



19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 081 974**

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: C12P 21/08

A61K 39/395

C12N 15/13

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **90903576.8**

86 Fecha de presentación : **28.12.89**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 451 216**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.91**

54 Título: **Inmunoglobulinas humanizadas, y su producción y uso.**

30 Prioridad: **28.12.88 US 290975**  
**13.02.89 US 310252**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**16.03.96**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**16.03.96**

73 Titular/es: **Protein Design Labs, Inc.**  
**2375 Garcia Avenue**  
**Mountain View, Ca 94043, US**

72 Inventor/es: **Queen, Cary L. y**  
**Selick, Harold Edwin**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Fernando**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a la combinación de tecnologías de ADN recombinante y anticuerpos monoclonales para desarrollar nuevos agentes terapéuticos y, más particularmente, a la producción de anticuerpos no inmunógenos y sus usos.

**Fundamentos de la invención**

En los mamíferos, la respuesta inmune está mediada por dos tipos de células que interactúan específicamente con material extraño, es decir, antígenos. Uno de estos tipos de células, las células B, son responsables de la producción de anticuerpos. La segunda clase de células, las células T, incluyen una gran diversidad de subconjuntos celulares que controlan la función in vivo tanto de las células B como de una gran diversidad de otras células hematopoyéticas, con inclusión de las células T.

Una manera en la que las células T ejercen este control es mediante la producción de una linfocina conocida como interleuquina-2 (IL-2), denominada originalmente factor de crecimiento de las células T. La función primaria de IL-2 parece ser la estimulación y el mantenimiento de las células T. De hecho, algunos inmunólogos creen que IL-2 puede encontrarse en el centro de la respuesta inmune completa (véase, Farrar, J., et al., *Immunol. Rev.* 63: 129-166 (1982)).

Para ejercer sus efectos biológicos, IL-2 interacciona con un receptor de membrana específico de alta afinidad (Greene, W. et al., *Progress in Hematology XIV*, E. Brown, compilador, Grune y Sttaton, Nueva York (1986), en las páginas 283 y siguientes). El receptor de IL-2 humana es una glicoproteína compleja de cadenas múltiples, teniendo una de las cadenas, conocida como el péptido Tac, aproximadamente 55 kD de tamaño (véase, Leonard, W., et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 1872 (1985)). Se ha aislado un gen que codifica esta proteína, y predice un péptido de 272 aminoácidos, con inclusión de un péptido de señal de 21 aminoácidos (véase, Leonard, W., et al., *Nature* 311: 626 (1984)). Los 219 aminoácidos del terminal NH<sub>2</sub> de la proteína p55 Tac comprenden aparentemente un dominio extracelular (véase, Leonard, W., et al., *Science*, 230: 633-639 (1985)).

Gran parte de la dilucidación de la estructura y función del receptor de IL-2 humana y su función se debe al desarrollo de anticuerpos monoclonales específicamente reactivos. En particular, un anticuerpo monoclonal de ratón, conocido como anti-Tac (Uchiyama, et al., *J. Immunol.* 126: 1393 (1981)) ha demostrado que se pueden detectar detectores de IL-2 en las células T, pero también en células de la familia monocitos-macrófagos, células Kupffer del hígado, células Langerhans de la piel y, por supuesto, células T activadas. Es muy importante que las células T inactivas, las células B o los macrófagos circulantes no presentan típicamente el receptor de IL-2 (Herrmann et al., *J. Exp. Med.* 162: 1111 (1985)).

El anticuerpo monoclonal anti-Tac se ha utilizado también para definir funciones de los lin-

focitos que requieren interacción con IL-2 y se ha demostrado que inhibe diversas funciones de las células T, con inclusión de la generación de linfocitos T citotóxicos y supresores en la estructura de la célula. Asimismo, sobre la base de estudios con anti-Tac y otros anticuerpos, se asocian actualmente una diversidad de trastornos con la expresión impropia de receptor de IL-2 por las células T, en particular la leucemia de las células T de los adultos.

Más recientemente, se ha demostrado que el receptor de IL-2 es una diana ideal para nuevos enfoques terapéuticos a las enfermedades mediadas por las células T. Se ha propuesto que anticuerpos específicos del receptor de IL-2, tales como el anticuerpo monoclonal anti-Tac, se pueden utilizar sea solos o como un inmunoconjugado (p.ej., con Ricina A, isótopos y análogos) para separar eficazmente las células que llevan el receptor de IL-2. Estos agentes pueden, por ejemplo, eliminar teóricamente las células leucémicas que expresan el receptor de IL-2, ciertas células B, o células T activadas implicadas en un estado de enfermedad, y permitir sin embargo la retención de las células T normales maduras y sus precursores para asegurar la capacidad de montar una respuesta inmune de las células T normales en caso necesario. En general, la mayoría de otros agentes específicos de las células T pueden destruir esencialmente todas las células T periféricas, lo cual limita la eficacia terapéutica de los agentes. Globalmente, el uso de anticuerpos monoclonales apropiados específicos para el receptor de IL-2 puede tener utilidad terapéutica en enfermedades autoinmunes, trasplantes de órganos y cualquier respuesta no deseada por las células T activadas. De hecho, se han iniciado pruebas clínicas utilizando, p.ej., anticuerpos anti-Tac (véase, en general, Waldman, T., et al., *Cancer Res.* 45: 625 (1985) y Waldman, T., *Science* 232: 727-732 (1986)).

Desafortunadamente, el uso del anticuerpo anti-Tac y otros anticuerpos monoclonales no humanos presentan ciertos inconvenientes, en particular en regímenes terapéuticos repetidos como se explica más adelante. Los anticuerpos monoclonales de ratón, por ejemplo, no fijan bien el complemento humano, y carecen de otras características funcionales importantes de inmunoglobulinas cuando se utilizan en seres humanos.

Quizás sea más importante que el anticuerpo anti-Tac y otros anticuerpos monoclonales no humanos contienen tramos sustanciales de secuencias de aminoácidos que serán inmunógenos cuando se inyectan a un paciente humano. Numerosos estudios han demostrado que, después de la inyección de un anticuerpo extraño, la respuesta inmune provocada por un paciente contra un anticuerpo puede ser muy fuerte, eliminando esencialmente la utilidad terapéutica del anticuerpo después de un tratamiento inicial. Además, dado que puede esperarse que se desarrollen números crecientes de anticuerpos monoclonales diferentes de ratón u otros antígenos (para los seres humanos) para tratar diversas enfermedades, después de los tratamientos primero y segundo con cualesquiera anticuerpos no humanos diferentes, los tratamientos subsiguientes incluso para terapias

no semejantes puede ser ineficaces o incluso peligrosos en sí mismos.

Si bien la producción de los denominados “anticuerpos quiméricos” (p.ej., regiones variables de ratón unidas a regiones constantes humanas) (véase, por ejemplo, el documento WO89/09622) ha alcanzado un éxito relativo, persiste un problema importante de inmunogenicidad. En general, la producción de inmunoglobulinas humanas reactivas con el receptor de IL-2 humana, como con muchos antígenos humanos, ha resultado extremadamente difícil utilizando técnicas de producción de anticuerpos monoclonales humanos típicas. Análogamente, los intentos pasados que utilizan tecnología de ADN recombinante para producir los denominados anticuerpos “humanizados” (véase p.ej., la Publicación EPO No. 0239400), proporcionan resultados inciertos, debido en parte a afinidades de fijación no predecibles.

Así pues, existe necesidad de formas mejoradas de inmunoglobulinas análogas a las humanas, tales como las específicas para el receptor de IL-2 humana, que sean sustancialmente no inmunógenas en seres humanos, y que sin embargo se produzcan fácil y económicamente de una manera adecuada para formulación terapéutica y otros usos. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

Las regiones hipervariables (denominadas también Regiones Determinantes de la Complementariedad, abreviado a “CDR”) de las inmunoglobulinas fueron definidas originalmente por Kabat et al. (“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E., et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, (1983)) sobre la base de la extensión de la variabilidad de secuencia, indicándose que están constituidas por los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera, ( $V_L$ ) y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ), utilizando el sistema de numeración estándar de Kabat para aminoácidos de anticuerpos. Se cree que las CDR se ponen en contacto con el antígeno diana de un anticuerpo y son fundamentalmente responsables de la fijación. Más recientemente, Chothia et al. (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)) han dado una definición alternativa de las regiones hipervariables o CDR afirmando que están constituidas por los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3) en  $V_L$  y los restos 26-32 (H1), 53-55 (H2), 96-101 (H3) en  $V_H$ . La definición de Chothia está basada en los restos que constituyen los anillos en las estructuras de tres dimensiones de los anticuerpos. Es particularmente importante indicar que para cada una de las seis CDR, la CDR de Chothia es realmente un subconjunto de (es decir menor que) la CDR de Kabat, con la única excepción de H1 (la primera CDR de la cadena pesada), donde la CDR de Chothia contiene los aminoácidos 26-30 que no están en la CDR de Kabat.

Riechmann et al (“Reshaping human antibodies therapy”, Nature, Vol. 332, pp. 323-326, (marzo de 1988)) describen un trabajo en el cual precisamente las CDR de kabat se transfirieron a un entramado humano pre-determinado (NEW de

nuevo para la cadena pesada y REI para la cadena ligera). Sin embargo, dichos autores encontraron que un anticuerpo que contenía la cadena pesada humanizada perdía la mayor parte de su afinidad de fijación y aptitud para lisar las células diana. Por esta razón, dichos investigadores produjeron un nuevo anticuerpo humanizado que contenía las CDR de Kabat a partir del anticuerpo de ratón y dos cambios de aminoácidos en la CDR H1 de Chothia, pero ningún otro aminoácido de ratón.

#### Sumario de la invención

La invención proporciona el uso de al menos una sustitución de aminoácido fuera de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) como se definen por Kabat et al (“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E., et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, (1983)) junto con Chothia et al (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)) en la producción de una inmunoglobulina humanizada, donde dicha al menos una sustitución de aminoácido procede de la región variable no perteneciente a las CDR de una inmunoglobulina donante no humana, y en la cual inmunoglobulina humanizada la secuencia de aminoácidos de la región variable distinta de las CDR comprende al menos 70 restos de aminoácidos idénticos a una secuencia de aminoácidos de la región variable de una inmunoglobulina humana aceptora, y las CDR pertenecen a la región variable de dicha inmunoglobulina donante no humana.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una cadena de inmunoglobulina humanizada que tiene una región de entramado de una inmunoglobulina aceptora humana y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina donante capaz de fijarse a un antígeno, comprendiendo dicho método las etapas de sustituir al menos un aminoácido de entramado de la inmunoglobulina aceptora no perteneciente a la CDR con un aminoácido correspondiente procedente de la inmunoglobulina donante en una posición en las inmunoglobulinas en que:

- (a) el aminoácido en la región de entramado humana de la inmunoglobulina aceptora es raro para dicha posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es común para dicha posición en secuencias de inmunoglobulina humana; o
- (b) el aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o
- (c) se predice que el aminoácido tiene un átomo de cadena lateral capaz de interactuar con el antígeno o con las CDR de la inmunoglobulina humanizada.

