



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 896**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02798403 .8**

96 Fecha de presentación : **19.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1414861**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54

Título: **Anticuerpos humanizados contra ICAM-1, su producción y usos.**

30

Prioridad: **19.07.2001 US 910483**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.04.2011

73

Titular/es: **PERLAN THERAPEUTICS, Inc.**
6310 Nancy Ridge Drive, Suite 102
San Diego, California 92121, US

72

Inventor/es: **Fang, Fang;**
Luo, Guang-Xiang;
Kohlstaedt, Lori, Allison y
Charles, Catherine, Helen

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 356 896 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a composiciones de anticuerpos humanizados y métodos para preparar y usar anticuerpos humanizados.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los anticuerpos monoclonales se han vuelto una clase importante de proteínas terapéuticas. Sin embargo, las inmunoglobulinas ajenas, usadas en seres humanos pueden producir una respuesta de anti-globulina que puede interferir con la terapia o causar una hipersensibilidad compleja alérgica o inmune. Para evitar este problema, el anticuerpo monoclonal puede ser "humanizado", y esto se realiza típicamente mediante el injerto de CDR.

10 Las CDR, también llamadas regiones hipervariables, están presentes en las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina y están bordeadas por las regiones "marco". El injerto de CDR fue descrito por primera vez en Jones *et al.* ((1986) *Nature* **321**:522-525). En ésta y en publicaciones posteriores, las CDR de tres anticuerpos de ratón fueron injertadas en el marco del dominio variable de la inmunoglobulina humana NEW (V_H) y REI (V_L). Los anticuerpos humanizados que resultaron tenían la misma especificidad de antígeno y una afinidad similar que el anticuerpo monoclonal murino parenteral (mAb) (Jones *supra*; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* **239**:1534-1536; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* **332**:323-327; patente de EE.UU. N.º. 5.225.539).

El injerto de CDR ha sido descrito por Queen y colaboradores que describieron la humanización de cuatro anticuerpos monoclonales murinos (Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:10029-10033; Co *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2869-2873; Co *et al.* (1992) *J. Immunol.* **148**:1149-1154; y patentes de EE.UU. N.º. 5-585.089; 5.693.761; y 5.693.762). Los residuos murinos fueron insertados en el marco humano a fin de mantener la afinidad y, en cada caso fue mantenida la especificidad del antígeno original. Las afinidades de los anticuerpos humanizados están en el intervalo de 1/3 a 3 veces de los anticuerpos murinos no modificados parenterales.

COMPENDIO

La invención proporciona anticuerpos humanizados que se unen a ICAM-1, en el que el anticuerpo tiene un dominio V_H y V_L seleccionado de: SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40). Se proporcionan subsecuencias de anticuerpos que se unen a ICAM-1, por ejemplo, fragmentos de cadena sencilla, Fab, Fab' y (Fab)₂. El anticuerpo humanizado tiene mayor afinidad para ICAM-1 que el anticuerpo (no humano) parenteral. También son proporcionadas las formas variantes y modificadas de anticuerpos que se unen a ICAM-1, por ejemplo, anticuerpos que tienen un dominio V_H y V_L seleccionado de: SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO: 18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40), teniendo una de cada diez sustituciones de aminoácidos conservadoras.

La invención también proporciona los anticuerpos humanizados como los que se definen más arriba que se unen a ICAM-1 e inhiben la infección patógena de células que expresan ICAM-1. Tales anticuerpos de la invención incluyen los anticuerpos que proporcionan una protección igual o mayor de la infección patógena que el anticuerpo (no humano) parenteral. En aspectos particulares, un anticuerpo humanizado tiene una eficacia protectora igual o al menos 2 veces mayor, 5 veces mayor, 10 veces mayor, 20 veces mayor, 30 veces mayor que el anticuerpo no humanizado. Los patógenos son rinovirus humano (RVH), virus coxsacke A, virus respiratorio sincitial (VSR) o los patógenos que causan la malaria.

Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen moléculas de inmunoglobulina intactas, que comprenden 2 cadenas pesadas de la cadena entera y 2 cadenas ligeras de la cadena entera, por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgE, e IgD, y subsecuencias que inhiben la infección por el patógeno. Las subsecuencias particulares incluyen, por ejemplo, un fragmento de cadena sencilla, Fab, Fab' o (Fab)₂.

Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen anticuerpos multiespecíficos o multifuncionales. En un aspecto, tal anticuerpo se forma uniendo un anticuerpo humanizado a uno o varios anticuerpos idénticos o diferentes para formar un multímero (p.ej usando un conector). Los multímeros de anticuerpo incluyen un homo-o hetero-dímero, trímero, tetrámero o cualquier otro oligómero de orden más alto. Los multímeros de anticuerpos que incluyen diferentes anticuerpos son humanos, humanizados o no humanos. Las formas multiméricas incluyen oligómeros de anticuerpo que se forman a través de un dominio de multimerización (p.ej una secuencia de aminoácidos humana) o un enlace covalente. Los multímeros de anticuerpo que incluyen un dominio de multimerización, incluyen además formas que localizan un conector entre el dominio de multimerización y el anticuerpo.

Además, se describen métodos para producir anticuerpos humanizados. Un método incluye: seleccionar una secuencia marco humana como aceptadora, en donde dicha secuencia tiene el 50 % o más identidad (p.ej, 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, o más identidad) respecto a una región marco del anticuerpo donador no humano; injertar un CDR del anticuerpo no humano donador (p.ej, murino) en el marco humano;

- comparar los residuos de la zona de vernier del aceptador humano y las regiones marco del donador no humanas; y mantener uno o más de los residuos del aceptador humano en la zona de vernier cuando los residuos del donador no humanos y humanos son estructuralmente o químicamente similares, o sustituir uno o varios de los residuos de zona de vernier con un residuo que es diferente tanto del residuo de la zona vernier no humano del donador como del residuo de la zona vernier humano del aceptador si el residuo de la zona vernier no humano del donador es estructuralmente o químicamente distinto al residuo humano, en donde el residuo diferente es estructuralmente o químicamente similar al residuo de la zona vernier no humano del donador. Además, las secuencias marco del aceptador humano se seleccionan de una secuencia consenso, por ejemplo, las secuencias consenso del subgrupo I y subgrupo II del dominio V_H.
- También se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos humanizados, subsecuencias y sus formas modificadas (p.ej, adiciones de aminoácidos, eliminaciones o sustituciones). Las secuencias de ácidos nucleicos además incluyen casetes de expresión en los que el ácido nucleico que codifica anticuerpos humanizados está operativamente unido a un elemento del control de la expresión. También se proporcionan los vectores y las células (procariotas y eucariotas) que incluyen los ácidos nucleicos.
- La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que incluyen anticuerpos humanizados como se define en las reivindicaciones, subsecuencias, multímeros, variantes y formas modificadas, y ácidos nucleicos que las codifican, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En aspectos particulares, el vehículo farmacéuticamente aceptable es compatible con la inhalación o administración nasal a un sujeto.
- La invención se refiere además a métodos para inhibir la infección patógena de una célula. En una realización, un método incluye poner en contacto un patógeno o una célula con una cantidad de un anticuerpo humanizado, subsecuencia, multímero, forma variante o modificada suficiente para inhibir la infección patógena de la célula. En un aspecto, la célula expresa ICAM-1. En otro aspecto, la célula (p.ej., la célula epitelial) está presente en un sujeto.
- La invención también se refiere a métodos para inhibir la infección por RVH de una célula. En una realización, un método incluye el RVH que se pone en contacto, o una célula susceptible a la infección por RVH, con una cantidad de un anticuerpo humanizado, subsecuencia, multímero, forma variante o modificada eficaz para inhibir la infección por RVH de la célula (p.ej., célula epitelial). En un aspecto, la célula está presente en un sujeto. En otro aspecto, la célula está presente en un sujeto que padece o está en peligro de padecer asma. En otro aspecto más, el sujeto es un recién nacido o entre los años de 1 a 5, de 5 a 10 o de 10 a 18. En todavía otro aspecto más, el anticuerpo, subsecuencia, multímero, la forma variante o modificada se une a un antígeno presente en la superficie de la célula (p.ej., ICAM-1). En varios aspectos adicionales, el anticuerpo humanizado es administrado localmente, por medio de inhalación o intranasalmente.
- Se describen métodos para inhibir la infección por RVH, inhibiendo la progresión del RVH o tratando la infección del RVH de un sujeto. Un método incluye administrar, en un sujeto que padece o está en peligro de padecer una infección por RVH, una cantidad de un anticuerpo humanizado de la invención, subsecuencia, multímero, forma variante o modificada eficaz para inhibir la infección por RVH, inhibiendo la progresión del RVH o tratando la infección por RVH del sujeto. En un aspecto, el sujeto padece o está en peligro de padecer asma. En otro aspecto, el sujeto es un recién nacido o tiene de 1 a 5, de 5 a 10 o de 10 a 18 años. En varios aspectos adicionales, el anticuerpo humanizado se administra localmente, por medio de la inhalación o intranasalmente.
- Además, se describen métodos para disminuir o inhibir uno o varios síntomas del resfriado común en un sujeto. Un método incluye administrar, en un sujeto que tiene un resfriado común, una cantidad de un anticuerpo humanizado de la invención, subsecuencia, multímero, forma variante o modificada eficaz para disminuir o inhibir uno o varios síntomas del resfriado común en el sujeto. En un aspecto, el sujeto padece o está en peligro de padecer asma. En otro aspecto, el sujeto es un recién nacido o tiene de 1 a 5, de 5 a 10 o de 10 a 18 años. En varios aspectos adicionales, el anticuerpo humanizado se administra localmente, por medio de la inhalación o intranasalmente.
- BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES**
- La **figura 1** muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 1A6 murino (SEQ ID NO:77 y 79) y la secuencia consenso humana del subgrupo III de la cadena pesada (Hum3; SEQID NO:78) y subgrupo I kappa de la cadena ligera (Hum□I; SEQ ID NO:80). Los asteriscos denotan diferencias de aminoácidos entre la secuencia de ratón y humana. Los aminoácidos de CDR, como se define por Kabat y Chothia, están en negrita.
- La **figura 2** muestra las secuencias de aminoácidos del anticuerpo 1A6 murino (SEQ ID NO:77), 1A6 humanizado (HumB; SEQ ID NO:4) y secuencias consenso humanas del subgrupo III de la cadena pesada (Hum3; (SEQ ID NO:78) y subgrupo I kappa de la cadena ligera (Hum□I; (SEQ ID NO:80). Los asteriscos y los aminoácidos en negrita son como se indica antes.
- La **figura 3** muestra las secuencias de cDNA del anticuerpo scFVA humanizado (HumA) (SEQ ID NO:2). Los sitios de restricción son indicados subrayando; sitio Nco CCATGG; sitio BamH GGATCC; sitio Hpa GTTAAC. Los aminoácidos en negrita son como se indica antes.

