222> (36).(36)
55	<223> k es t o g
	<400> 88
	cctaaactcc tgtgctttnn kgcatccnnk cknnnkagtg gggtcccatc aagg 54
60	<210> 89
	<211> 60
65	<212> ADN

<213> VL24-CDR3 - Humano

	<220>
F	<221> característica nueva
5	<222> (19).(20)
	<223> n es a, c, g, o t
10	<220>
	<221> k
15	<222> (21).(21)
15	<223> k es t o g
	<220>
20	<221> característica nueva
	<222> (25).(26)
25	<223> n es a, c, g, o t
20	<220>
	<221> k
30	<222> (27).(27)
	<223> k es t o g
35	<220>
55	<221> característica nueva
	<222> (28).(29)
40	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
15	<221> k
40	<222> (30).(30)
	<223> k es t o g
50	<220>
	<221> característica nueva
55	<222> (31).(32)
00	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
60	<221> k
	<222> (33).(33)
65	<223> k es t o g
50	<220>

	<221> característica nueva	
Б	<222> (34).(35)	
5	<223> n es a, c, g, o t	
	<220>	
10	<221> k	
	<222> (36).(36)	
15	<223> k es t o g	
10	<220>	
	<221> característica nueva	
20	<222> (40).(41)	
	<223> n es a, c, g, o t	
25	<220>	
20	<221> k	
	<222> (42).(42)	
30	<223> k es t o g	
	<400> 89	
35	tttgcaactt actactgtnn kcagnnknnk nnknnkcctn nkacgttcgg ccacgggacc	60
00	<210> 90	
	<211> 63	
40	<212> ADN	
	<213> VL24-CDR3a - Humano	
45	<220>	
10	<221> característica nueva	
	<222> (19).(20)	
50	<223> n es a, c, g, o t	
	<220>	
55	<221> característica nueva	
	<222> (25).(26)	
	<223> n es a, c, g, o t	
60	<220>	
	<221> característica nueva	
65	<222> (28).(29)	
00	<223> n es a, c, g, o t	

	<220>
F	<221> k
5	<222> (30).(30)
	<223> k es t o g
10	<220>
	<221> característica nueva
15	<222> (31).(32)
15	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
20	<221> característica nueva
	<222> (34).(35)
25	<223> n es a, c, g, o t
20	<220>
	<221> k
30	<222> (36).(36)
	<223> k es t o g
35	<220>
	<221> k
	<222> (39).(39)
40	<223> k es t o g
	<220>
45	<221> característica nueva
	<222> (40).(41)
	<223> n es a, c, g, o t
50	<220>
	<221> k
55	<222> (42).(42)
	<223> k es t o g
	<220>
60	<221> característica nueva
	<222> (43) (44)

<221> k

<222> (44).(44)

<223> k es t o g <220>

- 10 <221> k
 - <222> (51).(51)

<223> k es t o g

<220>

15

25

5

<221> k

20 <222> (54).(54)

<223> k es t o g

<400> 90

- tttgcaactt actactgtnn kcagnnknnk nnknnkcctn nknnkacgtt cggccacggg 60
- acc 63

<210> 91

30 <211>66

<212> ADN

<213> VL24-CDR3b - Humano 35

<220>

<221> característica nueva

40 <222> (19).(20)

<220>

<223> n es a, c, g, o t

45

55

<221> característica nueva

<222> (25).(26)

50 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

<222> (28).(29)

<223> n es a, c, g, o t

60 <220>

<221> k

<222> (30).(30)

<223> k es t o g

5 <220>

10

<221> característica nueva

- <222> (31).(32)
- <223> n es a, c, g, o t

<220>

- 15 <221> característica nueva
 - <222> (34).(35)

<223> n es a, c, g, o t

20 <220>

<221> k

25 <222> (36).(36)

<223> k es t o g

- <220>
- 30

<221> k

<222> (39).(39)

35 <223> k es t o g

<220>

- <221> característica nueva 40
- <222> (40).(41)

<223> n es a, c, g, o t

45 <220>

<221> k

<222> (42).(42) 50

<223> k es t o g

<220>

55 <221> característica nueva

<222> (43).(44)

<223> n es a, c, g, o t 60

<220>

<221> k

65 <222> (45).(45)

<223> k es t o g

<220>

5 <221> característica nueva

<222> (46).(47)