La presente invención proporciona nuevas composiciones útiles, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos humanos mediados por las células T, conteniendo las composiciones inmunoglobulinas semejantes a las humanas capaces específicamente de bloquear la fijación de IL-2 humana a su receptor y/o capaces de fijarse a la proteína p5 Tac en receptores de IL-2 humanas. Las inmunoglobulinas pueden tener dos pares de complejos cadena ligera/cadena pesada, teniendo típicamente al menos un par cadenas que com-

prenden regiones determinantes de la complementariedad de ratón unidas funcionalmente a segmentos de región de entramado humanos. Por ejemplo, las regiones determinantes de la complementariedad de ratón con o sin restos de aminoácidos de ratón adicionales asociados naturalmente, se pueden utilizar para producir anticuerpos semejantes a los humanos capaces de fijarse al receptor de IL-2 humana con niveles de afinidad más fuertes que aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

Las inmunoglobulinas, con inclusión de fragmentos de fijación y otros derivados de las mismas, de la presente invención se pueden producir fácilmente por una diversidad de técnicas de ADN recombinante, con expresión final en células transfectadas, preferiblemente células eucariotas inmortalizadas, tales como células de mieloma o de hibridoma. Polinucleótidos que comprenden una primera secuencia que codifica regiones de entramado de inmunoglobulina semejantes a las humanas y un segundo conjunto de secuencias que codifica las regiones determinantes de la complementariedad de inmunoglobulinas deseadas pueden producirse sintéticamente o por combinación de segmentos de ADNc y ADN genómico apropiados.

Las inmunoglobulinas semejantes a las humanas se pueden utilizar solas en forma sustancialmente pura, o complejadas con un agente citotóxico, tal como un radionucleido, una proteína inhibidora de ribosomas o un agente citotóxico activo en las superficies celulares. Todos estos compuestos serán particularmente útiles en el tratamiento de trastornos mediados por las células T. Las inmunoglobulinas semejantes a las humanas o sus complejos se pueden preparar en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptada, que variará dependiendo del modo de administración.

Los métodos para diseñar cadenas de inmunoglobulina semejantes a las humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) a partir de una inmunoglobulina donante y una región de entramado procedente de una inmunoglobulina humana, puede implicar primeramente la comparación de la secuencia de aminoácidos del entramado o de la región variable de la inmunoglobulina donante con secuencias correspondientes en una colección de cadenas de inmunoglobulina humana, y la selección como inmunoglobulina humana de una de las secuencias más homólogas de la colección. La secuencia de la inmunoglobulina humana, o de la inmunoglobulina aceptora, se selecciona típicamente de una colección de al menos 10 a 20 secuencias de cadena de inmunoglobulina, y usualmente tendrá la homología más alta con la secuencia de inmunoglobulina donante de cualquier secuencia de la colección. La secuencia de entramado de la inmunoglobulina humana tendrá de manera típica aproximadamente 65 a 70% de homología o más con las secuencias de entramado de inmunoglobulina donante. La inmunoglobulina donante puede ser una cadena pesada o cadena ligera (o ambas) y la colección humana contendrá la misma clase de cadena. Se puede utilizar una cadena ligera y pesada humanizada para formar una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado completo, que tenga dos pares de cadena ligera/pesada, con o

sin regiones constantes de longitud parcial o total humanas y otras proteínas.

La cadena de inmunoglobulina humanizada comprenderá de modo típico al menos aproximadamente tres aminoácidos procedentes de la inmunoglobulina donante además de las CDR, usualmente al menos uno de los cuales es inmediatamente adyacente a una CDR en la inmunoglobulina donante. Las cadenas pesada y ligera pueden diseñarse cada una utilizando uno cualquiera o la totalidad de los tres criterios de posición.

Cuando se combinan en un anticuerpo intacto, las cadenas ligera y pesada humanizadas de la presente invención serán sustancialmente no inmunógenas en seres humanos y retendrán sustancialmente la misma afinidad que la inmunoglobulina donante para el antígeno (tal como una proteína u otro compuesto que contenga un epítipo). Estos niveles de afinidad pueden variar desde aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$  o mayor, y pueden estar comprendidos dentro de aproximadamente el cuádruple de la afinidad original de la inmunoglobulina donante para el antígeno.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Comparación de secuencias de cadena pesada de anti-Tac (líneas superiores) y cadena pesada de Eu (líneas inferiores). Se utiliza el código de una sola letra para los aminoácidos. El primer aminoácido de cada línea se numera a la izquierda. Los aminoácidos idénticos en las dos secuencias están conectados por líneas. Las tres CDR están subrayadas. Otras posiciones de aminoácidos para las cuales se utilizó el aminoácido de anti-Tac más bien que el aminoácido de Eu en la cadena pesada de anti-Tac humanizada se designan por un asterisco.

Figura 2. Comparación de secuencias de cadena ligera de anti-Tac (líneas superiores) y cadena ligera de Eu (líneas inferiores). Se utiliza el código de una sola letra para los aminoácidos. El primer aminoácido en cada línea se numera a la izquierda. Los aminoácidos idénticos en las dos secuencias están conectados por líneas. Se subrayan las tres CDR. Otras posiciones de aminoácidos para las cuales se utilizó el aminoácido de anti-Tac en lugar del aminoácido de Eu en la cadena pesada de anti-Tac humanizada se designa por un asterisco.

Figura 3. Secuencia de nucleótidos del gen para el gen de la región variable de la cadena pesada de anti-Tac humanizada. La secuencia de aminoácidos traducida para la parte del gen codificante de la proteína se muestra bajo la secuencia de nucleótidos. Los nucleótidos TCTAGA al principio y final del gen son sitios Xba I. La secuencia de la cadena pesada madura comienza con el aminoácido #20 Q.

Figura 4. Secuencia de nucleótidos del gen para el gen de la región variable de la cadena ligera de anti-Tac humanizada. La secuencia de aminoácidos traducida para la parte del gen que codifica la proteína se muestra bajo la secuencia de nucleótidos. Los nucleótidos TCTAGA al comienzo y final del gen son sitios Xba I. La secuencia de la cadena ligera madura comienza con el aminoácido #21 D.

Figura 5. A. Secuencias de los cuatro oligonucleótidos utilizados para sintetizar el gen de la

cadena pesada de anti-Tac humanizada, impresa en sentido 5' a 3'. B. Posiciones relativas de los oligonucleótidos. Las flechas apuntan en la dirección 3' para cada oligonucleótido.

Figura 6. (A) Secuencias de los cuatro oligonucleótidos utilizados para sintetizar el gen de la cadena ligera anti-Tac humanizada, impresa en el sentido 5' a 3'. (B) Posiciones relativas de los oligonucleótidos. Las flechas apuntan en la dirección 3' para cada oligonucleótido. Se muestra la posición de un sitio Hind III en la superposición de JFD2 y JFD3.

Figura 7. Diagrama esquemático del plásmido pHuGTAC1 utilizado para expresar la cadena pesada de anti-Tac humanizada. Se muestran los sitios de restricción pertinentes, y las regiones codificantes de la cadena pesada se presentan como cajas. La dirección de transcripción a partir del promotor de inmunoglobulina (Ig) se muestra por una flecha.  $E_H$  = intensificador de la cadena pesada, Hyg = gen de resistencia a la higromicina.

Figura 8. Diagrama esquemático del plásmido pHuLTAC utilizado para expresar la cadena ligera de anti-Tac humanizada. Se muestran los sitios de restricción pertinentes, y las regiones codificantes de la cadena ligera se presentan como cajas. La dirección de transcripción desde el promotor Ig se muestra por una flecha.

Figura 9. Fluorocitometría de células HUT-102 y células Jurkat teñidas con anticuerpo anti-Tac o anticuerpo anti-Tac humanizado seguidos respectivamente por anticuerpo Ig anti-ratón de cabra conjugado con fluoresceína o anticuerpo Ig anti-humano de cabra, conforme se etiqueta. En cada panel, la curva de puntos muestra los resultados cuando se omitió el primer anticuerpo, y la curva continua los resultados cuando se incluyeron los anticuerpos primero y segundo (conjugados) como se describe.

Figura 10. (A) Fluorocitometría de células HUT-102 teñidas con 0-40 ng de anti-Tac como se indica, luego con anti-Tac biotinilado, y posteriormente con avidina conjugada con ficoeritrina. (B) Fluorocitometría de células HUT-102 teñidas con el anticuerpo indicado, luego con anti-Tac biotinilado, y después con avidina conjugada con ficoeritrina.

#### Descripción detallada de la invención

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporcionan inmunoglobulinas semejantes a las humanas reactivas específicamente con epítopes deseados, tales como los existentes en el receptor de IL-2 en las células T humanas. Estas inmunoglobulinas, que tienen afinidades de fijación de al menos aproximadamente  $10^8 M^{-1}$ , y preferiblemente  $10^9 M^{-1}$  a  $10^{10} M^{-1}$  o más fuertes, son capaces de, p.ej., bloquear la fijación de IL-2 a receptores de IL-2 humana. Las inmunoglobulinas semejantes a las humanas tendrán un entramado semejante al humano y pueden tener regiones determinantes de la complementariedad (CDR) procedentes de una inmunoglobulina, típicamente una inmunoglobulina de ratón, específicamente reactiva con un epítipo de la proteína p55 Tac. Las inmunoglobulinas de la presente invención, que se pueden producir económicamente en grandes cantidades, encuentran uso, por ejemplo, en el tratamiento de tras-

tornos mediados por las células T en pacientes humanos por una diversidad de técnicas.

Se sabe que la unidad estructural del anticuerpo básico comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El término  $NH_2$  de cada cadena comienza una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables fundamentalmente del reconocimiento del antígeno. El término  $COOH$  de cada cadena define una región constante fundamentalmente responsable de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican (y subclasifican) como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 12 aminoácidos más. (Véase, generalmente, *Fundamental Immunology*, Paul, W., compilador, capítulo 7, pp. 131-166, Raven Press, Nueva York (1984)).

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de fijación de anticuerpo. La totalidad de las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones de entramado relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, denominadas también CDR (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, (1983); y Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)). Las CDR procedentes de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones de entramado, permitiendo la fijación a un epítipo específico.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que está constituida por uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como los genes de la región variable de inmunoglobulina que constituyen una miríada. Las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formas además de anticuerpos; con inclusión, por ejemplo, de Fv, Fab, y F(ab)<sub>2</sub>, así como en cadenas simples (p.ej., *Huston, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883 (1988) y Bird, et al., *Science*, 242: 423-426 (1988)). (Véase, generalmente, Hood, et al., "Immunology", Benjamin, N.Y., segunda edición (1984), y Hunkapiller y Hood, *Nature*, 323:15-16 (1986)).