La **figura 4** muestra la protección de la infección por RVH15 con el anticuerpo de scFv 1A6 de ratón (anticuerpos de scFv Ms1 y 1A6 humanizados HumA, HumB, HumC, HumD, HumF, HumH y HumI).

La **figura 5** muestra secuencias de aminoácidos del dominio V_H de 1A6 murino (SEQ ID NO:77) y secuencias consenso humanas del subgrupo I del dominio V_H (Hum1; (SEQ ID NO:82) y subgrupo II (Hum2; SEQ ID NO:81). Los aminoácidos en **negrita** son como se indica antes.

La **figura 6** muestra las secuencias de aminoácidos del dominio V_H del anticuerpo 1A6 murino (SEQ ID NO:77), 1A6 humanizado (Hum40; SEQ ID NO:20) y secuencias consenso humanas del subgrupo II de la cadena pesada (Hum2; SEQ ID NO:81). Los asteriscos y los aminoácidos en **negrita** son como se indica antes.

La **figura 7** muestra las secuencias de aminoácidos del dominio V_H del anticuerpo 1A6 murino (SEQ ID NO:77), 1A6 humanizado (Hum50; SEQ ID NO:21) y secuencias consenso humanas del subgrupo I de la cadena pesada (Hum1; SEQ ID NO:82). Los asteriscos y los aminoácidos en **negrita** son como se indica antes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención está basada, al menos en parte, en la producción de anticuerpos humanizados. Más en particular, la región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano es injertada en una región marco humana. Después de la transferencia, uno o varios aminoácidos del anticuerpo mutan en un aminoácido humano o mutan en un aminoácido no humano que tiene semejanzas estructurales respecto al aminoácido que éste sustituye. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido murino en un aminoácido humano en una región marco o CDR del anticuerpo injertado puede producir un anticuerpo humanizado que tiene una mayor afinidad de unión con el antígeno con relación al anticuerpo no humano o injertado. Los anticuerpos humanizados no son inmunógenos o son menos inmunógenos que los anticuerpos no humanos cuando se administran a sujetos humanos. Por lo tanto, los anticuerpos humanizados son útiles en una variedad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, como se ilustra en este documento, un anticuerpo humanizado de la invención protege a las células de la infección por RVH, un virus que puede causar el resfriado común, y otros trastornos asociados (p.ej otitis media, bronquitis, sinusitis etc.).

Así, de acuerdo con la invención, se proporcionan anticuerpos humanizados. El anticuerpo humanizado se une a ICAM-1. En un aspecto, un anticuerpo humanizado que se une a ICAM-1 protege contra la infección patógena de células que expresan ICAM-1. Dicho anticuerpo humanizado tiene un dominio V_H y V_L seleccionado de: SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40); En otra realización, un anticuerpo humanizado tiene una mayor afinidad con el antígeno que el anticuerpo no humano del donador. En aspectos particulares, el anticuerpo humanizado tiene una afinidad de unión con el antígeno de 2 a 4 veces, 5 veces, de 5 a 8 veces, de 8 a 10 veces, de 10 a 15 veces, de 15 a 20 veces, de 20 a 40 veces, de 40 a 60 veces, de 60 a 100 veces o mayor que el anticuerpo parenteral.

Las regiones de la secuencia del anticuerpo humanas se pueden usar para producir los anticuerpos humanizados de la invención. Por ejemplo, se puede usar una "secuencia consenso", una secuencia del anticuerpo que tiene los residuos de aminoácidos que aparecen con más frecuencia en las posiciones particulares en un anticuerpo o una región del anticuerpo. Como ejemplo, las secuencias del dominio de regiones variables humanas son descritas en Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4ª Ed. US Department of Health and Human Services. Public Health Service (1987)). Las secuencias que están completamente determinadas en las regiones marco, 1-23, 35-49, y 57-88 en las cadenas ligeras, y en las regiones marco, 1-30, 36-49, y 66-94, en las cadenas pesadas, son incluidas en la revisión. Para la cuarta región marco, 98-107 en la cadena ligera y 103-113 en la cadena pesada, se contemplan los residuos que pueden ser derivados de los segmentos del J-minigen conocidos.

Al final de la revisión, el residuo que aparece con más frecuencia en una posición dada es elegido como el residuo en la secuencia consenso. Las secuencias consenso pueden ser, por lo tanto, identificadas contemplando los residuos de aminoácidos en cada posición de una pluralidad de anticuerpos; el aminoácido que aparece con más frecuencia en una posición dada en la región de interés es una parte del consenso. En muchos casos, será encontrado más de un residuo a una frecuencia alta en una posición dada. En tales casos, si el aminoácido aparece al menos un cuarto tan frecuentemente como aparece el residuo de aminoácido con más frecuencia, se considera una parte de la secuencia consenso.

La secuencia consenso publicada del subgrupo III de V_H humano está basada en una revisión de 22 secuencias de III de V_H humanas conocidas, la secuencia consenso del subgrupo I de V_H humano está basado en 6 secuencias de I de V_H humanas conocidas, y la secuencia consenso del subgrupo II de V_H humana está basada en 10 secuencias conocidas en el mismo grupo. La secuencia consenso publicada del subgrupo I de kappa-cadena V_L humana, está basada en una revisión de 30 secuencias de I de kappa humanas conocidas (Padlan (1994) *Mol. Immunol.* **31**:169-217; Padlan (1991) *Mol. Immunol.* **28**:489-498). Las secuencias consenso humanas fueron usadas antes para humanizar dos anticuerpos (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4285-4289; Presta. *et al.* (1993) *J. Immunol.* **151**: 2623-2632). Estas secuencias del subgrupo I, II y III de V_H humanas, y las secuencias consenso del subgrupo I de V_L -kappa son seleccionadas como marcos, respectivamente, para humanizar mAb1A6 como se describe en los Ejemplos 1 y 8. Por lo tanto, las secuencias consenso conocidas en la técnica, como se ilustra para el subgrupo I, II y III de V_H o V_L

humano - kappa subgrupo I, se seleccionan como marcos del aceptador para producir el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención.

5 Se pueden usar cualesquiera anticuerpos de ratón, rata, cobaya, cabra, primate no humano (p.ej., mono, chimpancé, macaco, orangután, etc.) u otro animal no humano como donador de CDR para producir el anticuerpo humanizado. También se pueden usar anticuerpos murinos secretados mediante líneas de células de hibridoma. Las CDR del donador se seleccionan según el antígeno al cual se une el anticuerpo. Por lo tanto, las CDR del donador incluyen secuencias de anticuerpos que se unen a patógenos, tales como bacterias, virus, protozoos y otros microorganismos. Las CDR del donador también incluyen anticuerpos que se unen a moléculas a las cuales los patógenos se unen, por ejemplo, proteínas de la superficie de células (p.ej., proteínas de adhesión, proteínas de receptores, proteínas de reconocimiento/modulación inmune, tales como HLA, antígenos asociados a tumor, etc.). En un ejemplo particular, el anticuerpo del donador es un anticuerpo monoclonal 1A6 de ratón (mAb1A6), que se une específicamente a ICAM-1.

15 Las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" están entre las secuencias que pueden ser injertadas en la secuencias marco. Las CDR se refieren a regiones de secuencia que confieren especificidad y afinidad al anticuerpo. Las CDR también se conocen generalmente como regiones supervariables o bucles hipervariables. Se han mapeado regiones CDR de anticuerpos y son definidas como en Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4ª Ed. US Department of Health and Human Services. Public Health Service (1987)) y Chothia y Lesk ((1987) *J. Mol. Biol.* **186**:651-663)). En particular, para la cadena pesada, la CDR1 es definida como H26-H35, la CDR2 es H50-65 y la CDR3 es H95-H102; para la cadena ligera, la CDR 1 es L24-L34, CDR2 es L50-L56 y CDR3 es L89-L97. Los aminoácidos son enumerados según el esquema descrito en Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4ª Ed. US Department of Health and Human Services. Public Health Service (1987)). Los dominios de la región variable comprenden típicamente los aproximadamente 105-115 aminoácidos del extremo amino-terminal de una cadena de inmunoglobulina natural (p.ej., aminoácidos 1-110). También se pueden usar dominios variables más cortos o más largos que estas longitudes de secuencia ejemplares.

25 Por lo tanto, se describen anticuerpos humanizados, métodos para preparar los anticuerpos y métodos para usar los anticuerpos, incluyendo métodos terapéuticos y diagnósticos. Dicho anticuerpo humanizado tiene mayor afinidad con el antígeno con relación al anticuerpo no humanizado (p.ej., menos de $1,18 \cdot 10^{-6}$ M x en K_D frente a ICAM-1, menos de $1 \cdot 10^{-7}$ M x en K_D , menos de $5 \cdot 10^{-7}$ M x en K_D , menos de $1 \cdot 10^{-8}$ M x en K_D , menos de $5 \cdot 10^{-8}$ M x en K_D o menos de $1 \cdot 10^{-9}$ M x en K_D). En varios aspectos, un anticuerpo humanizado incluye un dominio V_H y V_L seleccionado de: SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO: 4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40); y sus subsecuencias unidas al antígeno. En varios aspectos adicionales, una subsecuencia del anticuerpo comprende Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, y anticuerpo de cadena sencilla (SCA), p.ej. los fragmentos de scFv.