<223> n es a, c, g, o t

10

20

<221> k

<220>

15 <222> (51).(51)

<223> k es t o g

<220>

<221> k

<222> (54).(54)

25 <223> k es t o g

<220>

- <221> k 30
- <222> (57).(57)

<223> k es t o g

35 <400> 91

tttgcaactt	actactgtnn	kcagnnknnk	nnknnkcctn	nknnknnkac	gttcggccac	6	0
						~	· ~

gggacc

66

<210> 92 40

<211> 24

<212> ADN

45 <213> -96GIII - Humano

<400> 92

ccctcatagt tagcgtaacg atct 24 50

<210> 93

<211> 27

55 <212> ADN

<213> fdTGIII - Humano

<400> 93

60

gtgaaaaaat tattattcgc aattcct 27

<210> 94

	<211> 26	
-	<212> ADN	
5	<213> HVL24-BamHI - Humano	
	<400> 94	
10	ttgttcggat cctaggacgg tcacct 26	
	<210> 95	
45	<211> 26	
15	<212> ADN	
	<213> HVL24-BbsI - Humano	
20	<400> 95	
	tatgaagaca ccaggccgac atccag 26	
05	<210> 96	
25	<211> 54	
	<212> ADN	
30	<213> KT124 - Humano	
	<400> 96	
25	tgtgctacca ccactactac taatagcgca gacccactcc agccccttcc ctgg	54
30	<210> 97	
	<211> 54	
40	<212> ADN	
	<213> KT125 - Humano	
45	<400> 97	
40	cacggtgttc ttggaattgt ctctggagca ggtgaatcgg cccttcacgg agtc	54
	<210> 98	
50	<211> 17	
	<212> ADN	
55	<213> M13RPb - Humano	
55	<400> 98	
	caggaaacag ctatgac 17	
60	<210> 99	
	<211> 107	
65	<212> PRT	
00	<213> HVLHLNN - Humano	

	<400> 99																
		Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
		Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala 25	Ser	Gln	Ser	Ile	Asn 30	Asn	Arg
		Leu	Tyr	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys 45	Leu	Leu	Cys
		Phe	Pro 50	Ala	Ser	Phe	Leu	Phe 55	Ser	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Cys
		Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Asn	Leu	Gln	Pro 80
		Glu	Asp	Phe	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln 90	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro 95	Arg
5		Thr	Phe	Gly	His 100	Gly	Thr	Lys	Val	Thr 105	Val	Leu					
	<210> 100																
	<211> 107																
10	<212> PRT																
	<213> HVLHI	_DS -	Huma	ano													
4 5	<400> 100																
15		Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
		Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Thr	Val 25	Ser	Gln	Gly	Ile	Asp 30	Ser	Arg

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Cys Phe Pro Ala Ser Leu Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Leu <210> 101 <211> 109 <212> PRT <213> HVLHLRN - Humano <400> 101 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Cys Phe Pro Ala Ser Ile Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gln Pro Gly Leu Pro Asn Ser Arg Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Leu <210> 102 <211> 107 <212> PRT

<213> HVLHLNE - Humano

	<400> 102																
		Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
		Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Asp	Ala 25	Ser	Gln	Ser	Ile	Asn 30	Glu	Arg
		Leu	Tyr	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys 45	Leu	Leu	Cys
		Phe	Pro 50	Ala	Ser	Ile	Leu	Thr 55	Ser	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Cys
		Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Asn	Leu	Gln	Pro 80
		Glu	Asp	Phe	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Arg	Gln 90	Pro	Arg	Ser	Gly	Pro 95	Ser
		Thr	Phe	Gly	His 100	Gly	Thr	Lys	Val	Thr 105	Val	Leu					
5	<210> 103																
	<211> 108																
10	<212> PRT																
10	<213> HVLHL	_AQ -	Huma	ano													
	<400> 103																
		Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
		Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Gly	Ala 25	Ser	Gln	Ser	Ile	Ala 30	Gln	Arg
		Leu	Tyr	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys 45	Leu	Leu	Cys
		Phe	Pro 50	Ala	Ser	Leu	Leu	His 55	Ser	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Cys
		Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Asn	Leu	Gln	Pro 80
		Glu	Asp	Phe	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln 90	Arg	Ala	Ser	Pro	Pro 95	Arg
15						00					50					20	