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de segmentos de gen de inmunoglobulina pertenecientes a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes procedentes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes (C) humanos, ta-

les como  $\gamma_1$  y  $\gamma_3$ . Un anticuerpo quimérico terapéutico típico es por consiguiente una proteína híbrida constituida por el dominio V o de fijación de antígeno procedente de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector procedente de un anticuerpo humano (p.ej., A.T.C.C. No. de Acceso CRL 9688 secreta un anticuerpo quimérico anti-Tac), aunque pueden utilizarse otras especies de mamíferos.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "región de entramado" se refiere a aquellas porciones de regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina que están conservadas relativamente (*es decir*, distintas de las regiones CDR) entre inmunoglobulinas diferentes en una sola especie, tal como se define por Kabat, et al., *op. cit.* Tal como se utiliza en esta memoria, una "región de entramado semejante a la humana" es una región de entramado que en cada cadena existente comprende al menos aproximadamente 70 o más restos de aminoácidos, típicamente 75 a 85 o más restos, idénticos a los existentes en una inmunoglobulina humana.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "inmunoglobulina semejante a la humana" se refiere a una inmunoglobulina que comprende un entramado semejante al humano y en la cual cualquier región constante presente es sustancialmente homogénea a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, tiene al menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente al menos 95% de identidad con ésta última. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina semejante a la humana, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente homólogas a partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativas. Por ejemplo, una inmunoglobulina semejante a la humana no abarcaría un anticuerpo quimérico de región variable de ratón/región constante humana.

De acuerdo con otro aspecto general de la presente invención, se incluyen también criterios por los cuales se seleccionan un número limitado de aminoácidos en el entramado de una cadena de inmunoglobulina semejante a la humana o humanizada de modo que sean los mismos que los aminoácidos en aquellas posiciones en la Ig donante en lugar de encontrarse en la Ig aceptora, con objeto de incrementar la afinidad de un anticuerpo que comprende la cadena de inmunoglobulina humanizada.

Este aspecto de la presente invención está basado en parte en el modelo de que dos causas contribuyentes a la pérdida de afinidad en los medios de producción de anticuerpos humanizados de la técnica anterior (utilizando como ejemplos anticuerpos de ratón como la fuente de CDR) son

(1) cuando las CDR de ratón se combinan con el entramado humano, los aminoácidos en el entramado próximos a las CDR resultan ser anticuerpos humanos en lugar de ser anticuerpos de ratón. Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría, se cree que estos aminoácidos cambiados pueden distorsionar ligeramente las CDR, debido a que los mismos crean fuerzas electrostáticas o hidrófobas diferentes que en el anticuerpo de ratón donante, y las CDR distorsionadas pueden no establecer contactos tan eficaces con el

antígeno como lo hacían las CDR en el anticuerpo donante;

(2) asimismo, los aminoácidos en el anticuerpo de ratón original que están próximos a, pero no forman parte de, las CDR (es decir, parte fija del entramado), pueden establecer contactos con el antígeno que contribuyen a la afinidad. Estos aminoácidos se pierden cuando se humaniza el anticuerpo, debido a que todos los fragmentos de aminoácidos se vuelven humanos.

Para evitar estos problemas, y con objeto de producir anticuerpos humanizados que tengan una afinidad muy fuerte para un antígeno deseado, la presente invención utiliza los cuatro criterios siguientes para designar inmunoglobulinas humanizadas. Estos criterios se pueden utilizar aisladamente, o en caso necesario en combinación, para alcanzar la afinidad deseada u otras características.

Criterio I: Como aceptor, se utiliza un entramado procedente de una inmunoglobulina humana particular que es excepcionalmente homóloga para la inmunoglobulina del donante a humanizar, o se utiliza un entramado de consenso procedente de muchos anticuerpos humanos. Por ejemplo, la comparación de la secuencia de una región variable de cadena pesada (o ligera) de ratón contra las regiones variables pesada (o ligera) humanas en un banco de datos (por ejemplo, el National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource) muestra que el grado de homología con regiones humanas diferentes varía notablemente, de manera típica desde aproximadamente 40% a aproximadamente 60-70%. Eligiendo como la inmunoglobulina aceptora una de las regiones variables de la cadena pesada (o respectivamente ligera) humana que es más homóloga a la región variable de la cadena pesada (o respectivamente ligera) de la inmunoglobulina donante, menos aminoácidos se cambiarán al pasar desde la inmunoglobulina donante a la inmunoglobulina humanizada. Por consiguiente, y de nuevo sin pretender quedar ligados a la teoría, se cree que existe una probabilidad menor de cambiar un aminoácido próximo a las CDR que distorsione su conformación. Además, la forma global precisa de un anticuerpo humanizado que comprende la cadena de inmunoglobulina humanizada puede asemejarse más estrechamente a la forma del anticuerpo donante, reduciendo también la probabilidad de distorsionar las CDR.

Típicamente, una de las 3-5 secuencias de la región variable de la cadena pesada más homólogas en una colección representativa de al menos aproximadamente 10 a 20 cadenas pesadas humanas distintas se seleccionará como aceptor para proporcionar el entramado de la cadena pesada, y análogamente para la cadena ligera. Preferiblemente, se utilizará una de las 1-3 regiones variables más homólogas. La cadena de inmunoglobulina aceptora seleccionada tendrá de modo muy preferible al menos aproximadamente 65% de homología en la región del entramado con la inmunoglobulina donante.

Con indiferencia del modo en que se seleccione la inmunoglobulina aceptora, se puede alcanzar una afinidad mayor seleccionando un número pequeño de aminoácidos en el entramado de la ca-

dena de inmunoglobulina humanizada de modo que sean los mismos que los aminoácidos en aquellas posiciones en el donante en vez del aceptor. Los criterios siguientes definen qué aminoácidos pueden seleccionarse de este modo. Preferiblemente, en la mayoría o la totalidad de las posiciones de aminoácidos que satisfacen uno de estos criterios, se seleccionará de hecho el aminoácido donante.

Criterio II: Si un aminoácido en el entramado de la inmunoglobulina aceptora humana es inusual (es decir, "raro"), lo cual como se utiliza en esta memoria indica un aminoácido que existe en dicha posición en no más de aproximadamente 10% de las secuencias de región V de cadena pesada (o respectivamente ligera) humana en un banco de datos representativo), y si el aminoácido donante en dicha posición es típico para secuencias humanas (es decir, "común", que como se utiliza en esta memoria indica un aminoácido que existe en al menos aproximadamente el 25% de las secuencias en un banco de datos representativo), entonces puede seleccionarse el aminoácido donante en lugar del aceptor. Este criterio contribuye a asegurar que un aminoácido atípico en el entramado humano no interrumpe la estructura del anticuerpo. Además, reemplazando un aminoácido inusual con un aminoácido procedente del anticuerpo del donante que es típico para anticuerpos humanos, el anticuerpo humanizado puede hacerse menos inmunógeno.

Criterio III: En las posiciones inmediatamente adyacentes a las tres CDR en la cadena de inmunoglobulina humanizada, puede seleccionarse el aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor. Estos aminoácidos son particularmente propensos a interactuar con los aminoácidos en las CDR y, si son seleccionados del aceptor, distorsionan la CDR del donante y reducen la afinidad. Además, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno (Amit *et al.*, *Science*, **233**, 747-753 (1986)), y la selección de estos aminoácidos del donante puede ser deseable para mantener la totalidad de los contactos del antígeno que proporcionan afinidad en el anticuerpo original.

Criterio IV: Un modelo tridimensional, típicamente del anticuerpo donante original, muestra que ciertos aminoácidos no pertenecientes a las CDR están próximos a las CDR y tienen una probabilidad considerable de interactuar con aminoácidos en las CDR por enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En dichas posiciones de aminoácidos, se puede seleccionar el aminoácido donante más bien que el aminoácido de la inmunoglobulina aceptora. Aminoácidos de acuerdo con este criterio tendrán generalmente un átomo de cadena lateral situado dentro de aproximadamente 3 unidades Angstrom de algún sitio en las CDR y tienen que contener átomos que puedan interactuar con los átomos de las CDR conforme a fuerzas químicas establecidas, tales como las enumeradas anteriormente. Programas de ordenador para crear modelos de proteínas tales como anticuerpos están disponibles generalmente y son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, Loew *et al.*, *Int. J. Quant. Chem.*,

*Quant. Biol. Symp.*, **15**:55-56 (1988); Bruccoleri *et al.*, *Nature*, **335**, 564-568 (1988); Chothia *et al.*, *Science*, **233**:755-758 (1986)). Estos no forman parte de la invención. De hecho, dado que todos los anticuerpos tienen estructuras similares, las estructuras de anticuerpos conocidas, que están asequibles del Brookhaven Protein Data Bank, se pueden utilizar en caso necesario como modelos aproximados de otros anticuerpos. Programas de ordenador comercialmente asequibles pueden utilizarse para presentar estos modelos en un monitor de ordenador, a fin de calcular de distancia entre los átomos, y estimar la probabilidad de interacción entre aminoácidos diferentes (véase, Ferrin *et al.*, *J. Mol. Graphics*, **6**:13-27 (1988)).

Los anticuerpos humanizados o análogos a los humanos tienen generalmente al menos tres ventajas potenciales sobre los anticuerpos de ratón o en algunos casos anticuerpos quiméricos para uso en terapia humana:

1) Debido a que la proteína efectora es humana, la misma puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmune humano (p.ej., destruir las células diana más eficientemente por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC))

2) El sistema inmune humano no debería reconocer el entramado o la región constante del anticuerpo humanizado como extraño, y por consiguiente la respuesta de anticuerpos contra dicho anticuerpo inyectado debería ser menor que contra un anticuerpo de ratón totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.

3) Se ha comunicado que anticuerpos de ratón inyectados tienen una semi-vida en la circulación humana mucho más corta que la semi-vida de los anticuerpos normales (D. Shaw *et al.*, *J. Immunol.*, **138**: 4534-4538 (1987)). Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán probablemente una semi-vida más similar a los anticuerpos humanos existentes naturalmente, haciendo posible que se administren dosis más pequeñas y menos frecuentes.

La presente invención está dirigida específicamente a inmunoglobulinas humanizadas mejoradas (p.ej., capaces de fijar el receptor de IL-2 humana) con respecto a las descritas en la publicación EPA No. 0239400. Dicha solicitud, cuya descripción queda fuera del campo de esta invención, describe, para ciertas inmunoglobulinas, sustituir regiones de CDR en los dominios variables de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo aceptor con partes análogas de CDR (típicamente accesibles mediante disolventes) procedentes de un anticuerpo de especificidad diferente. Asimismo, dicha solicitud expone, para ciertas inmunoglobulinas, la posibilidad de transferir únicamente restos que son accesibles (mediante disolventes) desde el sitio de fijación del antígeno, pudiendo incluir aparentemente dichos restos ciertas regiones del entramado (específicamente, restos que se sabe están implicados en la fijación de antígeno como se describe en Amit *et al.*, *Science* **233**: 747-753 (1986) o quizás restos esenciales para interacciones inter-cadena - pero para cuya selección se dan orientaciones insuficientes en dicha solicitud). Así, por ejemplo,

una realización preferida de la presente invención implica sustituir CDR completas y aminoácidos de entramado inmediatamente adyacentes a una (o preferiblemente a cada una) de las CDR. En general, cualesquiera restos de entramado que estén también en contacto con las CDR para, p.ej., mantener su conformación (y usualmente su especificidad de fijación de antígeno) están incluidos específicamente dentro de las realizaciones preferidas de la presente invención como se ha descrito en detalle anteriormente.