35 Los anticuerpos humanizados de la invención también incluyen multímeros de anticuerpo. En varios aspectos, un multímero comprende un dímero, trímero, tetrámero u otro oligómero de orden más alto. En otros aspectos, los multímeros comprenden combinaciones de los mismos anticuerpos (homo-oligómeros) y anticuerpos diferentes (hetero-oligómeros), siendo los diferentes anticuerpos humanos, humanizados o no humanos.

40 Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan de modo intercambiable en este documento para referirse a dos o más aminoácidos covalentemente unidos, también denominados "residuos", por un enlace amida o equivalente. Los polipéptidos tienen una longitud ilimitada y pueden consistir en aminoácidos L- o D-, así como sus mezclas. Los aminoácidos se pueden unir por uniones químicas artificiales y no amida incluyendo, por ejemplo, las formadas con glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, o N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Las uniones no amida incluyen, por ejemplo, cetometileno, aminometileno, olefina, éter, tioéter y otros similares (véase, p.ej., Spatola (1983) en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 7, pp 267-357, "Peptide and Backbone Modifications" Marcel Decker, NY). Los polipéptidos pueden tener una o varias estructuras cíclicas, tal como un enlace amida de punta a punta entre el amino y el extremo carboxi de la molécula o un enlace disulfuro intra - o intermolecular. Los polipéptidos pueden ser modificados *in vitro* o *in vivo*, p.ej., pueden modificarse post-translacionalmente para incluir, por ejemplo, residuos de azúcar, grupos fosfato, ubiquitina, ácidos grasos o lípidos. Los polipéptidos incluyen además análogos de aminoácidos estructurales y funcionales, por ejemplo, peptidomiméticos que tienen aminoácidos sintéticos o artificiales o análogos de aminoácidos.

50 El término "anticuerpo" se refiere a una proteína que se une a otras moléculas (antígenos) por medio de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras, V_H y V_L , respectivamente. Los anticuerpos incluyen IgG, IgD, IgA, IgM e IgE. Los anticuerpos pueden ser moléculas de inmunoglobulina intactas, dos cadenas pesadas de longitud completa unidas por uniones disulfuro a dos cadenas ligeras de longitud completas, así como subsecuencias (es decir, fragmentos) de moléculas de inmunoglobulina, con o sin la región constante, que se une a un epítipo de un antígeno, o sus subsecuencias (es decir, fragmentos) de moléculas de inmunoglobulina, con o sin la región constante, que se unen a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos pueden comprender dominios variables longitud de completa de las cadenas pesadas y ligeras, V_H y V_L , individualmente o en cualquier combinación. Por ejemplo, cada uno de un dominio V_H y V_L seleccionado de: SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO: 12 y 13 (HumF); SEQ ID NO: 16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40); son incluidos individualmente y en cualquier combinación.

Las secuencias de polipéptido pueden prepararse usando tecnología del ADN recombinante de los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido por medio de la expresión de las células o traducción *in vitro*, o utilizando métodos de síntesis química de cadenas de polipéptidos conocidos en la técnica. Los anticuerpos, según la invención, incluyendo las secuencias humanizadas y subsecuencias, se pueden expresar a partir del ácido nucleico producido que codifica el anticuerpo recombinantemente (véase, p.ej., Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1999; Fitzgerald *et al.*, *J.A.C.S.* **117**:11075 (1995); Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:3576-80 (1992)). Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3, las secuencias de anticuerpo humanizadas que codifican el cDNA se pueden expresar en bacterias a fin de producir los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos también pueden ser producidos expresando los ácidos nucleicos codificantes en células de mamífero, insecto y planta. Las secuencias de polipéptidos que incluyen los anticuerpos también pueden ser producidas mediante un sintetizador químico (véase, p.ej., Applied Biosystems, Foster City, California).

Según se usa en este documento, el término "subsecuencia" o "fragmento" significa una parte de la molécula de longitud completa. Por ejemplo, una subsecuencia de un anticuerpo es uno o varios aminoácidos menores en longitud que el polipéptido de longitud completa (p.ej., una o varias eliminaciones de aminoácidos interna o del extremo amino-terminal o carboxi-terminal). Las subsecuencias, por lo tanto, pueden ser de cualquier longitud hasta la molécula de longitud completa.

Los ejemplos específicos de subsecuencias de anticuerpo incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, o un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (SCA) (p.ej., scFv). Las subsecuencias incluyen partes que retienen al menos parte de la función o actividad de la secuencia de longitud completa. Por ejemplo, una subsecuencia de anticuerpo retendrá la capacidad de unirse selectivamente a un antígeno aunque la afinidad de unión de la subsecuencia pueda ser mayor o menor que la afinidad de unión del anticuerpo de longitud completa. Las subsecuencias pueden comprender una parte de cualquiera de las secuencias humanizadas de la invención, por ejemplo, una parte del dominio V_H y V_L seleccionado de: SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO: 18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40).

Se pueden usar anticuerpos enteros de la digestión con pepsina o papaína para generar fragmentos de anticuerpo. En particular, un fragmento Fab consiste en un fragmento de unión por el antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, y puede ser producido por la digestión de una molécula de anticuerpo entera con la enzima papaína, para proporcionar un fragmento que consiste en una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada. Un fragmento (Fab')₂ de un anticuerpo puede ser obtenido tratando una molécula de anticuerpo entera con la enzima pepsina, sin una reducción subsecuente. Un fragmento Fab' de una molécula de anticuerpo puede ser obtenido a partir de (Fab')₂ por reducción con un agente reductor de tiol, que proporciona una molécula que consiste en una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo tratada de esta manera.

Un fragmento Fv es un fragmento que contiene la región variable de una cadena ligera V_L y la región variable de una cadena pesada V_H expresadas como dos cadenas. La asociación puede ser no covalente o puede ser covalente, tal como un agente de reticulación químico o un enlace disulfuro intermolecular (Inbar *et al.*, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:2659; Sandhu (1992) *Crit. Rev. Biotech.* **12**:437).

Un anticuerpo de cadena sencilla ("SCA") es un anticuerpo genéticamente modificado o enzimáticamente digerido que contiene la región variable de una cadena ligera V_L y la región variable de una cadena pesada, opcionalmente unidas por un conector flexible, tal como una secuencia de polipéptidos, en la orientación V_L-conector-V_H o en la orientación V_H-conector-V_L. O bien, puede producirse un fragmento de Fv de la cadena sencilla uniendo dos dominios variables por medio de un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína. Se describen métodos para producir anticuerpos de scFv, por ejemplo, en Whitlow *et al.*, (1991) En: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **2**:97; patente de EE.UU. Nº. 4.946.778; y Pack *et al.*, (1993) *Bio/Technology* **11**:1271.

También se pueden usar otros métodos para producir subsecuencias de anticuerpo, como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligeras y pesadas monovalentes, división adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, a condición de que las subsecuencias se unan al antígeno al cual el anticuerpo intacto se une.

Según se usa en este documento, el término "unir" o "unión" significa que las composiciones se refieren a que tienen afinidad entre sí. La "unión específica" consiste en una unión selectiva entre dos moléculas. Un ejemplo particular de la unión específica es la que aparece entre un anticuerpo y un antígeno. Típicamente, la unión específica puede distinguirse de la no específica cuando la constante de disociación (K_D) es de menos de aproximadamente 1 X 10⁻⁵ M o menos de aproximadamente 1 X 10⁻⁶ M o 1 X 10⁻⁷ M. La unión específica puede ser detectada, por ejemplo, por ELISA, inmunoprecipitación, coprecipitación, con o sin reticulación química, ensayos de dos híbridos y otros similares. Se pueden usar controles apropiados para distinguir entre la unión "específica" y la "no específica".

Los anticuerpos de la invención, incluyendo los anticuerpos de longitud completa, subsecuencias (p.ej., formas de cadena sencillas) se pueden presentar como dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros o cualquier otro oligómero de orden más alto que retiene al menos una parte de la actividad de unión del antígeno del monómero. Los multímeros pueden comprender combinaciones heteroméricas u homoméricas del anticuerpo de longitud completa,

subsecuencias, no modificadas o modificadas como se muestra en este documento y se conoce en la técnica. Los multímeros de anticuerpo son útiles para aumentar la avidéz del antígeno en comparación con el monómero debido a que el multímero tiene múltiples sitios de unión del antígeno. Los multímeros del anticuerpo también son útiles para producir combinaciones oligoméricas (p.ej., dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.) de diferentes anticuerpos que así producen composiciones de anticuerpos que son multifuncionales (p.ej., bifuncionales, trifuncionales, tetrafuncionales, etc.).

El término "multifuncional" significa que la composición referida tiene dos o más actividades o funciones (p.ej., unión de antígeno, actividad enzimática, unión de ligando o receptor, toxina, etc.). Por ejemplo, un anticuerpo que se une a un antígeno particular que tiene también un polipéptido adjunto con actividad enzimática (p.ej., luciferasa, acetiltransferasa, galactosidasa, peroxidasa, etc.) es un ejemplo particular de un anticuerpo multifuncional.

Los anticuerpos multifuncionales incluyen además formas multiespecíficas (p.ej., biespecíficas, triespecíficas, tetraespecíficas, etc.). El término "multiespecífico" significa un anticuerpo que se une a dos o más epítomos antigénicos diferentes. El término "multiespecífico" significa que el anticuerpo contiene dos o más secuencias de región variable que se unen a epítomos diferentes. Diferentes epítomos pueden estar presente en el mismo antígeno o en antígenos diferentes. Por ejemplo, un oligómero de anticuerpo multiespecífico comprende una mezcla de dos o más anticuerpos teniendo cada uno especificidad de unión de epítomo diferente y que forman un multímero. Los anticuerpos multiespecíficos pueden consistir en polipéptidos de unión del antígeno individual cada uno de los cuales tienen distintos dominios variables. Por ejemplo, uno de los anticuerpos puede tener dos dominios variables cada uno de los cuales reconoce un epítomo diferente.

El candidato funciona para anticuerpos multifuncionales distintos de la unión del antígeno y además de la actividad enzimática incluye, por ejemplo, restos detectables, tales como radioisótopos y secuencias de aminoácidos (p.ej., 35, 131I, T7, inmunoglobulina o marcadores de polihistidina, toxinas (p.ej., ricina, cólera, tosferina), proteínas de la superficie celular, tales como receptores, ligandos (sustratos, agonistas y antagonistas), proteínas de adhesión (p.ej., estreptavidina, avidina, lectinas), factores de crecimiento, factores diferenciativos y factores quimiotácticos.