<210> 104

<211> 109

<212> PRT

5

<213> HVLHLEM - Humano

10 <400> 104

	Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
	Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala 25	Ser	Gln	Gly	Ile	Glu 30	Met	Phe
	Leu	Gln	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys 45	Leu	Leu	Cys
	Phe	Ala 50	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln 55	Ser	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Cys
	Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 70	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 75	Ser	Asn	Leu	Gln	Pro 80
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr 85	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln 90	Pro	Gly	Val	Ala	Pro 95	Pro
	Pro	Gly	Thr	Phe 100	Gly	His	Gly	Thr	Lys 105	Val	Thr	Val	Leu			
<210> 105																
<211> 108																
<212> PRT																
<213> HVLH	LQI -	Huma	ano													
<400> 105																
	Asp 1	Ile	Gln	Met	Thr 5	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser 10	Leu	Ser	Ala	Ser	Val 15	Gly
	Asp	Arg	Val	Thr 20	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala 25	Ser	Gln	Ser	Ile	Gln 30	Ile	Met
	Leu	Asp	Trp 35	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro 40	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys 45	Leu	Leu	Cys
	Phe	Gly 50	Ala	Ser	Phe	Leu	Ile 55	Ser	Gly	Val	Pro	Ser 60	Arg	Phe	Ser	Cys

15

20 <213> H

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Arg Gln Thr Trp Thr Pro Pro Ala Pro Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Leu <210> 106 <211> 107 <212> PRT <213> HVLHLYS - Humano <400> 106 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Lys Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Cys Phe Pro Ala Ser Leu Leu Trp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Ala Ala Asp Pro His Arg Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Arg Leu <210> 107 <211> 109 <212> PRT <213> HVLHSA1 - Humano <400> 107 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Cys Phe Gly Ala Ser Arg Leu Asn Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Arg Gln Leu Phe Pro Leu Pro Asp Arg Arg Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Leu <210> 108 <211> 107 <212> PRT <213> HVLHLFL - Humano <400> 108 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Ser Ile Phe Leu Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Cys Phe Phe Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

REIVINDICACIONES

1. Un andamio de inmunoglobulina sintética que comprende uno o más de un enlace disulfuro no canónico en la región marco (FR), en la que el andamio es una cadena ligera variable (VL) y está en el formato de un dominio variable único de inmunoglobulina con tres CDR, en el que el enlace disulfuro no canónico se forma entre un residuo de Cys en la posición 46-49 de la región FR2 y un residuo de Cys en la posición 62-66 de la región FR3 de una V_L, en la que dicho enlace disulfuro no canónico proporciona una estabilidad mejorada en comparación con el andamio de inmunoglobulina sin dicho enlace y en el que la numeración se refiere a la numeración de Kabat.

- 10 2. El andamio de la reivindicación 1, en la que el andamio es parte de una proteína o fragmento de anticuerpo más grande seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo de un solo dominio (sdAb), scFv, Fab, F(ab)₂ o inmunoglobulina madura.
 - 3. El andamio de la reivindicación 1, en la que el andamio de inmunoglobulina deriva de una V_L humana.
- 15

5

- 4. El andamio de la reivindicación 1 en el que la V_L es de la familia kappa o lambda.
- 5. El andamio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los andamios son multimerizados.
- 20 6. El andamio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el andamio se fusiona con un fragmento Fc, una secuencia de direccionamiento, una secuencia señal y una etiqueta de purificación, o cualquier combinación de las mismas.

7. El andamio de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el andamio de
inmunoglobulina comprende las regiones marco de secuencias seleccionadas del grupo que consiste en

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPKLLCFAASTLQSGVPSRFSCSGSGTDF TLTISNLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGHGTKVTVL (SEQ ID N0:10);

EIVLTQSPTTLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLAWYQQRPGQAPRLLCFDTSNRAPGVPARFSCRGSGTL FTLTISSLEPEDSAVYFCQQRSSGLTFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:12);

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSSLAWYQQKPGQAPRLLCYGTSNRATGIPDRFSCSGSGTH FTLTINRLEPGDFAVYYCQQYGSSPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:14);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTDLDWFQQRPGRAPHRLCYGASSLQGGVPSRFSCSGSGTE

30

FTLTISGLQPEDFATYYCLQHHTYPRTFGLGTKVTVL (SEQ ID NO:16);