En un aspecto, la presente invención está orientada a segmentos de ADN recombinante que codifican las CDR de cadena pesada y/o ligera (típicamente con otros restos de aminoácidos como se ha descrito anteriormente) de una inmunoglobulina capaz de fijarse a un epítipo deseado, tal como al receptor de IL-2 humana (p.ej., el anticuerpo monoclonal anti-Tac). Los segmentos de ADN que codifican estas regiones se unirán típicamente a segmentos de ADN que codifican regiones de entramado semejante al humano apropiadas. Por ejemplo, las secuencias de ADN preferidas, que en la expresión codifican las cadenas de polipéptidos que comprenden las regiones hipervariables de la cadena pesada y ligera anti-Tac (con regiones de entramado semejantes a las humanas), se muestran en las Figuras 3 y 4, respectivamente. Debido a la degeneración de los codones y las sustituciones de aminoácidos no críticos, otras secuencias de ADN pueden emplearse fácilmente en sustitución de dichas secuencias, como se detalla más adelante.

Los segmentos de ADN incluirán típicamente además una secuencia de ADN de control de la expresión enlazada operativamente a las secuencias codificantes de anticuerpos semejantes a los humanos, con inclusión de regiones promotoras naturalmente asociadas o heterólogas. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores de eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedantes eucariotas, pero también se pueden utilizar secuencias de control para hospedantes procariotas. Una vez que el vector se ha incorporado al hospedante apropiado, el hospedante se mantiene en condiciones adecuadas para un nivel de expresión alto de las secuencias de nucleótidos, y, en caso deseado, pueden seguir la recogida y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de fijación u otras formas de inmunoglobulina.

Las secuencias de ADN de la región constante humana se pueden aislar de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una diversidad de células humanas, pero preferiblemente células B inmortalizadas (véase, Kabat, *op. cit.* y documento WP87/02671). Por ejemplo, los genes y secuencias de la región constante y de la región J de inmunoglobulina kappa humana se describen en Heiter et al., *Cell* 22: 197-207 (1990) y la secuencia de nucleótidos de un gen C<sub>γ1</sub> de inmunoglobulina humana se describe en Ellison et al., *Nucl. Acid. Res.* 10: 4071 (1982). Las CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención se derivarán análogamente a partir de anticuerpos monoclonales capaces de fi-

jarse al antígeno deseado (p.ej., el receptor de IL-2 humana) y se producirán a partir de cualquier fuente de mamífero conveniente, con inclusión de ratones, ratas, conejos, u otros vertebrados capaces de producir anticuerpos por métodos bien conocidos. Células originarias adecuadas para las secuencias de ADN y células hospedantes para la expresión y secreción de inmunoglobulinas se pueden obtener a partir de diversas fuentes, tales como la American Type Culture Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas," 5ª edición (1985) Rockville, Maryland, Estados Unidos).

Además de las inmunoglobulinas semejantes a las humanas descritas específicamente en esta memoria, otras inmunoglobulinas modificadas "sustancialmente homólogas" se pueden diseñar y fabricar fácilmente utilizando diversos métodos de ADN recombinante bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, para las inmunoglobulinas receptoras de IL-2 las regiones de entramado pueden variar de las secuencias representadas en las Figuras 3 y 4 al nivel de la estructura primaria por varias sustituciones, adiciones y deleciones terminales e intermedias de aminoácidos, etcétera. Además, una diversidad de diferentes regiones de entramado humanas pueden utilizarse aisladamente o en combinación como base para las inmunoglobulinas semejantes a las humanas de la presente invención. En general, modificaciones de los genes pueden realizarse fácilmente por una diversidad de técnicas bien conocidas, tales como mutagénesis dirigida al sitio (véase, Gillman y Smith, *Gene* 8: 81-97 (1979) y Roberts, S. et al., *Nature* 328: 731-734 (1987)).

Alternativamente, se pueden producir fragmentos de polipéptidos que comprenden únicamente una porción de la estructura del anticuerpo primario, fragmentos que poseen una o más actividades de inmunoglobulina (p.ej., actividad de fijación del complemento). Asimismo, dado que al igual que muchos genes, los genes semejantes a las inmunoglobulinas contienen regiones funcionales separadas, cada una de las cuales tiene una o más actividades biológicas distintas, los genes pueden fusionarse a regiones funcionales de otros genes (p.ej., enzimas) para producir proteínas de fusión (p.ej., inmunotoxinas) que tienen propiedades nuevas.

Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención capaces de expresar finalmente los anticuerpos deseados semejantes a los humanos pueden formarse a partir de una diversidad de polinucleótidos (ADN genómico o ADNc, ARN, oligonucleótidos sintéticos, etc.) y componentes (p.ej., regiones V, J, D, y C) diferentes, así como por una diversidad de técnicas diferentes. La unión de secuencias genómicas apropiadas es actualmente el método más común de producción, pero también se pueden utilizar secuencias de ADNc (véase, Publicación de Patente Europea No. 0239400 y Reichmann, L., et al., *Nature* 332: 323-327 (1988)).

Como se ha indicado previamente, las secuencias de ADN se expresarán en hospedantes después que las secuencias se han enlazado operativamente a (es decir, posicionado para asegurar el funcionamiento de) una secuencia de control de la expresión. Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organis-

mos hospedantes, sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del hospedante. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, p.ej., tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquéllas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, p.ej., la Patente de EE.UU. 4.704.362).

*E. coli* es un hospedante procariota particularmente útil para clonación de las secuencias de ADN de la presente invención. Otros hospedantes microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos hospedantes procariotas, pueden producirse también vectores de expresión, los cuales contendrán típicamente secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedante (p.ej., un origen de replicación). Adicionalmente, estarán presentes cualquier número de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de  $\beta$ -lactamasa, o un sistema promotor del fago  $\lambda$ . Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia de operador, y tendrán secuencias de sitios de fijación de ribosomas y análogas, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

Otros microbios, tales como levaduras, pueden utilizarse también para la expresión. *Saccharomyces* es un hospedante preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, con inclusión de 3-fosfoglicerato-quinasa u otras enzimas glicólicas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y análogas en caso deseado.

Además de microorganismos, también se pueden utilizar cultivos de células de tejidos de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (véase, Winnacker, "From Genes to Clones," VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)). De hecho, se prefieren células eucariotas, debido a que se han desarrollado en la técnica varias líneas de células hospedantes adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, e incluyen las líneas de células CHO, diversas líneas de células COS, células HeLa, líneas de células de mieloma, etc, pero preferiblemente células B transformadas o hibridomas. Vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un intensificador (Queen, C., et al., *Immunol. Rev.*, 89: 49-68 (1986)), y sitios de información de la elaboración necesarios, tales como sitios de fijación de ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de SV40 con intensificador (véase, Mulligan y Berg, *Science* 209: 1422-1427 (1980), un gen de inmunoglobulina, Adenovirus, Virus del Papiloma de los Bovinos, y análogos.

Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés (p.ej., las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera y secuencias de

control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedante por métodos bien conocidos, los cuales varían dependiendo del tipo de hospedante celular. Por ejemplo, se utiliza comúnmente la transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que pueden utilizarse tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros hospedantes celulares. (Véase, en general, Maniatis, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, (1982)).

Una vez expresados, los anticuerpos enteros, sus dímeros, las cadenas ligera y pesada individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, con inclusión de precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y análogos (véase, en general, Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y es muy preferido 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad en caso deseado, los polipéptidos se pueden utilizar luego terapéuticamente (con inclusión de la vía extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes, y análogos. (Véase, en general, *Immunological Methods*, Vols. I y II, Lefkovits y Pernis, compiladores, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1979 y 1981)).

Los anticuerpos específicos del receptor de IL-2 ilustrados en la presente invención encontrarán típicamente uso a título individual en el tratamiento de un estado de enfermedad mediado por las células T. Generalmente, en los casos en que la célula ligada a una enfermedad se ha identificado como portadora del receptor de IL-2, entonces son adecuados los anticuerpos semejantes a los humanos capaces de bloquear la fijación de IL-2 al receptor de IL-2 humana. Por ejemplo, estados de enfermedad típicos adecuados para tratamiento incluyen la enfermedad del injerto frente al hospedante y el rechazo de trasplantes en pacientes que se someten a un trasplante de órgano, tal como corazón, pulmones, riñones, hígado, etc. Otras enfermedades incluyen enfermedades autoinmunes, tales como diabetes de Tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematosus sistémico, y miastenia gravis.

Los anticuerpos semejantes a los humanos de la presente invención se pueden utilizar también en combinación con otros anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales humanos reactivos con otros marcadores en células responsables de la enfermedad. Por ejemplo, marcadores de las células T adecuados pueden incluir los agrupados en los denominados "Racimos de Diferenciación", tal como han sido definidos por el First International Leukocyte Differentiation Workshop, *Leukocyte Typing*, Bernard, et al., compiladores, Springer-Verlag, N.Y. (1984).

Los anticuerpos se pueden utilizar también como composiciones administradas por separado que se suministran en asociación con agentes

quimioterapéuticos o inmunosupresores. Típicamente, los agentes incluirán ciclosporina A o un análogo de purina (p.ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, o análogos), pero se pueden utilizar también numerosos agentes adicionales (p.ej., ciclofosfamida, prednisona, etc.) bien conocidos por los expertos en la técnica.

Una composición farmacéutica preferida de la presente invención comprende el uso de los presentes anticuerpos en inmunotoxinas. Las inmunotoxinas se caracterizan por dos componentes y son particularmente útiles para destruir células seleccionadas *in vitro* o *in vivo*. Un componente es un agente citotóxico que es usualmente fatal para una célula cuando se fija o se absorbe. El segundo componente, conocido como el "vehículo de suministros", proporciona un medio para suministrar el agente tóxico a un tipo de célula particular, tal como células que comprenden un carcinoma. Los dos componentes están unidos de manera habitual químicamente entre sí por cualquiera de una diversidad de procedimientos químicos bien conocidos. Por ejemplo, cuando el agente citotóxico es una proteína y el segundo componente es una inmunoglobulina intacta, la unión puede tener lugar por la vía de reticuladores heterobifuncionales, p.ej., SPDP, carbodimida, aldehído glutárico, o análogos. La producción de diversas inmunotoxinas es bien conocida en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo, en "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe et al, *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, pp. 168-190 (1982).