Los anticuerpos humanizados multifuncionales se pueden producir por reticulación química de las moléculas seleccionadas (que han sido producidas por medios sintéticos o según la expresión de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos) o por tecnología de ADN recombinante combinada con la expresión celular del polipéptido *in vitro* y la oligomerización subsecuente. Los anticuerpos multiespecíficos pueden producirse, de manera similar, por tecnología recombinante y expresión, fusión de hibridomas que producen anticuerpos con diferentes especificidades epitópicas, o expresión de ácido nucleico múltiple que codifica cadenas variables del anticuerpo con especificidades epitópicas diferentes en una célula sola.

Los anticuerpos pueden unirse directamente o indirectamente por unión covalente o no covalente, p. ej., por medio de un dominio de multimerización, para producir multímeros. Un "dominio de multimerización" media interacciones de proteína-proteína no covalentes. Los ejemplos específicos incluyen secuencias de proteína en doble espiral (p.ej., estructuras de cremallera de leucina) y alfa-helicoidales. También se contemplan secuencias que median la unión proteína-proteína por medio de fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno u uniones de carga-carga como dominios de multimerización. Otros ejemplos incluyen dominios hélice-básica-hélice-bucle y otras secuencias de proteína que median interacciones de proteína-proteína heteroméricas u homoméricas entre las proteínas de unión del ácido nucleico (p.ej., factores de transcripción de unión del ADN, tal como TAF). Un ejemplo específico de un dominio de multimerización es los residuos de 319 a 360 de p53 que median la formación de tetrámero. Otro ejemplo es el factor de plaqueta humano 4, que se autoensambla en tetrámeros. Otro ejemplo es la proteína extracelular TSP4, un miembro de la familia de tromboespondina, que puede formar pentámeros. Otros ejemplos específicos son las cremalleras de leucina de jun, fos, y la proteína de levadura GCN4.

Los anticuerpos humanizados se pueden unir directamente entre sí por medio de un agente de reticulación químico o puede unirse por medio de una secuencia de conector (p.ej., una secuencia de péptido) para formar multímeros. Según se usa en este documento, "conector" o "espaciador" se refiere a una molécula o grupo de moléculas que se une a dos o más moléculas entre sí. Un conector flexible permite la rotación de las dos moléculas unidas entre sí hasta el punto de que las moléculas no bloqueen cada una la función de la otra. Por ejemplo, un conector, tal como una secuencia de aminoácidos unida a un anticuerpo humanizado que se une a un dominio de multimerización, permite que el anticuerpo se una al antígeno sin una interferencia estérica significativa de los multímeros del oligómero. Los conectores no peptídicos incluyen reactivos de reticulación químicos y polietilenglicol.

Un ejemplo específico de un conector de péptido es una secuencia bisagra de inmunoglobulina. Otros ejemplos específicos son polilisina, ácido polil glutámico y las mezclas de secuencias de aminoácidos aleatorias. Las secuencias de aminoácidos del conector pueden ser secuencias de aminoácidos totalmente humanas, humanizadas o no humanas, no modificadas o modificadas como se muestran en este documento. La invención, por lo tanto, proporciona además anticuerpos humanizados que incluyen una secuencia conectora. Las secuencias conectoras incluyen, por ejemplo, secuencias de aproximadamente 2 a 10, 10 a 20, 10 a 30, 25 a 50, 30 a 60 y 50 a 75 aminoácidos de longitud.

Los anticuerpos también incluyen formas modificadas, tales como secuencias que tienen una o varias sustituciones de aminoácidos, adiciones o eliminaciones, a condición de que la modificación no destruya la función, p.ej., no destruyan la

actividad de unión del antígeno; el anticuerpo retenga, al menos en parte, la actividad de unión del antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado modificado retendrá, al menos en parte, la afinidad con el antígeno al cual el anticuerpo no modificado se une. El término "modificación" denota, por lo tanto, una modificación de una molécula que no destruye la actividad de la molécula modificada.

5 Las modificaciones incluyen por lo tanto, por ejemplo, adiciones de aminoácido, inserciones, eliminaciones y sustituciones. Un ejemplo de una adición es aquella en la que uno o varios aminoácidos son añadidos al final del extremo N- o C-terminal de un anticuerpo humanizado. Un ejemplo de una inserción es aquel en el que un aminoácido es insertado en la secuencia. Un ejemplo de una delección es aquel en el que uno o varios aminoácidos son suprimidos del extremo N-terminal, o internamente dentro de la secuencia.

10 Por lo tanto, la invención también proporciona formas modificadas de los anticuerpos humanizados, incluyendo uno o varios, es decir, hasta 10, sustituciones conservadoras de aminoácido. En una realización, un anticuerpo humanizado tiene una o varias sustituciones de aminoácido de una secuencia expuesta en SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO: 18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40); a condición de que el anticuerpo sustituido sea capaz de unirse al antígeno. En un aspecto particular, una o varias de las sustituciones de aminoácido son sustituciones de aminoácido conservadoras. En otro aspecto, la sustitución comprende 1-3, 3-5 o 5-10 aminoácidos. En otro aspecto más, la sustitución es con un aminoácido humano. En todavía otro aspecto, la sustitución es con un aminoácido no humano que es estructuralmente similar al residuo no humano, por ejemplo, cuando un aminoácido de zona vernier no humano del aceptador de marco (p.ej., aceptador murino) es estructuralmente distinto para el equivalente humano del aminoácido de zona vernier.

25 Las sustituciones de aminoácido ejemplares incluyen sustituciones de aminoácidos conservadoras. La expresión "sustitución conservadora" significa el reemplazo de un aminoácido por un residuo biológicamente o químicamente o estructuralmente similar. Biológicamente similar significa que la sustitución es compatible con la actividad biológica, p.ej., para un anticuerpo humanizado, unión de antígeno. Estructuralmente similar significa que los aminoácidos tienen cadenas laterales con una longitud similar, como alanina, glicina y serina, o tienen un tamaño similar. Las semejanzas químicas significan que los residuos tienen la misma carga o son ambos hidrófilos o hidrófobos. Los ejemplos particulares de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina con otro, o la sustitución de un residuo polar con otro, como la sustitución de arginina con lisina, ácido glutámico con aspártico, o glutamina con asparagina, serina con treonina y otros similares.

30 Las modificaciones también incluyen secuencias derivatizadas, por ejemplo, aminoácidos en los cuales los grupos amino libres forman hidroclouros de amina, grupos p-toluen-sulfonilo, grupos carbobenzoxi; grupos carboxi libres de sales, ésteres metílicos y etílicos; grupos hidroxilo libres que forman O-acilo o derivados O-alquilo, así como derivados de aminoácido naturales, por ejemplo, 4-hidroxiprolina, para la prolina, 5-hidroxilisina para lisina, homoserina para serina, ornitina para lisina, etc. También se incluyen modificaciones que confieren la unión covalente, por ejemplo, un enlace disulfuro entre dos residuos cisteína que producen así un polipéptido cíclico. Se pueden producir modificaciones usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica (p.ej., PCR basada en mutagénesis dirigida, delección e inserción, modificación química y mutagenesis, reticulación, etc.).

40 Las modificaciones también incluyen la adición de entidades funcionales, tales como marcadores (p.ej., polihistidina, T7, inmunoglobulina, etc.), partículas de oro, covalentemente o no covalentemente unidas a los anticuerpos humanizados o subsecuencias o multímeros. Por lo tanto, la invención proporciona anticuerpos humanizados modificados que tienen una o varias actividades (p.ej., retiene al menos parte de la actividad de unión del antígeno) del anticuerpo parenteral no modificado. Las modificaciones incluyen marcadores detectables radiactivos o bien no radiactivos unidas o incorporadas en la molécula.

45 El término "idéntico" o "identidad" significa que dos o más entidades referidas son las mismas. Por lo tanto, cuando dos secuencias de ácidos nucleicos son idénticas, tienen la misma secuencia. Las "áreas de identidad" significan que una parte de dos o más entidades referidas son iguales. Por lo tanto, cuando dos secuencias de ácidos nucleicos son idénticas sobre una o varias partes de su secuencia, éstas comparten identidad en estas áreas. La expresión "identificación sustancial" significa que la identidad es estructuralmente o funcionalmente significativa. Es decir, la identidad es tal que las moléculas son estructuralmente idénticas o realizan la misma función (p.ej., función biológica) aunque las moléculas sean diferentes. Debido a la variación en la cantidad de la conservación de la secuencia entre proteínas estructuralmente y funcionalmente relacionadas, la cantidad de identidad de secuencia para la identidad sustancial dependerá del tipo de región/dominio y su función. Para secuencias de ácidos nucleicos, una homología de secuencia del 50 % y por encima puede constituir una homología sustancial. La homología sustancial para proteínas puede ser sustancialmente menor, por ejemplo, tan poco como la homología de la secuencia del 30 %, pero típicamente es más, p.ej. 50 %, 60 %, 75 %, 85 % o más.

60 El grado de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando varios programas informáticos y algoritmos matemáticos conocidos en la técnica. Tales algoritmos que calculan la identidad de secuencia en tanto por ciento (homología) generalmente explican los huecos de secuencia y las faltas de emparejamiento respecto a la región de comparación. Por ejemplo, un algoritmo de búsqueda BLAST (p.ej., BLAST 2.0) (véase, p.ej., Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* **215**:403-10, públicamente disponible en el NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) tiene parámetros de

búsqueda ejemplares como sigue: Falta de complementariedad -2; hueco abierto 5; extensión de hueco 2. Para comparaciones de secuencias de polipéptido, un algoritmo BLASTP se usa típicamente en combinación con una matriz de tanteo, como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 y otras similares.