EIVMTQSPVTLSLSPGERATLSCRASQSVGTSLAWYQQKPGQAPRLLCYDASNRATGISARFSCSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRYNWPRTFGGGTKVTVL (SEQ ID N0:18);

ETTLTQSPATLSVSPGERATFSCRASQSVSNNLAWYQQKPGQAPRLLCYGASSRTTGIPDRFSCSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDTSPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:20);

QSVVTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSSYNIGENSVSWYQQLPGTAPKLLCYGNDKRPSGIPDRFSCSKSGTS ATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSNLRASVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:22);

ETTLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRNNLAWYQQRPGQAPRLLCYGASTRATGIPARFSCSGSGTD FTLTISSLQVEDVAVYYCQQYYTTPKTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:24);

ES 2 746 559 T3

o secuencias sustancialmente idénticas a las mismas, que retienen los enlaces disulfuro canónicos y no canónicos y en las que los residuos que comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 pueden ser cualquier secuencia adecuada.

5 8. Un ácido nucleico que codifica el andamio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.

10. Una célula u organismo huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.

10

11. Una biblioteca recombinante que comprende al menos un andamio como se define en la reivindicación 1 o 2, en la que el andamio comprende además una multiplicidad de secuencias de CDR adecuadas, en las que la multiplicidad de secuencias de CDR proporciona una diversidad de al menos 10⁵, al menos 10⁶, al menos 10⁷, y hasta 10⁸ clones por biblioteca.

15

12. El andamio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el andamio está inmovilizado sobre una superficie.

13. El andamio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el andamio está enlazado a una molécula de carga.

20

14. Una composición que comprende el andamio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

FR4	11 34567890123 MGQGTMVTVSS MGQGTMVTVSS	NGQGTMVTVSS WGQGTMVTVSS	WGQGTMVTVSS	MGQGTMVTVSS
CDR3 (H95-102)	10 567890abcdefgh12 DNRSCQTSLCTSTTRS DNRSCQTSLCTSTTRS	CEGENAF	DSKNCHDKDCTRPYCS DSKNCHDKDCTRPYCS	KKIDGARYDY KKIDGARYDY
FR3	7 8 890123456789012abc345678901234 TISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVT TCSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVT	TI SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVS TCSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVS	TI SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVR TCSRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVR	TI SRDNSKNTVHLQMNSLRADDTAVYYCAA TCSRDNSKNTVHLQMNSLRADDTAVYYCAA
CDR2 (H50-65)	5 6 012a3456789012345 67 AISSSGCSTYYADSVKG RF AISSSCGSTYYADSVKG RF	AISSSGGSTYYADSVKG RF AISSSGGSTYYADSVKG RF	AISSSGGSTYYADSVKG RF AISSSGGSTYYADSVKG RF	AISSSGGSTYYADSVKG RF AISSSGGSTYYADSVKG RF
) FR2	4 67890123456789 WVRQAPGKGLEWVS	WURQAPGKGLEWVS WURQAPGKGLEWVC	WURQAPGKGLEWVS WURQAPGKGLEWVC	WURQA PGKGLEWVS WURQA PGKGLEWVC
CDR1 (H31-35)	12345 DESMT DESMT	PECMA	SECMG	SESME
FR1	123456789012345678901234567890 0VQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGDTVS QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGDTVS	QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGVTLS QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGVTLS	QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGYTVS QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGYTVS	QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGFSVI QVQLVESGGGLIKPGGSLRLSCAASGFSVI
	HVHAm302 HVHAm302S	HVHAm427 HVHAm427S	HVHAm431 HVHAm431S	HVHPC235 HVHPC235S