Una diversidad de agentes citotóxicos son adecuados para uso en inmunotoxinas. Los agentes citotóxicos pueden incluir radionucleidos tales como yodo-131, itrio-90, renio-188, y bismuto-212; varios fármacos quimioterapéuticos, tales como Vindesina, metotrexato, adriamicina, y cisplatino; y proteínas citotóxicas tales como proteínas inhibidoras de ribosomas como proteína antivirica carmín, exotoxina A de Pseudomonas, ricina, toxina de la difteria, cadena A de ricina, etc., o un agente activo en la superficie celular, tal como las enzimas fosfolipasas (p.ej., fosfolipasa C (véase, en general, "Chimeric Toxins," Olshnes y Phil, *Pharmac. Ther.*, 25: 355-381 (1982)), y "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", compiladores Baldwin y Byers, pp. 159-179, 224-276, Academic Press (1985)).

El componente de suministro de la inmunotoxina incluirá las inmunoglobulinas semejantes a las humanas de la presente invención. Preferiblemente se utilizan inmunoglobulinas intactas o sus fragmentos de fijación, tales como Fab. Típicamente, los anticuerpos de las inmunotoxinas serán del isotipo humano IgM o IgG, pero se pueden utilizar en caso deseado otras regiones constantes de mamífero.

Los anticuerpos semejantes a los humanos y sus composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para administración parenteral, es decir, por vías subcutánea, intramuscular o intravenosa. Las composiciones para administración parenteral comprenderán comúnmente una solución del anticuerpo o un cóctel del mismo disuelto en un vehículo acepta-

ble, preferiblemente un vehículo acuoso. Se pueden utilizar una diversidad de vehículos acuosos, p.ej., agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y análogos. Estas soluciones son estériles y están generalmente exentas de materia constituida por partículas. Dichas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables en caso requerido para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes de ajuste de la toxicidad y análogos, por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, a saber, desde menos de aproximadamente 0,5%, usualmente de o al menos aproximadamente 1% hasta tanto como 15 ó 20% en peso y se seleccionarán fundamentalmente sobre la base de volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado.

Así, una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular podría prepararse de modo que contuviera 1 ml de agua tamponada estéril, y 50 mg de anticuerpo. Una composición típica para infusión intravenosa podría prepararse de modo que contuviera 250 ml de solución de Ringer estéril, y 150 mg de anticuerpo. Los métodos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y se describen con mayor detalle, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Science*, edición 15<sup>a</sup>, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1980).

Los anticuerpos de esta invención se pueden liofilizar para almacenamiento y pueden reconstituirse en un vehículo adecuado antes de su empleo. Se ha demostrado que esta técnica es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y se pueden emplear métodos de liofilización y reconstitución conocidos en la técnica. Será reconocido por los expertos en la técnica que la liofilización y reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdidas de actividad del anticuerpo (p.ej., con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a sufrir una pérdida mayor de actividad que los anticuerpos IgG) y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse en compensación.

Las composiciones que contienen los presentes anticuerpos semejantes a los humanos o un cóctel de los mismos se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En la aplicación terapéutica, las composiciones se administran a un paciente que sufre ya una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la infección y del estado general del propio sistema inmune del paciente, pero generalmente están comprendidas entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 mg de anticuerpo por dosis, utilizándose más comúnmente dosificaciones que van desde 5 a 25 mg por paciente. Es necesario tener en cuenta que

los materiales de esta invención pueden emplearse generalmente en estados de enfermedad graves, es decir situaciones amenazantes para la vida o potencialmente amenazantes para la vida. En tales casos, debido a la minimización de sustancias extrañas y a la menor probabilidad de rechazos de "sustancia extraña" que son alcanzados por los presentes anticuerpos de esta invención semejantes a los humanos, es posible y puede sentirse deseable por el médico que tiene a su cargo el tratamiento administrar excesos sustanciales de estos anticuerpos.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que no se encuentra todavía en un estado de enfermedad para aumentar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz." En este uso, las cantidades precisas dependen nuevamente del estado de salud y nivel general de inmunidad del paciente, pero generalmente están comprendidas entre 0,1 y 25 mg por dosis, especialmente 0,5 a 2,5 mg por paciente. Un uso profiláctico preferido es para la prevención del rechazo de trasplantes de riñón.

Administraciones simples o múltiples de las composiciones se pueden llevar a cabo, siendo seleccionados los niveles y el patrón de dosificación por el médico que tiene a su cargo el tratamiento. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad del o de los anticuerpos de esta invención suficiente para tratar de manera eficaz al paciente.

Los anticuerpos de la presente invención semejantes a los humanos pueden encontrar adicionalmente una gran diversidad de utilidades *in vitro*. A manera de ejemplo, los anticuerpos ilustrativos se pueden utilizar para tipificación de las células T, para aislamiento de células que llevan receptor de IL-2 específico o fragmentos del receptor, para preparación de vacunas, o análogos.

Para fines de diagnóstico, los anticuerpos pueden estar marcados o sin marcar. Se pueden utilizar anticuerpos sin marcar en combinación con otros anticuerpos marcados (segundos anticuerpos) que son reactivos con el anticuerpo semejante al humano, tales como anticuerpos específicos para regiones constantes de inmunoglobulina humana. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar marcados directamente. Se pueden emplear una gran diversidad de marcadores, tales como radionucleidos, agentes fluorescentes, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, ligandos (particularmente haptenos), etc. Están asequibles numerosos tipos de inmunoensayos, los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden suministrar también estuches (kits) para uso con los presentes anticuerpos en la protección contra o la detección de una actividad celular o en lo que se refiere a la presencia de un antígeno seleccionado. Así, la presente composición de anticuerpos de esta invención puede proporcionarse, usualmente en una forma liofilizada en un envase, sea sola o en asociación con anticuerpos adicionales específicos para el tipo de células deseado. Los anticuerpos, que pueden estar conjugados con un marcador o toxina, o no

conjugados, se incluyen en los estuches con tampones, tales como Tris, fosfato, carbonato, etc., estabilizadores, biocidas, proteínas inertes, p.ej., seroalbúmina, o análogos, y un juego de introducciones para su empleo. Generalmente, estos materiales estarán presentes en cantidad menor que aproximadamente 5% en peso basada en la cantidad de anticuerpo activo, y usualmente estarán presentes en una cantidad total de al menos aproximadamente 0,001% en peso, basada de nuevo en la concentración de anticuerpo. Frecuentemente, será deseable incluir un extendedor o excipiente inerte para diluir los ingredientes activos, donde el excipiente puede estar presente en una proporción comprendida entre aproximadamente 1 y 99% en peso de la composición total. En los casos en que se emplea en un ensayo un segundo anticuerpo capaz de fijarse al anticuerpo quimérico, éste estará presente usualmente en un vial separado. El segundo anticuerpo está conjugado típicamente a un marcador y se formula de una manera análoga con las formulaciones de anticuerpos descritas anteriormente.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a manera de ilustración, y no de limitación.

#### Parte experimental

##### *Diseño de genes para cadenas ligera y pesada semejantes a las humanas*

La secuencia del anticuerpo humano Eu (Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, E., et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, 1983) se utilizó para proporcionar el entramado del anticuerpo humanizado, debido a que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-Tac es más homóloga a la cadena pesada de este anticuerpo que a cualquier otra secuencia de cadena pesada disponible en el National Biomedical Foundation Protein Identification Resource.

Para seleccionar la secuencia de la cadena pesada humanizada, se alineó la secuencia de la cadena pesada de anti-Tac con la secuencia de la cadena pesada de Eu (Figura 1). En cada posición, se seleccionó el aminoácido de Eu para la secuencia humanizada, a no ser que la posición cayera en una cualquiera de las categorías siguientes, en cuyo caso se seleccionó el aminoácido de anti-Tac.

- (1) La posición caía dentro de una región determinante de la complementariedad (CDR), como ha sido definido por Kabat, et al., *op. cit.* (aminoácidos 31-35, 50-66, 99-106);
- (2) el aminoácido de Eu era inusual para cadenas pesadas humanas en dicha posición, mientras que el aminoácido de anti-Tac era típico para cadenas pesadas humanas en dicha posición (aminoácidos 27, 93, 95, 98, 107-109, 111);
- (3) la posición era inmediatamente adyacente a una CDR en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anti-Tac (aminoácidos 30 y 67);
- (4) el modelo tridimensional del anticuerpo anti-Tac sugería que el aminoácido estaba físicamente muy próximo a la región de fijación del antígeno (aminoácidos 48 y 68).

Algunos aminoácidos caían dentro de más de una de estas categorías, pero se incluyen únicamente en una de ellas.

Para seleccionar la secuencia de la cadena ligera humanizada, la secuencia de cadena ligera de anti-Tac se alineó con la secuencia de la cadena ligera de Eu (Figura 2). Se seleccionó en cada posición el aminoácido de Eu, a no ser que la posición cayera de nuevo en una de las categorías (1) - (4), (reemplazando la cadena ligera a la cadena pesada en las definiciones de categoría):

- (1) CDR (aminoácidos 24-34, 50-56, 89-97).
- (2) Aminoácido de anti-Tac más típico que el de Eu (aminoácidos 48 y 63).
- (3) Adyacente a CDR (ausencia de aminoácidos; Eu y anti-Tac eran ya iguales en todas estas posiciones).
- (4) Posible proximidad tridimensional a la región de fijación (aminoácido 60).

La secuencia de nucleótidos real de los genes de la cadena pesada (Figura 3) y la cadena ligera (Figura 4) se seleccionaron como sigue:

- (1) Las secuencias de nucleótidos codifican las secuencias de aminoácidos seleccionadas como se ha descrito anteriormente.
- (2) En la dirección 5' de estas secuencias codificantes, las secuencias de nucleótidos codifican una secuencia conductora (señal), a saber el conductor de la cadena ligera del anticuerpo MOPC 63 y el conductor de la cadena pesada del anticuerpo PCH 108A (Kabat et al., *op. cit.*). Estas secuencias conductoras se seleccionaron como típicas de anticuerpos.
- (3) En la dirección 3' de las secuencias codificantes, las secuencias de nucleótidos son las secuencias que siguen al segmento J5 de la cadena ligera de ratón y al segmento J2 de la cadena pesada de ratón, las cuales forman parte de las secuencias de anti-Tac. Estas secuencias se incluyen debido a que las mismas contienen señales donantes de corte y empalme.
- (4) En cada extremo de la secuencia existe un sitio Xba I que permite el corte en los sitios Xba I y la clonación en el sitio Xba I de un vector.

#### Construcción de genes de cadena ligera y pesada humanizados

Para sintetizar la cadena pesada, se sintetizaron cuatro oligonucleótidos HES12, HES13, HES14, HES15 (Figura 5A) utilizando un sintetizador de ADN de Applied Biosystems 380B. Dos de los oligonucleótidos forman parte de cada hebra de la cadena pesada, y cada oligonucleótido se superpone con el siguiente en aproximadamente 20 nucleótidos para permitir la reasociación (Figura 5B). Juntos, los oligonucleótidos abarcan la cadena pesada humanizada completa (Figura 3)

con un pequeño número de nucleótidos adicionales en cada extremo que permiten el corte en los sitios Xba I. Los oligonucleótidos se purificaron a partir de geles de poliacrilamida.