5 Según se usa en este documento, el término "aislado", cuando se usa como un modificador de las composiciones de la invención (p.ej., los anticuerpos, subsecuencias, formas modificadas, multímeros, ácidos nucleicos que codifican el mismo, células, vectores, etc.) significa que se hacen las composiciones artificialmente y que se separan de su ambiente en el que aparecen naturalmente *in vivo*. Generalmente, las composiciones así separadas están sustancialmente sin alguno o ninguno de los materiales con los cuales se asocian normalmente en la naturaleza, por ejemplo, una o varias proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, membranas celulares. Un anticuerpo "aislado" también puede ser "sustancialmente puro" cuando se encuentra sin uno o todos los materiales con los cuales pueden asociarse normalmente en la naturaleza. Por lo tanto, una molécula aislada que también es sustancialmente pura no incluye polipéptidos o no presenta polinucleótidos entre millones de otras secuencias, tales como anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos o ácidos nucleicos en una biblioteca genómica o de cDNA, por ejemplo. La pureza puede ser de al menos aproximadamente el 60 % o más por masa. La pureza también puede ser de aproximadamente el 70 % o el 80 % o más, y puede ser mayor, por ejemplo, del 90 % o más. La pureza puede ser determinada por cualquier método apropiado, incluyendo, por ejemplo, espectroscopia de UV, cromatografía (p.ej., HPLC, en fase gaseosa), electroforesis de gel (p.ej., tinción con plata o azul de coomassie) y análisis de secuencia (ácido nucleico y péptido).

20 Además, se describen métodos para producir anticuerpos humanizados. En una realización, un método incluye: seleccionar una secuencia marco humana como aceptador, en donde dicha secuencia tiene el 50 % o más identidad (p.ej., 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, o más identidad) a una región marco del anticuerpo del donador no humana; injertar una CDR desde el anticuerpo no humano del donador (p.ej., murino) en el marco humano; comparar los residuos de zona de vernier del aceptador humano y las regiones marco del donador no humanas; y mantener uno o varios de los residuos del aceptador humanos en la zona de vernier cuando los residuos del donador no humanos y humanos sean estructuralmente o químicamente similares, o sustituir uno o varios de los residuos de la zona de vernier con un residuo que es diferente tanto del residuo de la zona vernier no humano del donador como del residuo humano del aceptador de la zona vernier si el residuo de la zona vernier no humano del donador es estructuralmente o químicamente distinto al residuo humano, en donde el residuo diferente es estructuralmente o químicamente similar al residuo de la zona vernier no humana del donador. En otras palabras, si el residuo de la zona vernier no humano del donador es estructuralmente o químicamente distinto al residuo de la zona vernier humano del aceptador, entonces este residuo de la zona vernier se modifica en un residuo que es diferente tanto del residuo de la zona vernier no humano del donador como del residuo de la zona vernier humano del aceptador, aún estructuralmente o químicamente similar al residuo de la zona vernier no humano del donador. En otras realizaciones, las secuencias marco humanas del aceptador se seleccionan de las secuencias consenso, por ejemplo, del subgrupo I y subgrupo II de secuencias consenso del dominio V_H.

35 La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos humanizados de la invención, incluyendo los anticuerpos humanizados de afinidad alta, subsecuencias, formas modificadas y sus multímeros. Un ácido nucleico codifica un polipéptido expuesto en SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF), SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40).

45 Según se usa en este documento, un "ácido nucleico" se refiere a al menos dos o más pares de bases de ácidos ribo- o desoxi-ribonucleico que se unen por un enlace fosfoéster o equivalentes. Los ácidos nucleicos incluyen polinucleótidos y polinucleósidos. Los ácidos nucleicos incluyen moléculas simples, dobles o triples, circulares o lineales. Una molécula de ácido nucleico puede pertenecer exclusivamente o estar en mezcla de cualquier grupo de moléculas que contienen nucleótidos, como se ilustra, pero sin limitación, con los grupos siguientes de moléculas de ácidos nucleicos: ARN, ADN, cDNA, ácidos nucleicos genómicos, ácidos no nucleicos genómicos, ácidos nucleicos naturales y no naturales y ácidos nucleicos sintéticos. Esto incluye, como ejemplo, ácidos nucleicos asociados con cualquier órgano, tales como mitocondrias, ARN ribosómico y moléculas de ácidos nucleicos comprendidas quiméricamente de uno o varios componentes no naturales junto con componentes naturales.

50 Además, una "molécula de ácido nucleico" puede contener en parte uno o varios componentes no nucleósidos como se ilustra, pero sin limitación, con aminoácidos y azúcares. Por lo tanto, como ejemplo, pero sin limitación, un ribozima que es en parte nucleotídico y que en parte es proteico se considera una "molécula de ácido nucleico."

55 Los ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud. Las longitudes de los ácidos nucleicos típicamente están en el intervalo de aproximadamente 20 a 10 Kb, 10 a 5 kilobyte, 1 a 5 Kb o menos, de 1000 a aproximadamente 500 pares de bases o menos de longitud. Los ácidos nucleicos también pueden ser más cortos, por ejemplo, de 100 a aproximadamente 500 pares de bases, o de aproximadamente 12 a 25, de 25 a 50, de 50 a 100, de 100 a 250, o aproximadamente de 250 a 500 pares de bases de longitud.

60 A consecuencia de la degeneración del código genético, los ácidos nucleicos incluyen secuencias y subsecuencias degeneradas con respecto a ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO: 6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID

NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40), y sus subsecuencias. Los ácidos nucleicos también incluyen secuencias complementarias en una secuencia que codifica SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40), y sus subsecuencias. Las subsecuencias de ácidos nucleicos tienen de aproximadamente 15 a 25, de 25 a 50 o de 50 a 100 nucleótidos. Tales ácidos nucleicos son útiles para la hibridación para detectar la presencia o una cantidad del anticuerpo humanizado en una muestra (*in vitro*, célula, medio de cultivo, tejido u órgano, suero, en un sujeto, etc.).

Se describe que los ácidos nucleicos se hibridan con rigurosidad alta a ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40), sus subsecuencias y secuencias de ácidos nucleicos complementarias a éstas. La hibridación de ácidos nucleicos también es útil para detectar la presencia o una cantidad del anticuerpo humanizado en una muestra.

El término "hibridar" se refiere a la unión entre ácidos nucleicos complementarios. Las secuencias tendrán generalmente más de una homología aproximadamente del 50 % respecto a un ácido nucleico que codifica SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40). La región entre las secuencias relacionadas puede estar en el intervalo de al menos aproximadamente 30 pares de bases, o aproximadamente 50 pares de bases, o aproximadamente de 100 a 200 o más residuos.

Como se sobrentiende por los expertos en la técnica, la T_M (temperatura de fusión) se refiere a la temperatura a la cual la unión entre secuencias complementarias ya no es estable. Para dos secuencias que se unen, la temperatura de una reacción de hibridación debe ser menos que la T_M calculada para las secuencias. La T_M está bajo la influencia de la cantidad de complementariedad de la secuencia, longitud, la composición (%GC), tipo de ácido nucleico (ARN contra ADN), y la cantidad de sal, detergente y otros componentes en la reacción (p.ej., formamida). Todos estos factores se consideran en el establecimiento de las condiciones de hibridación apropiadas (véase, p.ej., las técnicas hibridación y fórmula para calcular la T_M descrita en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Típicamente, las condiciones de lavado se ajustan para alcanzar el grado deseado de rigurosidad de la hibridación. Por lo tanto, la rigurosidad de la hibridación puede ser determinada empíricamente, por ejemplo, en condiciones de lavado particulares, p.ej., en condiciones de rigurosidad baja o condiciones de rigurosidad alta. Las condiciones óptimas para la hibridación selectiva variarán según la reacción de hibridación particular implicada. Un ejemplo de unas condiciones de hibridación de rigurosidad alta es como sigue: 2X SSC/0,1 % SDS a aproximadamente 37°C o 42°C (condiciones de hibridación); 0,5X SSC/0,1 % SDS a aproximadamente la temperatura ambiente (lavado de rigurosidad baja); 0,5X SSC/0,1 % SDS a aproximadamente 42°C (lavado de rigurosidad moderada); y 0,1 X SSC/0,1 % SDS a aproximadamente 65°C (lavado de rigurosidad alta).

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser producidos usando varias técnicas de clonación estándar y síntesis química. Tales técnicas incluyen, pero no sin limitación, con: 1) amplificación de ácido nucleico, p.ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con ADN genómico u objetivos de cDNA usando cebadores (p.ej., una mezcla de cebadores degenerada) capaz de hibridarse a una secuencia del anticuerpo; 2) la síntesis química de secuencias de ácidos nucleicos que pueden ser clonadas después en un plásmido, propagadas, amplificadas y purificadas y; 3) búsquedas de bases de datos informáticas para las secuencias relacionadas. La pureza de los ácidos nucleicos puede ser determinada por secuenciación, electroforesis de gel y otros similares.

Se describen casetes de expresión que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado operativamente unido a un elemento del control de la expresión. Según se usa en este documento, la expresión "operativamente unido" se refiere a una relación física o funcional entre los elementos referidos al que le permite funcionar en su forma pretendida. Por lo tanto, un elemento del control de la expresión "operativamente unido" a un ácido nucleico significa que el elemento de control modula la transcripción y cuando es apropiado, la traducción de la transcripción.

No tiene que haber enlace físico al ácido nucleico a fin de controlar la expresión. Por lo tanto, no se requiere enlace físico para que los elementos se unan operativamente. Por ejemplo, puede unirse un elemento mínimo a un ácido nucleico que codifique un anticuerpo humanizado. Un segundo elemento que controla la expresión de un ácido nucleico operativamente unido que codifica una proteína que funciona "en trans" que se une al elemento mínimo puede influir en la expresión del anticuerpo humanizado. Como el segundo elemento regula la expresión del anticuerpo humanizado, el segundo elemento está operativamente unido al ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado.

La expresión "elemento de control de la expresión" se refiere al ácido nucleico que influye en la expresión de un ácido nucleico operativamente unido. Los promotores y potenciadores son ejemplos no limitantes particulares de elementos del control de la expresión. Una "secuencia promotora" es una región reguladora del ADN capaz de iniciar la transcripción de una secuencia de codificación corriente abajo (dirección 3'). La secuencia promotora incluye un número mínimo de bases necesarias para iniciar la transcripción. Los potenciadores también regulan la expresión de genes, pero pueden funcionar a una distancia del sitio de inicio de la transcripción del gen al cual están operativamente unidos.