FIG. 1A

FR4	10 890123456a FGHGTKVTVL FGHGTKVTVL	FGLGTEVTVL	FGQGTKVEIK FGQGTKVEIK	FGQGTKVEIK FGQGTKVEIK	FGQGTKVEIK FGQGTKVEIK	FGGGTKVTVL FGGGTKVTVL	FGGGTKVTVL FGGGTKVTVL	FGGGTKVTVL FGGGTKVTVL
CDR3 (1.89-97)	9 9012345ab67 QQSYSTPRT QQSYSTPRT	LQHHTYPRT LQHHTYPRT	QQYGSSPRT QQYGSSPRT	QQYDTSPRT QQYDTSPRT	QQYYTTPКТ QQYYTTPКТ	QQRSSGLT QQRSSGLT	QQRYNWPRT QQRYNWPRT	GTWDSNLRASV GTWDSNLRASV
FR3	6 78901234567890123456789012345678 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISNLQPEDFATYYC GVPSRFSCSGSGSTDFTLTISNLQPEDFATYYC	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISGLQPEDFATYYC GVPSRFSCSGSGTEFTLTISGLQPEDFATYYC	GIPDRFSGSGGGTHFTLTINRLEPGDFAVYYC GIPDRFSCSGGGTHFTLTINRLEPGDFAVYYC	GIPDRFSASGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC GIPDRFSCSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQVEDVAVYYC GIPARFSCSGSGTDFTLTISSLQVEDVAVYYC	GVPARFSGRGSGTLFTLTISSLEPEDSAVYFC GVPARFSCRGSGTLFTLTISSLEPEDSAVYFC	GISARFSGGGGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC GISARFSCSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC	GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC
CDR2 (L50-56)	5 0123456 AASTLQS AASTLQS	GASSLQG	GTSNRAT GTSNRAT	GASSRTT GASSRTT	GASTRAT GASTRAT	DTSNRAP	DASNRAT	GNDKRPS GNDKRPS
FR2	4 567890123456789 WYQQKPGKAPKLLLFF WYQQKPGKAPKLLCF	WFQQRPGRAPHRLIY WFQQRPGRAPHRLCY	WYQQKPGQAPRLLIY WYQQKPGQAPRLLCY	WYQQKPGQAPRLLIY WYQQKPGQAPRLLCY	WYQQRPGQAPRLLIY WYQQRPGQAPRLLCY	WYQQRPGQAPRLLVF WYQQRPGQAPRLLCF	WY QQKPGQAPRLLIY WY QQKPGQAPRLLCY	WYQQLPGTAPKLLIY WYQQLPGTAPKLLCY
CDR1 (L24-34)	3 4567ab8901234 RASQ-SISTYLN RASQ-SISTYLN	RASQDIRTDLD RASQDIRTDLD	RASQS-VSSSSLA RASQS-VSSSSLA	RASQSVSNNLA RASQSVSNNLA	RASQSVRUNLA RASQSVRUNLA	RASQSVGRYLA RASQSVGRYLA	RASQSVGTSLA RASQSVGTSLA	SUSSIALICENSUS
FRI	1 12345678901234567890123 310MTQSPSSLSASVGDRVTITC 310MTQSPSSLSASVGDRVTITC)IQMTQSPSSLSASVGDRVTITC)IQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC TIVMTQSPATLSLSPGERATLSC	ETTLTQSPATLSVSPGERATFSC STTLTQSPATLSVSPGERATFSC	ETTLTQSPGTLSLSPGERATLSC TTTLTQSPGTLSLSPGERATLSC	EIVLTQSPTTLSLSPGERATLSC TIVLTQSPTTLSLSPGERATLSC	EIVMTQSPVTLSLSPGERATLSC SIVMTQSPVTLSLSPGERATLSC	2SVVTQPPS-VSAAPGQRVTISC 2SVVTQPPS-VSAAPGQRVTISC

HVLP335 HVLP335S

HVLP324 HVLP324S HVLP342 HVLP342S HVLP3103 HVLP3103S

FIG. 1B

HVLP325 HVLP325S HVLP351S HVLP351S HVLP389 HVLP389S

HVLP364 HVLP364S



FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 3A



FIG. 3A (continuación)



FIG. 3B



FIG. 3C



FIG 4A



FIG 4B



FIG. 4C



FIG. 5



FIG. 6



8.22 μM

 $\textbf{0.4}~\mu\textbf{M}$

20

3.08 μM

0.2 μM

20

10

30

30

FIG. 7A



FIG. 7A (continuación)



FIG. 7B


FIG. 8A



FIG. 8A (continuación)



FIG. 8B



HVLP342S



FIG. 8B (continuación)



FIG. 9A



FIG. 9A (continuación)