5 Cada oligonucleótido se fosforiló utilizando ATP y polinucleótido-quinasa T4 por procedimientos estándar (*véase*, Maniatis, *op. cit.*). Para reasociar los oligonucleótidos fosforilados, se suspendieron los mismos juntos en 40  $\mu$ l de TA (Tris-acetato 33 mM, pH 7,9, acetato de potasio 66 mM, acetato de magnesio 10 mM) a una concentración de aproximadamente 3,75  $\mu$ M cada uno, se calentaron a 95°C durante 4 min y se enfriaron lentamente a 4°C. Para sintetizar el gen completo a partir de los oligonucleótidos por síntesis de la hebra opuesta de cada oligonucleótido (Figura 5B), se añadieron los componentes siguientes en un volumen final de 100  $\mu$ l:

10	10 $\mu$ l	oligonucleótidos reasociados
20	0,16 $\mu$ M	cada uno
	0,5 mM	desoxirribonucleótido
	0,5 mM	ATP
	0,5 mM	DTT
25	100 $\mu$ g/ml	BSA
	3,5 $\mu$ g/ml	proteína T4 g43 (ADN - polimerasa)
30	25 $\mu$ g/ml	proteína T4 g44/62 (proteína accesoria de polimerasa)
	25 $\mu$ g/ml	proteína 45 (proteína accesoria de polimerasa)

35 La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Se añadieron luego 10 U de ADN-ligasa T4 y se reanudó la incubación a 37°C durante 30 min. La polimerasa y la ligasa se inactivaron por incubación de la reacción a 70°C durante 15 min. Para digerir el gen con Xba I, se añadieron a la reacción 50  $\mu$ l de BAS que contenía 2x TA a 200  $\mu$ g/ml de DTT a 1 mM, 43  $\mu$ l de agua, y 50 U de Xba I en 5  $\mu$ l. La reacción se incubó durante 3 h a 37°C, y se corrió sobre un gel. El fragmento Xba I de 431 pares de bases (bp) se purificó a partir de un gel y se clonó al sitio Xba I del plásmido pUC19 por métodos estándar. Cuatro materiales aislados de plásmido se purificaron y se secuenciaron utilizando el método didesoxi. Uno de estos tenía la secuencia correcta (Figura 3).

50 Para sintetizar la cadena ligera, se sintetizaron cuatro oligonucleótidos JFD1, JFD2, JFD3, JFD4 (Figura 6A). Dos de los oligonucleótidos forman parte de cada hebra de la cadena ligera, y cada oligonucleótido se superpone al siguiente en aproximadamente 20 nucleótidos para permitir la reasociación (Figura 6B). Juntos, los oligonucleótidos abarcan la cadena ligera humanizada entera (Figura 4) con un pequeño número de nucleótidos adicionales en cada extremo para permitir el corte en los sitios Xba I. Los oligonucleótidos se purificaron a partir de geles de poliacrilamida.

65 El gen de la cadena ligera se sintetizó a partir de estos oligonucleótidos en dos partes. Se combinaron 0,5  $\mu$ g cada uno de JFD1 y JFD2 en 20  $\mu$ l de tampón Sequenase (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, cloruro de magnesio 20 mM, cloruro de sodio 50 mM), se calentaron a 70°C durante 3 min y se

dejaron enfriar lentamente a 23°C a fin de que los oligonucleótidos se reasociaran. Se trataron de la misma manera JFD3 y JFD4. Cada reacción se hizo 10 mM en DTT y 0,5 mM en cada desoxirribonucleótido y se añadieron 6,5 U de Sequenase (US Biochemicals), en un volumen final de 24  $\mu$ l, y se incubó durante 1 h a 37°C para sintetizar las hebras opuestas de los oligonucleótidos. Se añadieron Xba I y Hind III a cada reacción para digerir el ADN (hay un sitio Hind III en la región en la que se superponen JFD2 y JFD3 y por consiguiente en cada uno de los ADNs sintetizados; Figura 6B). Las reacciones se corrieron sobre geles de poliacrilamida, y los fragmentos Xba I - Hind III se purificaron y se clonaron a pUC18 por métodos estándar. Varios materiales aislados de plásmido para cada fragmento se secuenciaron por el método dideoxi, y se seleccionaron los correctos.

#### *Construcción de plásmidos que expresan las cadenas ligera y pesada humanizadas*

El fragmento Xba I de la cadena pesada se aisló a partir del plásmido pUC19 en el que se había insertado y se insertó luego en el sitio Xba I del vector pV $\gamma$ 1 en la orientación correcta por métodos estándar, para producir el plásmido pHuGTAC1 (Figura 7). Este plásmido expresará altos niveles de una cadena pesada completa cuando se transfecte a una célula hospedante apropiada.

Los dos fragmentos de cadena ligera Xba I - Hind III se aislaron a partir de los plásmidos pUC18 en los cuales se habían insertado. El plásmido vector pV $\rightarrow$  se cortó con Xba I, se desfosforiló y se ligó con los dos fragmentos por métodos estándar. El producto de reacción deseado tiene la forma circular: vector - Xba I - fragmento 1 - Hind III - fragmento 2 - Xba I - vector. Se analizaron varios materiales aislados de plásmido por mapeado de restricción y secuenciación, y se seleccionó uno que tenía esta forma. Este plásmido, pHuLTAC (Figura 8), contiene por consiguiente la cadena ligera humanizada completa (Figura 4) y expresará niveles altos de la cadena ligera cuando se transfecte a una célula hospedante apropiada.

#### *Síntesis y afinidad del anticuerpo humanizado*

Los plásmidos pHuGTAC1 y pHuLTAC se transfectaron a células Sp2/0 de ratón, y las células que integraban los plásmidos se seleccionaron sobre la base de resistencia al ácido micofenólico y/o higromicina B conferida por los genes gpt y hyg en los plásmidos (Figuras 7,8) por métodos estándar. Para comprobar que estas células secretaban anticuerpo que se fija al receptor de IL-2, el sobrenadante de las células se incubó con células HUT-102 que se sabe expresan el receptor de IL-2. Después del lavado, las células se incubaron con anticuerpo anti-humano de cabra conjugado con fluoresceína, se lavaron, y se analizaron en cuanto a fluorescencia en un citofluorómetro FACSCAN. Los resultados (Figura 9A), demuestran claramente que el anticuerpo humanizado se fija a estas células, pero no a las células T de Jurkat que no expresan el receptor de IL-2 (Figura 9D). Como testigos, se utilizó también el anticuerpo anti-Tac de ratón original para teñir estas células (Figura 9B,C) dando re-

sultados similares.

Para experimentos adicionales, células que producían el anticuerpo humanizado se inyectaron en ratones, y se recogió la ascitis resultante. El anticuerpo humanizado se purificó hasta homogeneidad sustancial a partir de la ascitis por paso a través de una columna de afinidad de anticuerpo de inmunoglobulina anti-humana de cabra, preparado sobre un soporte Affigel-10 (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, CA) de acuerdo con técnicas estándar. Para determinar la afinidad del anticuerpo humanizado con relación al anticuerpo anti-Tac original, se realizó un experimento de fijación competitiva. Aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> células HUT-102 se incubaron con cantidades conocidas (10-40 ng) del anticuerpo anti-Tac y el anticuerpo anti-Tac humanizado durante 10 min a 4°C. Se añadieron luego 100 ng de anti-Tac biotinilado a las células y se incubaron durante 30 min a 4°C. Previamente se había determinado que esta cantidad de anti-Tac era suficiente para saturar los sitios de fijación en las células, pero que no se encontraba en gran exceso. Después de ello se lavaron dos veces las células con 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0,1% de azida de sodio. Las células se incubaron luego durante 30 min a 4°C con 250 ng de avidina conjugada con ficoeritrina, la cual se fijaba al anti-Tac biotinilado ya fijado a las células. Las células se lavaron de nuevo como anteriormente, se fijaron en PBS que contenía 1% de paraformaldehído, y se analizaron en cuanto a fluorescencia en un citofluorómetro FACSCAN.

El uso de cantidades crecientes (10-40 ng) del anticuerpo anti-Tac como competidor en la primera etapa disminuía la cantidad de anti-Tac biotinilado que podía fijarse a las células en la segunda etapa, y por consiguiente la cantidad de avidina conjugada con ficoeritrina que se fijaba en la última etapa, disminuyendo así la fluorescencia (Figura 10A). Cantidades equivalentes (20 ng) de anti-Tac, y anti-Tac humanizado utilizado como competidor reducían la fluorescencia aproximadamente en el mismo grado (Figura 10B). Esto demuestra que estos anticuerpos tienen aproximadamente la misma afinidad (dentro de 3 a 4 veces), dado que si uno de ellos tuviera una afinidad mucho mayor, el mismo habría competido más eficazmente con el anti-Tac biotinilado, reduciendo por consiguiente más la fluorescencia.

#### *Propiedades biológicas del anticuerpo humanizado*

Para uso óptimo en el tratamiento de la enfermedad humana, el anticuerpo humanizado debería ser capaz de destruir las células T en el cuerpo que expresan el receptor de IL-2. Un mecanismo por el cual los anticuerpos pueden destruir las células diana es la citotoxicidad mediada por células dependientes de los anticuerpos, abreviada ADCC (*Fundamental Immunology*, Paul, W., compilador, Raven Press, Nueva York (1984), en la página 681), en la cual el anticuerpo forma un puente entre la célula diana y una célula efectora tal como un macrófago que puede lisar la diana. Para determinar si el anticuerpo humanizado y el anticuerpo anti-Tac de ratón original pueden mediar en la ADCC, se llevó a cabo un ensayo de liberación de cromo por métodos estándar. Específicamente, células HUT-102 de

la leucemia humana, que expresan el receptor de IL-2, se incubaron con  $^{51}\text{Cr}$  para permitir que las mismas absorbieran este radionucleido. Las células HUT-102 se incubaron luego con un exceso de anticuerpo anti-Tac o anti-Tac humanizado. A continuación, las células HUT-102 se incubaron durante 4 horas con una relación 30:1 ó 100:1 de células efectoras, las cuales eran células mononucleares de sangre periférica humana purificada normal que se habían activado por incubación durante aproximadamente 20 horas con IL-2 recombinante humana. La liberación de  $^{51}\text{Cr}$ , que indicaba la lisis de las células HUT-102 diana, se midió y se restó el ruido de fondo (Tabla 1). Los resultados muestran que para cualquier relación de células efectoras, anti-Tac no lisaba un número significativo de las células diana (menos del 5%), mientras que el anticuerpo humanizado sí lo hacía (más de 20%). Por tanto, el anticuerpo humanizado será probablemente más eficaz que el anticuerpo de ratón original en el tratamiento de la leucemia de las células T u otras enfermedades mediadas por las células T.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

TABLA 1  
*Porcentaje de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  después de ADCC*

	Relación efector:diana	
	30:1	100:1
<i>Anticuerpo</i>		
Anti-Tac	4%	< 1%
Anti-Tac humanizado	24%	23%

Por lo que antecede, se apreciará que las inmunoglobulinas semejantes a las humanas de la presente invención ofrecen numerosas ventajas sobre otros anticuerpos. Por ejemplo, en comparación con los anticuerpos monoclonales anti-Tac de ratón, las presentes inmunoglobulinas receptoras de IL-2 semejantes a las humanas se pueden producir más económicamente y contienen una cantidad sustancialmente menor de secuencias de aminoácidos extrañas. Esta probabilidad reducida de antigenicidad después de la inyección a un paciente humano representa una mejora terapéutica significativa para las inmunoglobulinas diseñadas de acuerdo con los criterios indicados anteriormente.