Los potenciadores también funcionan en los extremos 5' o 3' del gen, así como dentro del gen (p.ej., en intrones o secuencias de codificación).

Un elemento de control de la expresión puede conferir la expresión en una manera que sea "constitutiva", tal que la transcripción del ácido nucleico operativamente unido ocurre sin la presencia de una señal o estímulos. Los elementos del control de la expresión pueden conferir la expresión en una manera que sea "regulable", es decir una señal o los estímulos aumentan o disminuyen la expresión del ácido nucleico operativamente unido. Un elemento regulable que aumenta la expresión del ácido nucleico operativamente unido en respuesta a una señal o estímulos también se denomina "elemento inducible". Un elemento regulable que disminuye la expresión del ácido nucleico operativamente unido en respuesta a una señal o estímulos se denomina "elemento represible" (es decir, la expresión de disminuciones de señal tal que cuando la señal, es eliminada o está ausente, la expresión aumenta).

Los elementos del control de la expresión incluyen elementos activos en un tejido particular o tipo de célula, denominados en este documento "elementos del control de la expresión específicos de tejido". Los elementos del control de la expresión específicos de tejido son típicamente activos en células o tejido específicos porque son reconocidos por proteínas activadoras transcripcionales, u otros reguladores de la transcripción, que son únicos para cada célula específica o tipo de tejido.

Los elementos del control de la expresión incluyen además elementos que confieren expresión en una etapa particular del ciclo celular o de la diferenciación. En consecuencia, la invención incluye además elementos del control de la expresión que confieren una expresión constitutiva, regulable, específica de tejido, específicos del ciclo celular y específicos de la etapa de diferenciación.

Los elementos del control de la expresión incluyen secuencias de ácidos nucleicos de cadena entera, tales como promotor naturales y elementos potenciadores, así como subsecuencias o sus variantes de nucleótido (p.ej., formas sustituidas/mutadas u otras que se diferencian de las secuencias naturales) que se retienen a todo o parte de la función del elemento de control de la cadena entera o no variante (confieren regulación, p.ej., retienen alguna cantidad de capacidad de inducción en respuesta a una señal o estímulos).

Para los sistemas bacterianos, se pueden usar promotores constitutivos, tales como T7 y otros similares, así como los promotores inducibles, como el pL de bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac). En sistemas de células de insecto, se pueden usar promotores constitutivos o inducibles (p.ej., ecdisona). En la levadura, se pueden usar promotores constitutivos o inducibles (véase, p.ej., Ausubel *et al.*, en: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Cap. 13, editor, Greene Publish. Assoc.&Wiley Interscience, 1988; Grant *et al.*, (1987) en: *Methods in Enzymology*, 153:516-544, editores Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, Nueva York; Glover, *DNA Cloning*, volumen. II, Cap. 3, IRL Press, Wash., D.C., 1986; Bitter (1987) en: *Methods in Enzymology*, 152:673-684, editores Berger & Kimmel, Acad. Press, Nueva York; y Strathern *et al.*, *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (1982) editores Cold Spring Harbor, Vols. I y II). Puede usarse un promotor de levadura constitutivo, tal como el ADH o LEU2 o un promotor inducible, como el GAL (R. Rothstein en: *DNA Cloning, A Practical Approach*, Volumen 11, Cap. 3, editor. D.M. Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986).

Para las células mamíferas, se pueden usar promotores constitutivos de orígenes virales u otros. Por ejemplo, se pueden usar para la expresión SV40, o repeticiones terminales largas virales (LTR) y otros similares, o promotores inducible derivados del genoma de células mamíferas (p.ej., el promotor de metalotioneina IIA; promotor de choque térmico, elementos de respuesta de hormona esteroide/tiroides/ácido retinoico) o de virus de mamíferos (p.ej., el promotor tardío de adenovirus; LTR de virus de tumor mamario de ratón inducible).

La invención también proporciona células mutadas y su progenie en la cual una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado ha sido introducido por medio de técnicas de ADN recombinante *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Las células mutadas pueden ser propagadas y el ácido nucleico introducido puede ser transcrito, o expresarse en la proteína codificada. Se cree que una célula de progenie puede no ser idéntica a la célula parenteral, ya que puede haber mutaciones que aparezcan durante la replicación. Las células mutadas incluyen, pero sin limitación, células procarióticas y eucarióticas, tales como bacterias, hongos, células de planta, insecto, y animal (p.ej., mamífero, incluyendo seres humanos). Las células pueden estar presentes en el cultivo, en una célula, tejido u órgano *ex vivo* o presente en un sujeto.

El término "mutado" significa un cambio genético de una célula después de la incorporación del ácido nucleico (p.ej., un transgen) exógeno a la célula. Por lo tanto, una "célula mutada" es una célula en la cual, o una progenie de la cual, se ha introducido una molécula ácido nucleico por medio de técnicas de ADN recombinante. La transformación celular para producir células huésped se puede realizar como se describe en este documento o usando técnicas conocidas en la técnica. En consecuencia, también se proporcionan métodos para producir células que contienen ácidos nucleicos y células que expresan los anticuerpos humanizados de la invención.

Típicamente, la transformación celular emplea un vector. El término "vector", se refiere, p.ej., a un plásmido, virus, tal como un vector viral, u otro vehículo conocido en la técnica que se puede manipular por inserción o incorporación de un ácido nucleico, para la manipulación genética (es decir, "vectores de clonación"), o se puede usar para transcribir o traducir polinucleótidos insertados (es decir, "vectores de expresión"). Dichos vectores son útiles para introducir ácidos

nucleicos, incluyendo un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado operativamente unido con un elemento del control de la expresión, y expresión de la proteína codificada *in vitro* (p.ej., en disolución o en fase sólida), en células o *in vivo*.

5 Un vector generalmente contiene al menos un origen de replicación para su propagación en una célula. Los elementos de control, incluyendo los elementos del control de la expresión que se muestran en este documento, presentes dentro de un vector, son incluidos para facilitar la transcripción y la traducción. La expresión "elemento de control de la expresión" se pretende que incluya, como mínimo, uno o varios componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y puede incluir otros componentes u otros promotores o potenciadores, por ejemplo, secuencias líder y secuencias modelo de fusión, elementos de sitios de unión de ribosoma interno (IRA) para la creación de multigenes, o policistrónicos, mensajes, señal de empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción en marco del mRNA, señal de poliadenilación para proporcionar la poliadenilación apropiada de la transcripción de un gen de interés, parar codones, etc.

15 Los vectores pueden incluir un marcador de selección. Como es conocido en la técnica, "marcador de selección" significa un gen que tiene en cuenta la selección de células que contienen el gen. La "selección positiva" se refiere a un proceso por el cual sólo las células que contienen el marcador de selección sobrevivirán bajo la exposición a la selección positiva. La resistencia a fármacos es un ejemplo de un marcador de selección positivo; las células que contienen el marcador sobrevivirán en el medio de cultivo que contiene el fármaco de selección, y las células que no contienen el marcador morirán. Tales marcadores incluyen genes de resistencia a fármacos tales como *neo*, que confiere resistencia frente a G418, *hygr*, que confiere resistencia frente a higromicina, o *puro* que confiere resistencia frente a puomicina, entre otros. Otros genes del marcador de selección positivos incluyen genes que permiten la identificación o la proyección de células que contienen el marcador. Estos genes incluyen genes para proteínas fluorescentes (GFP), el gene lacZ, el gen de la fosfatasa alcalina y marcadores superficiales, tales como el CD8, entre otros.

25 Los vectores pueden contener marcadores de selección negativos. La "selección negativa" se refiere a un proceso mediante el cual las células que contienen un marcador de selección negativo son eliminadas bajo la exposición a un agente de selección negativo apropiado. Por ejemplo, las células que contienen el gen del virus del herpes simple-timidina cinasa (HSV-tk) (Wigler *et al.*, *Cell* **11**:223 (1977)) son sensibles al fármaco ganciclovir (GANC). Del mismo modo, el gen gpt da células sensibles a 6-tioxantina.

30 Se pueden usar otros sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, el gen de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**:2026 (1962)), y los genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* **22**:817 (1980)). Se han descrito otros genes seleccionables, a saber trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:8047 (1988)); y ODC (ornitina descarboxilasa), que confiere resistencia frente al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue (1987) en: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, ed.).

40 Los vectores incluidos son aquellos basados en vectores virales, tales como retrovirales, virus adeno-asociados, adenovirus, reovirus, lentivirus, genomas de rotavirus, virus símico 40 (SV40) o virus del papiloma bovino, etc., modificados para introducir y expresar un ácido nucleico en una célula (Cone *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6349 (1984)). (*Eukaryotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982; Sarver *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **1**:486 (1981)). Otros vectores virales útiles para la expresión incluyen parvovirus, rotavirus, virus de Norwalk, coronavirus, paramixo y rabdovirus, togavirus (p.ej., virus sindbis y virus forestal semliki) y virus de la estomatitis vesicular.

45 Los sistemas de expresión de mamíferos incluyen además vectores específicamente diseñados para la expresión *in vivo* y *ex vivo*. Dichos sistemas incluyen vectores del virus adeno-asociado (AAV) (patente de EE.UU. Nº. 5.604.090). Se ha demostrado anteriormente que los vectores de AAV proporcionan la expresión del Factor IX en seres humanos y en ratones a niveles suficientes para suponer una ventaja terapéutica (Kay *et al.*, *Nat. Genet.* **24**:257 (2000); Nakai *et al.*, *Blood* **91**:4600 (1998)). Los vectores adenovirales (patentes de EE.UU. Nº. 5.700.470, 5.731.172 y 5.928.944), vectores del virus del herpes simple (patente de EE.UU. Nº. 5.501.979) y vectores retrovirales (p.ej., vectores lentivirus son útiles para infectar la división así como la no división de células y virus espumoso) (patentes de EE.UU. Nº. 5.624.820, 5.693.508, 5.665.577, 6.013.516 y 5.674.703 y publicaciones WIPO WO92/05266 y WO92/14829) y vectores del virus de papiloma (p.ej. el virus del papiloma humano y bovino) han sido todos empleados en terapia de genes (patente de EE.UU. Nº. 5.719.054). Los vectores también incluyen vectores basados en citomegalovirus (CMV) (patente de EE.UU. Nº. 5.561.063). Se han desarrollado vectores que proporcionan eficazmente genes a células del tracto gastrointestinal y también se pueden usar (véase, p.ej., patentes de EE.UU. Nº. 5.821.235, 5.786.340 y 6.110.456).