FIG. 10

R4	23456a TKVTVL			
E4	10 8901 FGHG			
CDR3 (89-97)	9 9012345ab67 QQSYSTPRT			
FR3	6 • 7 8 78901234567890123456789012345678 GVPSRESCSGSGTDFTLTISNLQPEDFATYYC	TA TA		8
DR2 -56)	3456 TLOS	N A N		~ 20 XXN
(20 C	5 012 AAS	T TA T AN		al A
	6789 GLLCF	LONK		
Ŋ	L2345 SKAPF	AGC 7	sagr	2 CC
E		ATT	NNK SCI	NK NK
	N 12 1	S AGC RGC	CKN CI L	s AGT NNK NNK NNK
84)	3 90123	c MG	F TGT NNK	Y NNK NNK NNK
CDI (24-:	7ab8 05	SAGT	n TCC TCC	NNK NNK NNK
	456 RAS	eca A	A A	a S C P C
	2 0123 TITC	NAK C R	A C C	
FR1	1 1234567890123456789 DIQMTQSPSSLSASVCDRV	CDR1 de HVLP324S Aleatorización de CDR1	CDR2 de HVLP324S Aleatorización de CDR2	CDR3 de HVLP324S Aleatorización de CDR3

FIG. 11



FIG. 12

	FR1	(24-34)	FR2	(50-56)		FR3		(89-97)	FR4
							•	0	
	1 2	rn.	T	ĥ	ø	-	ø	n	PT
	1234567890123456789012	23 4567ab8901234	567890123456789	0123456	7890123456	5789012345	6789012345678	9012345ab67	8901234
HVLP3245	DIOMTOSPSSLSASVGDRVTI	TC RASQSISTYIN	WYOOKPGKAPKLICF	AASTLQS	GUPSRFSCSG	SGIDFTLTI	SNLQPEDFATYYC	QOSYSTPRT	FGHGTKV
NNTHIAN	DIOMIOSPSSLSASVGDRVTI	TC SASQSINNRLY	WYQQKPGKAPKLIJCF	PASFLFS	GVPSRFSC56	SCHDFTLT	SNLQPEDFATYYC	QQSYSTPRT	FGHGTKV
HVLHLDS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	TC TVSQ-GIDSRLY	WYQQKPGKAPKUJCF	PASLLES	GVPSRFSCSG	SGTDFTLT	SNLQPEDFATYYC	QOSYSTPRT	FGHGTKV
NATHIN	DIQMTOSPSSLSASVGDRVTI	TC KASQ-GIRNELY	WYQQKPGKAPKLICF	PASILDS	GUPSRFSCSG	SGTDFTLT	SNLQPEDFATYYC	AQQPGLENSRT	FGHGTKV
AVIHINE	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	TC DASQ-SINERLY	WYQQKPGKAPKLICP	PASILTS	GVPSRFSCBG	SGTDFTLT	SNLQPEDFATYYC	RQPRSGPST	FGHGTKV
HVIHLAO	DICMTOSPSSLSASVGDRVTI	TC GASQ-SIAQRLY	WYQQKPGKAPKLIJCF	PASLLHS	GVPSRFSCSG	SCIDFTLT	SNLQPEDFATYYC	AQRASPPR-PT	FGHGTKV
HTHER	DIOMIOSPSSISASVGDRVT1/	TC DASQGIENFLQ	WYQQKPGKAPKLICF	NASTLQS	GUPSRESCEG	SGTDFTLTL	SNLQPEDFATYYC	VQPGVAPPPGT	PGHGTKV
HVIHLOI	DICMTOSPSSLSASVCDRVTI	TC RASQ-SIQIMID	WYQQKPGKAPKLICF	GASFLIS	GVPSRP\$CBG	TLULADESC	SNLQPEDFATYYC	RQTWTPPA-PT	PGHGTKV
HVLHLYS	DIQMPOSPSSLSASVGDRVTI	TC DASQ-SIYSKLY	WYQQKPGKAPKLIJCF	PASLLWS	GVPSRF8C86	SCTDFTLTI	SNLQPEDFATYYC	LONAADPH-RT	FGHGTKV
HVLHSAL	DICMTOSPSSLSASVGDRVTI	TC RASQSISTVIN	T WYQQKPGKAPKLIJCF	GASRLNS	GVPSRFSCSG	SGTDFTLTI	SNLQPEDEATYYC	RQLFPLPDERT	FGHGTKV

FIG. 13



FIG. 14



FIG. 15



FIG. 15 (continuación)



FIG. 16



FIG. 16 (continuación)



FIG. 17