## REIVINDICACIONES

1. El uso de al menos una sustitución de aminoácido fuera de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) como se definen por Kabat et al ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, (1983)) junto con Chothia et al (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)) en la producción de una inmunoglobulina humanizada, donde dicha sustitución de aminoácido procede de la región variable no perteneciente a las CDR de una inmunoglobulina donante no humana, y en la cual inmunoglobulina humanizada la secuencia de aminoácidos de la región variable distinta de las CDR comprende al menos 70 restos de aminoácidos idénticos a una secuencia de aminoácidos de la región variable de una inmunoglobulina humana aceptora, y las CDR pertenecen a la región variable de dicha inmunoglobulina donante no humana.

2. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha inmunoglobulina humanizada es específicamente reactiva con la proteína p55 Tac, es capaz de inhibir la fijación de interleuquina-2 (IL-2) humana a un receptor de IL-2 humana, o es capaz de fijarse a un receptor de IL-2 humana.

3. Un uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha inmunoglobulina humanizada exhibe una afinidad de fijación a un receptor de IL-2 humana de aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$  o más fuerte.

4. Un uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que las secuencias proteínicas de las regiones variables ligera y pesada maduras de dicha inmunoglobulina humanizada son homólogas a las secuencias de la proteína madura representadas en las Figuras 3 y 4.

5. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha inmunoglobulina humanizada es un isotipo de inmunoglobulina IgG<sub>1</sub>.

6. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha sustitución es inmediatamente adyacente a una CDR.

7. Un método de producción de una cadena de inmunoglobulina humanizada que tiene una región de entramado procedente de una inmunoglobulina aceptora humana y regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") procedentes de una inmunoglobulina donante capaces de fijarse a un antígeno, comprendiendo dicho método sustituir al menos un aminoácido del entramado de la inmunoglobulina aceptora no perteneciente a las CDR con un aminoácido correspondiente procedente de la inmunoglobulina donante en una posición en las inmunoglobulinas en que:

(a) el aminoácido en la región de entramado humana de la inmunoglobulina aceptora es raro para dicha posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es común para dicha posición en secuencias de inmunoglo-

bulina humana; o

(b) el aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o

(c) se predice que el aminoácido tiene un átomo de cadena lateral capaz de interactuar con el antígeno o con las CDR de la inmunoglobulina humanizada.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que existen al menos tres de dichos aminoácidos de entramado no pertenecientes a las CDR sustituidos por aminoácidos procedentes de la inmunoglobulina donante seleccionados por los criterios (a), (b) o (c).

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que al menos uno de los aminoácidos sustituidos procedentes del donante es inmediatamente adyacente a una CDR.

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que las secuencias proteínicas de las regiones variables ligera y pesada maduras de dicha inmunoglobulina humanizada son homólogas a las secuencias de la proteína madura representadas en las Figuras 3 y 4.

11. Una cadena de inmunoglobulina humanizada que se puede obtener por un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

12. Una cadena de inmunoglobulina humanizada que se puede obtener por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.

13. Una inmunoglobulina humanizada en la cual las cadenas pesada y ligera son cadenas de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12.

14. Un polinucleótido que comprende una primera secuencia que codifica una región de entramado de inmunoglobulina semejante a la humana no perteneciente a las CDR y una segunda secuencia que codifica una o más CDR, en el que, en la expresión, dicho polinucleótido codifica una cadena de inmunoglobulina de la reivindicación 11 o la reivindicación 12.

15. Polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 14 que, en la expresión, codifican las cadenas que constituyen una inmunoglobulina de la reivindicación 13.

16. Una línea de células transfectada con un polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 14 o la reivindicación 15.

17. Un procedimiento para la preparación de una inmunoglobulina tal y como se ha definido en la reivindicación 13, cuyo procedimiento comprende cultivar una línea celular tal y como se ha definido en la reivindicación 16 y aislar la inmunoglobulina humanizada a partir del medio de cultivo celular.

18. El uso de una inmunoglobulina de la reivindicación 13 o un fragmento de fijación de la misma en la fabricación de un medicamento.

19. Un uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el cual el medicamento es adecuado para tratar trastornos mediados por las células T en un paciente humano.

20. Una preparación farmacéutica que con-

tiene una inmunoglobulina humanizada de acuerdo con la reivindicación 13, formulada en forma farmacéuticamente aceptable.

21. Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, y para el tratamiento de trastornos mediados por células T.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

65

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---

1	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	K	P	G	A	S	V	K	M
1	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V
21	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	R	M	H	W	V	K	Q	R
21	S	C	K	A	S	G	G	T	F	S	R	S	A	I	I	W	V	R	Q	A
41	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	Y	I	N	P	S	T	G	Y	T	E	Y
41	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	G	I	V	P	M	F	G	P	P	N	Y
61	N	Q	K	F	K	D	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y
61	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	A	D	E	S	T	N	T	A	Y
81	M	Q	L	S	S	L	T	F	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	
81	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	F	Y	F	C	A	G	G	Y
100	G	G	V	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S			
101	G	I	Y	S	P	E	E	Y	N	G	G	L	V	T	V	S	S			

FIG.\_1.

1	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T
1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
21	I	T	C	S	A	S	S	S	I		S	Y	M	H	W	F	Q	Q	K	P
21	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	N	T	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
40	G	T	S	P	K	L	W	I	Y	T	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A
41	G	K	A	P	K	L	L	M	Y	K	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S
60	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	R	M	E	A
61	R	F	I	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
80	E	D	A	A	T	Y	Y	C	H	Q	R	S	T	Y	P	L	T	F	G	S
81	D	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	D	S	K	M	F	G	Q
100	G	T	K	L	E	L	K													
101	G	T	K	V	E	V	K													

FIG.\_2.

ES 2 081 974 T3

10 20 30 40 50 60  
TCTAGATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGTACCGCGGGCGGTGCACT  
M G W S W I F L F L L S G T A G V H

70 80 90 100 110 120  
CTCAGGTCCAGCCTTGTCCAGTCTGGGGCTGAAGTCAAGAAACCTGGCTCGAGCGTGAAGG  
S Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K

130 140 150 160 170 180  
TCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACAGGATGCACCTGGGTAAGGCAGG  
V S C K A S G Y T F T S Y R M H W V R Q

190 200 210 220 230 240  
CCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATATATTAATCCGTGCGACTGGGTATACTGAAT  
A P G Q G L E W I G Y I N P S T G Y T E

250 260 270 280 290 300  
ACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCAACAATTACTGCAGACGAATCCAGCAATACAGCCT  
Y N Q K F K D K A T I T A D E S T N T A

310 320 330 340 350 360  
ACATGGAAGTCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGG  
Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G

370 380 390 400 410 420  
GGGGGTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACAGTCTCCTCAGGTGAGTCCT  
G G V F D Y W G Q G T L V T V S S

430  
TAAAACCTCTAGA

FIG. 3.

10 20 30 40 50 60  
TCTAGATGGAGACCGATACCCCTCCTGCTATGGGTCCCTGCTATGGGTCCAGGATCAA  
M E T D T L L L W V L L L W V P G S

70 80 90 100 110 120  
CGGGAGATATTCAGATGACCCAGTCTCCATCTACCCTCTCTGCTAGCGTGGGGATAGGG  
T G D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R

130 140 150 160 170 180  
TCACCATAAGCTGCTCTGCCAGCTCAAGTATAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGC  
V T I T C S A S S S I S Y M H W Y Q Q K

190 200 210 220 230 240  
CAGGCAAAGCTCCCAAGCTTCTAATTTATACCAGATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTG  
P G K A P K L L I Y T T S N L A S G V P

250 260 270 280 290 300  
CTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCGAGTTCACCCTCACAATCAGCTCTCTGCAGC  
A R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q

310 320 330 340 350 360  
CAGATGATTTGCCACTTATTACTGCCATCAAAGGAGTACTTACCCACTCAGGTTCCGGTC  
P D D F A T Y Y C H Q R S T Y P L T F G

370 380 390 400  
AGGGGACCAAGGTGGAGGTCAAACGTAAGTACACTTTTCTAGA  
Q G T K V E V K

FIG.\_4.



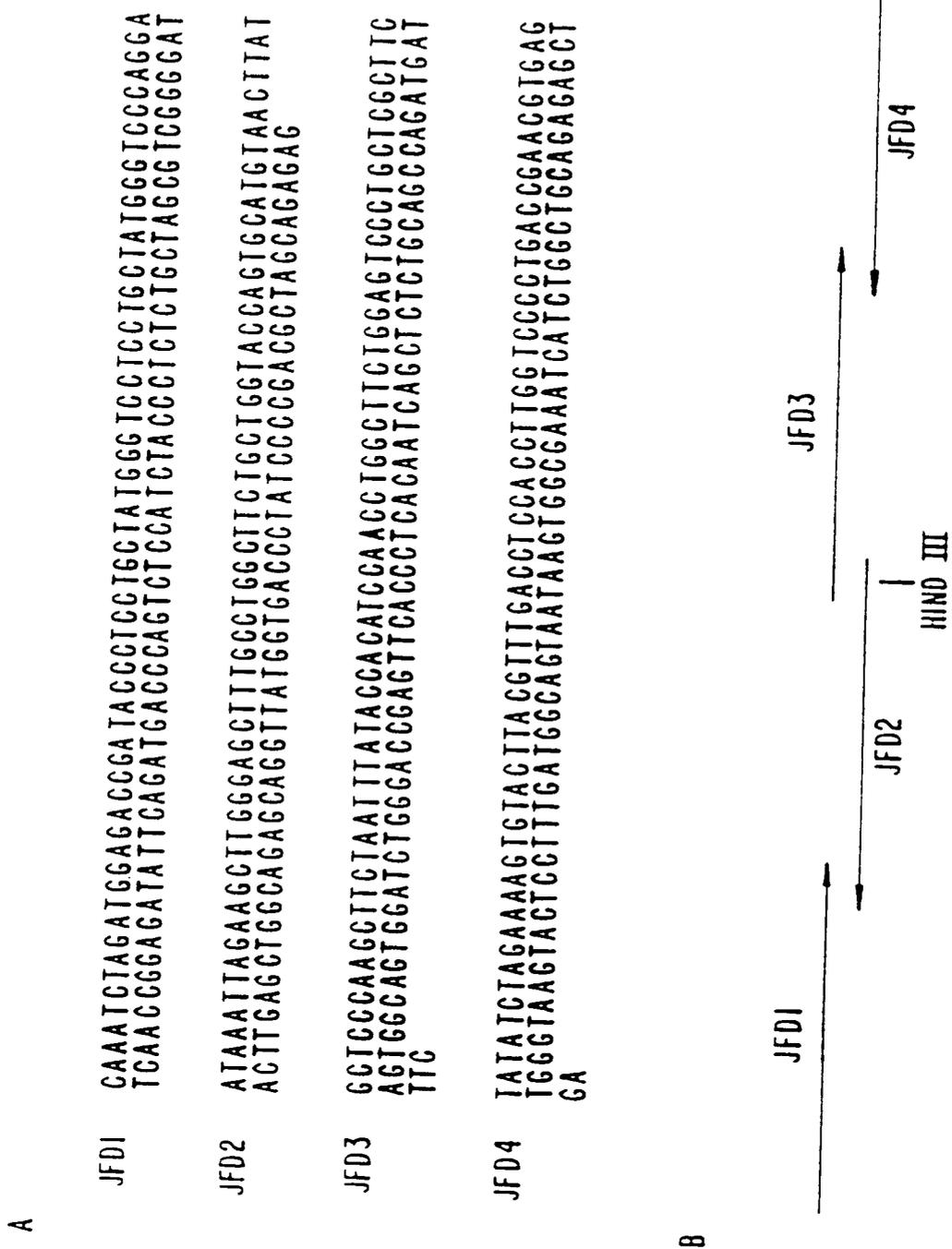


FIG.\_6.