55 En levaduras, se conocen en la técnica vectores que facilitan la integración de las secuencias de ácidos nucleicos ajenos en un cromosoma, por medio de recombinación homóloga, por ejemplo, y se pueden usar. Los cromosomas artificiales de levadura (YAC) se usan típicamente cuando los ácidos nucleicos insertados son demasiado grandes para los vectores más convencionales (p.ej., mayores que aproximadamente 12 Kb).

También se puede realizar la inserción del ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado y el anticuerpo humanizado en células diana por métodos convencionales conocidos en la técnica, tal como el choque osmótico (p.ej., fosfato de calcio), electroporación, microinyección, fusión de célula, etc. La inserción del ácido nucleico y el polipéptido *in vitro*, *ex vivo* y *in vivo* también se puede llevar a cabo usando otras técnicas. Por ejemplo, una sustancia polimérica, tales como poliésteres, ácidos de poliamina, hidrogel, polivinilpirrolidona, etilen-vinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina o copolímeros de lactida/glicolida, copolímeros de polilactida/glicólida o copolímeros de etilvinilacetato. Un ácido nucleico se puede atrapar en microcápsulas preparadas por técnicas coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, por el uso de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, o microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, o en un sistema de administración de fármacos coloides. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromolécula, nano-cápsulas, microesferas, perlas y sistemas lipídicos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, mezclas micelares y liposomas.

El uso de liposomas para introducir las diversas composiciones en células, incluyendo ácidos nucleicos, es conocido por los expertos en la técnica (véase, p.ej., las patentes de EE.UU. N.º. 4.844.904, 5.000.959, 4.863.740, y 4.975.282). Un vehículo que comprende un polímero natural, o un derivado o un hidrolizado de un polímero natural, descrito en el documento WO 94/20078 y la patente de EE.UU. N.º. 6.096.291, es conveniente para la administración por las mucosas de moléculas, tales como polipéptidos y polinucleótidos. También se conocen tensioactivos basados en lípidos catiónicos de piperazina útiles para la terapia génica (véase, p.ej., patente de EE.UU. N.º. 5.861.397). También son conocidos sistemas lipídicos catiónicos (véase, p.ej., la patente de EE.UU. N.º 5.459.127). En consecuencia, se incluyen medios de administración de vectores virales y no virales en células o tejidos, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

Se describen kits que comprenden una o varias composiciones de la invención, incluyendo formulaciones farmacéuticas, envasadas en un material de envase adecuado. El kit puede incluir un anticuerpo humanizado o subsecuencia. En otra realización, el kit puede incluir un ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado o la subsecuencia. Además, el kit puede incluir ácidos nucleicos que incluyen además un elemento del control de la expresión; un vector de expresión; un vector de expresión viral; un vector de expresión de virus adeno-asociado; un vector de expresión adenoviral; y un vector de expresión retroviral. Además, el kit puede incluir una célula que expresa un anticuerpo humanizado o subsecuencia.

Además, el kit puede incluir un prospecto de la etiqueta o envase que incluya instrucciones para expresar un anticuerpo humanizado o un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado en células *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*. Además, el kit puede incluir un prospecto de la etiqueta o envase que incluya instrucciones para tratar un sujeto (p.ej., un sujeto que padece o está en peligro de padecer asma) con un anticuerpo humanizado o un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado *in vivo* o *ex vivo*.

Según se usa en este documento, la expresión "material de envase" se refiere a una estructura física que aloja a los componentes del kit. El material de envase puede mantener los componentes estériles y se puede hacer con un material comúnmente usado para tales fines (p.ej., fibra de papel, cartón, vidrio, plástico, hojas, ampollas, etc.). El prospecto de la etiqueta o envase puede incluir instrucciones escritas apropiadas, por ejemplo, la puesta en práctica de un método de la invención, p.ej., el tratamiento del resfriado común. Los kits de la invención, por lo tanto, pueden incluir además instrucciones para usar los componentes del kit en un método de la invención.

Las instrucciones pueden incluir instrucciones para poner en práctica cualquiera de los métodos para la invención descrita en este documento. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden incluir en un recipiente, paquete, o dosificador junto con instrucciones para la administración a un sujeto. Las instrucciones pueden incluir además indicaciones de un punto final clínico satisfactorio o cualquier síntoma adverso que pueda darse, o información adicional requerida por la *Food and Drug Administration* para su uso en un sujeto humano.

Las instrucciones pueden estar "impresas", p.ej., en papel o cartón dentro del kit, en un etiqueta adjuntada al kit o material de envase, o unidas a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las instrucciones pueden comprender registros de voz o videocinta y además pueden estar incluidas en un medio informático legible, tal como un disco (disquete o disco duro), CD óptico, como CD o DVD-ROM/RAM, cinta magnetofónica, medios de almacenamiento eléctricos, tal como memoria RAM y ROM y los híbridos de éstos, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.

Los kits pueden incluir además un agente tampón, un conservante o un reactivo de estabilización de proteína / ácido nucleico. El kit también puede incluir componentes de control para evaluar la actividad, p.ej., una muestra de control o un estándar. Cada componente del kit se puede confinar dentro de un recipiente individual o en una mezcla y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de paquetes solos o múltiples. Por ejemplo, se puede envasar una composición de la invención en un recipiente de bomba de mano o presurizada (p.ej., aerosol), recipiente para pulverizar la composición en los pasos de la garganta o nasal o seno de un sujeto.

Los anticuerpos humanizados de la invención, incluyendo subsecuencias, formas modificadas, multímeros y ácidos nucleicos que los codifican, se puede incorporar en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones farmacéuticas son útiles para la administración a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*, y para proporcionar la terapia para un desorden fisiológico o condición tratable con un anticuerpo humanizado.

5 Las composiciones farmacéuticas incluyen a vehículos "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables", diluyentes o excipientes. Según se usa en este documento, las expresiones "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), soluciones, emulsiones, medios de dispersión, capas, agentes isotónicos y de absorción que promueven o retardan, compatibles con la administración farmacéutica. Tales formulaciones pueden estar contenidas en un líquido; emulsión, suspensión, jarabe o elixir, o forma sólida; comprimido (revestido o no revestido), cápsula (dura o blanda), polvos, gránulos, cristales o microperlas. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios (p.ej., conservantes, agentes antibacterianos, antivirales y antifungosos).

10 Se pueden formular las composiciones farmacéuticas para que sean compatibles con una ruta local o sistémica particular de la administración. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas incluyen a vehículos, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por rutas particulares.

Los ejemplos no limitantes específicos de rutas de administración para composiciones de la invención son inhalación o administración intranasal. Otras rutas incluyen la administración parenteral, p.ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal.

15 Las soluciones o las suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabens; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como el hidróxido de sodio o el ácido hidroclicórico.

20 Las composiciones farmacéuticas para la inyección incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, Nueva Jersey) o solución salina de fosfato (PBS). El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y otros similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez se puede mantener, por ejemplo, por el uso de una capa, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. Los agentes antibacterianos y antifungosos incluyen, por ejemplo, parabens, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Se pueden incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. Incluso un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina puede prolongar la absorción de las composiciones inyectables.

25 Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los anteriores ingredientes seguido de una esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes como antes. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos para la preparación incluyen, por ejemplo, secado al vacío y liofilación que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de su disolución previamente filtrada del modo estéril.

30 Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que se impregna. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales de bilis y derivados de ácidos fusídicos. La administración transmucosa se puede llevar a cabo por el uso de pulverizaciones nasales, dispositivos de inhalación (p.ej., aspiratorios) o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, bálsamos, geles, o cremas que se conocen generalmente en la técnica.

35 Los anticuerpos humanizados de la invención, incluyendo las subsecuencias y formas modificadas y los ácidos nucleicos que los codifican, pueden prepararse con vehículos que protejan frente a la rápida eliminación en el cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada o un material de retraso, tal como glicerilmonoestearato o glicerilestearato. Las composiciones también se pueden administrar usando implantaciones y sistemas de administración microencapsulados para conseguir la administración sostenida local o sistémica o la liberación controlada.

40 Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno-vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. También se pueden obtener materiales comercialmente del Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas reconocidos para células o tejidos usando anticuerpos o proteínas de cubierta viral) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden estar preparados según los métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.522.811. Otras formulaciones farmacéuticas apropiadas para las composiciones para la administración en los métodos de la invención son conocidas en la técnica (véase, p.ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania; *The Merck Index* (1996) 12ª ed., Merck Publishing

Group, Whitehouse, Nueva Jersey; y *Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms*, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)).

Las formulaciones farmacéuticas pueden ser envasadas en una forma de administración unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La "forma de administración unitaria" según se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que se trate; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado conjuntamente con el vehículo farmacéutico o excipiente.

Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen anticuerpos que protegen contra la infección por virus de células. Por ejemplo, HumA, HumB, HumC, HumD, HumF, HumH y HumI protegen contra la infección por RVH de células (FIG. 4). Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos que protegen por la infección contra rinovirus humano (RVH) de células. En una realización, el anticuerpo tiene una eficacia protectora igual o al menos 2 a 5 veces mayor que el anticuerpo no humanizado. En otra realización, el anticuerpo tiene una eficacia protectora de al menos 5 a 10 veces mayor que el anticuerpo no humanizado. En una otra realización, el anticuerpo tiene una eficacia protectora de al menos 10 a 20 veces mayor que el anticuerpo no humanizado. En todavía otra realización, el anticuerpo tiene una eficacia protectora de al menos 20 a 30 veces mayor que el anticuerpo no humanizado.