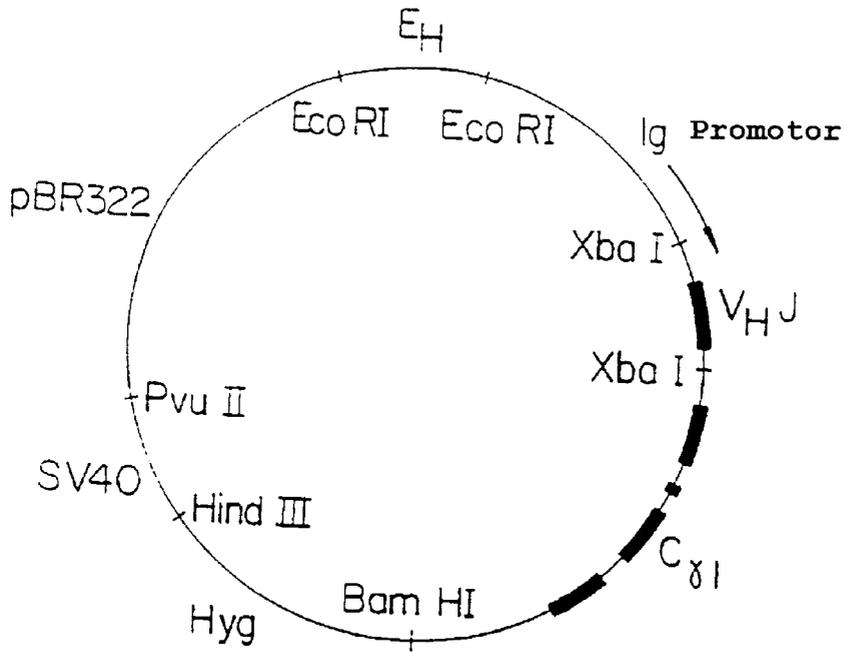


FIG. 7.

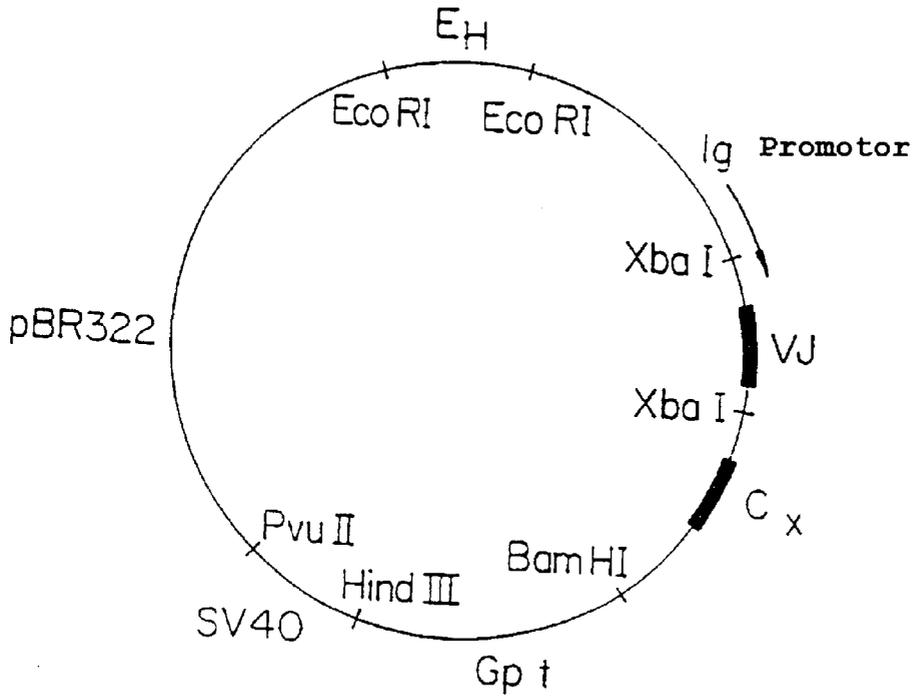


FIG. 8.

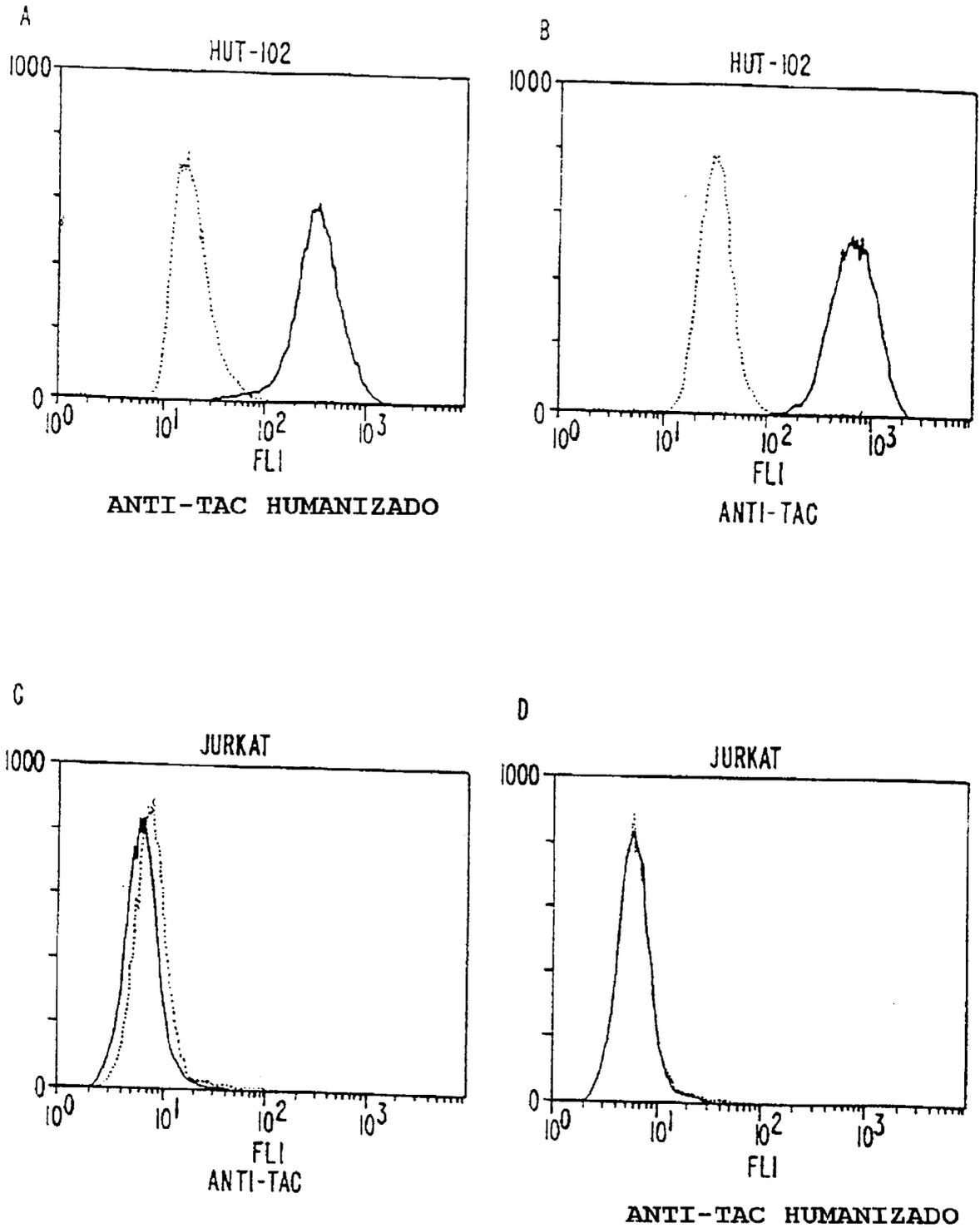
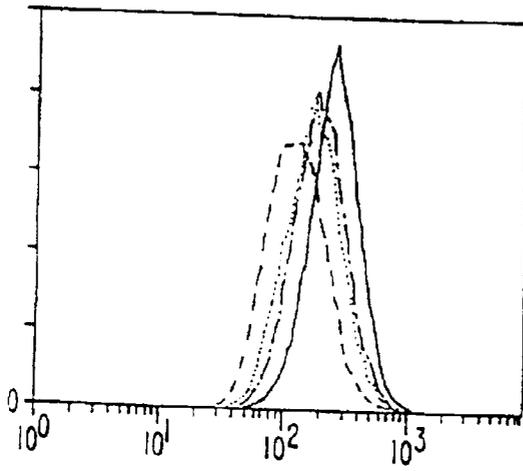


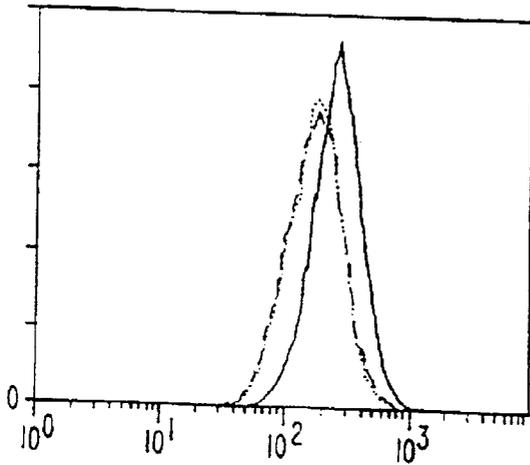
FIG. 9.

A



— 0 NG ANTI-TAC  
- - 10 NG  
... 20 NG  
- . - 40 NG

B



— 0 NG ANTI-TAC  
... 20 NG ANTI-TAC  
- - 20 NG ANTI-TAC HUMANIZADO

FIG. 10.