Según se usa en este documento, "rinovirus humano" o "RVH" significan los serotipos humanos del grupo principal y menor de rinovirus que han sido identificados (véase, p.ej., Hamparian *et al.*, (1987) *Virology* **159**:191) y aquellos que son identificados después que caen dentro de esta clase de virus. El RVH de grupo principal se une a ICAM-1 y el RVH del grupo menor se une al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL).

Según se usa en este documento, la expresión "eficacia protectora" es la cantidad de un anticuerpo que puede proteger el 50 % de células susceptibles de la infección (es decir, EC_{50}) en condiciones experimentales (véase, p.ej., el Ejemplo 5). Por ejemplo, para RVH, la eficacia protectora en EC_{50} es la cantidad de anticuerpo que protege el 50 % de células hela por la infección por RVH. Por lo tanto, se puede usar un anticuerpo humanizado que tiene una eficacia protectora 5 veces mayor que otro anticuerpo (p.ej., no humanizado) en una cantidad 5 veces menor que el anticuerpo no humanizado proporcionando todavía el mismo grado de protección de la infección.

Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen anticuerpos que se unen a ICAM-1. Sin desear vincularse a ninguna teoría, se cree que la unión del anticuerpo a ICAM-1 inhibe la unión viral o la capacidad de infectar o penetrar la célula que así inhibe la infección o la proliferación viral. Dichos anticuerpos son, por lo tanto, útiles para inhibir patógenos, tales como virus (p.ej., RVH y virus coxackie A, virus respiratorio sincitial (VSR)), bacterias, hongos y protozoos (p.ej., malaria) que se unen a ICAM-1. Por lo tanto, los anticuerpos son útiles para inhibir la infección por RVH así como para inhibir cualquier microorganismo u otros patógenos en los cuales participa el receptor ICAM-1. En consecuencia, la invención proporciona anticuerpos que inhiben la infección patógena de células en las que la infección es mediada, al menos en parte, por unión a ICAM-1. Se describen métodos para inhibir la infección patógena de células en las que es mediada la infección, al menos en parte, por la unión a ICAM-1.

Un método incluye poner en contacto un virus o célula con una cantidad del anticuerpo humanizado que se une a ICAM-1 suficiente para inhibir la infección viral de la célula. En un aspecto, la célula es una célula epitelial. Un método incluye la administración en un sujeto de una cantidad del anticuerpo humanizado que se une a ICAM-1 suficiente para inhibir la infección viral del sujeto. En varios aspectos, el virus es RVH, virus coxackie A y virus respiratorio sincitial. En otra realización más, un método incluye la administración en un sujeto de una cantidad del anticuerpo humanizado que se une a ICAM-1 suficiente para inhibir la infección del sujeto por un patógeno.

Se describen métodos para inhibir la infección, inhibiendo la progresión o tratando una infección patógena de un sujeto. Un método incluye administrar en un sujeto que padece o está en peligro de padecer una infección por RVH una cantidad del anticuerpo humanizado suficiente para inhibir, inhibiendo la progresión o tratando la infección por RVH del sujeto. Un método incluye la administración en un sujeto que padece o está en peligro de padecer un virus coxackie A o una infección de virus sincitial respiratoria una cantidad del anticuerpo humanizado suficiente para inhibir la infección, la progresión de la inhibición o el tratamiento del virus coxackie A o la infección de virus sincitial respiratoria del sujeto. Un método incluye administrar en un sujeto que padece o está en peligro de padecer malaria una cantidad del anticuerpo humanizado suficiente para inhibir, inhibiendo la progresión o tratando la malaria del sujeto. En varios aspectos, un anticuerpo humanizado tiene un dominio V_H y V_L seleccionado de: SEQ ID NO:1 y 3 (HumA); SEQ ID NO:4 y 5 (HumB); SEQ ID NO:6 y 7 (HumC); SEQ ID NO:8 y 9 (HumD); SEQ ID NO:12 y 13 (HumF); SEQ ID NO:16 y 17 (HumH); y SEQ ID NO:18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO:5 y 20 (Hum40), y sus subsecuencias unidas al antígeno.

Se describen métodos para disminuir o inhibir uno o varios síntomas de una infección patógena (p.ej., causada por RVH, virus coxackie A, virus respiratorio sincitial o malaria). Un método incluye administrar a un sujeto que tiene uno o varios síntomas asociados a RVH, virus coxackie A, virus respiratorio sincitial o malaria una cantidad de un anticuerpo humanizado suficiente para disminuir o inhibir o prevenir uno o varios síntomas asociados a RVH, virus coxackie A, virus respiratorio sincitial o malaria en el sujeto. Los síntomas disminuidos o inhibidos o impedidos incluyen, por ejemplo, para RVH, uno o varios de fiebre, congestión, tos, goteo nasal y dolor de garganta, asociados con el resfriado común. Un método incluye administrar en un sujeto que tiene otitis media una cantidad de un anticuerpo humanizado suficiente para disminuir o inhibir o prevenir uno o varios síntomas de otitis media en el sujeto. Un método incluye administrar en

un sujeto que tiene bronquitis una cantidad de un anticuerpo humanizado suficiente para disminuir o inhibir o prevenir uno o varios síntomas de bronquitis en el sujeto. En otra realización más, un método incluye administrar en un sujeto que tiene sinusitis una cantidad de un anticuerpo humanizado suficiente para disminuir o inhibir o prevenir uno o varios síntomas de sinusitis en el sujeto. Un método incluye administrar en un sujeto que padece o está en peligro de padecer asma una cantidad de un anticuerpo humanizado suficiente para disminuir o inhibir o prevenir la exacerbación de asma. En un aspecto, el anticuerpo humanizado se administra localmente. En otro aspecto, el anticuerpo humanizado se administra por medio de la inhalación o intranasalmente.

Además de la inhibición de patógenos que funcionan directamente o indirectamente por ICAM-1, se pueden usar los anticuerpos humanizados de la invención para tratar condiciones fisiológicas indeseables, tales como enfermedades o desórdenes en los cuales ICAM-1 desempeña un papel. Por ejemplo, la interacción de LFA-1 con ICAM-1 participa en la inflamación. Por lo tanto, se puede usar un anticuerpo de la invención para inhibir esta interacción modulándose así (p.ej., disminución) la inflamación local o sistémica. Además, el ICAM-1 desempeña un papel en otros caminos de la respuesta inmune, cáncer y metástasis. Por lo tanto, se puede usar un anticuerpo de la invención para reducir o prevenir el rechazo de trasplantes de órganos o enfermedades autoinmunes o cáncer o metástasis. En consecuencia, la invención proporciona anticuerpos que modulan la sensibilidad inmune (p.ej., inflamación) y otros procesos celulares en los cuales ICAM-1 participa y métodos para modular los caminos de la respuesta inmune.

Los métodos descritos pueden ser puesto en práctica antes de la infección (es decir, profilaxis) o después de la infección, antes o después de los síntomas agudos o crónicos de la infección o de que la condición fisiológica o desorden se desarrolle (p.ej., antes del trasplante del órgano). La administración de una composición antes o inmediatamente después del desarrollo de los síntomas puede disminuir la severidad de los síntomas en el sujeto. La administración de una composición antes del desarrollo de los síntomas en el sujeto puede disminuir el contagio del sujeto disminuyendo así la probabilidad de que otros sujetos se vuelvan infectados por el sujeto infectado.

El término "sujeto" se refiere a animales, animales típicamente mamíferos, tales como un primate no humano (gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos, gibones), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos), animal de laboratorio (ratón, rata, conejo, cobayo) y seres humanos. Los sujetos humanos incluyen adultos, y niños, por ejemplo, recién nacidos y niños mayores, por ejemplo, entre los 1 y 5, 5 y 10 y 10 y 18 años. Los sujetos humanos pueden incluir aquellos que padecen o están en peligro de padecer una infección viral, tal como el RVH, y que desarrolla uno o varios síntomas de la infección, por ejemplo, aquellos típicamente asociados con el resfriado común. Los sujetos humanos incluyen a aquellos que padecen o están en peligro de padecer asma, incluyendo asmáticos que sufren asma crónica antes o después del sufrimiento de un ataque de asma agudo. Los sujetos incluyen a modelos de enfermedad animales (p.ej. tales como ratones y primates no humanos) para probar la eficacia *in vivo* de anticuerpos humanizados de la invención (p.ej., un modelo de animal de RVH, un modelo de animal de asma, un modelo de trasplante de órgano, un modelo de desorden autoinmune, modelo de cáncer, etc.).

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones técnicas y científicas usadas en este documento tienen el mismo sentido que comúnmente se entiende por cualquier experto ordinario en la técnica a la cual esta invención pertenece. Aunque se puedan usar los métodos y los materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento, en la práctica o las pruebas de la presente invención, los métodos adecuados y los materiales se describen en este documento.

Según se usa en este documento, las formas singulares "un", "y", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia "a una célula mutada" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "un anticuerpo humanizado" puede incluir la referencia a una o varias de tales células o anticuerpos, etcétera.

Los ejemplos siguientes ilustran, pero no limitan, el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

45 Ejemplo 1

Este ejemplo describe la estrategia para humanizar 1A6.

El anticuerpo monoclonal 1A6 de ratón (mAb1A6) fue desarrollado por Colonno *et al.*, y se ha demostrado que se une específicamente a ICAM-1 y protege a células contra la infección por rinovirus humano (RVH) grupo principal (Colonno RJ, *et al.* (1991) solicitud de patente europea Nº 91201243.2; número de publicación: 0 459 577 A2, que también describe la secuencia del mAb1A6 de ratón). El anticuerpo monoclonal 1A6 de ratón parental fue sintetizado en la forma de scFv. La proteína purificada, Msc1A6, tiene una afinidad de $1,18 \cdot 10^{-6}$ M x en K_D contra ICAM-1 (Tabla 4).

Para humanizar mAb1A6, las secuencias consenso del subgrupo III de V_H humano seleccionado y del subgrupo I de V_L -kappa fueron seleccionadas como el V_H aceptador y marcos V_L , respectivamente (Padlan (1994) *Molecular Immunol.* **31**:169-217; Padlan (1991) *Molecular Immunol.* **28**:489-498). Estas secuencias humanas se han usado previamente para humanizar dos anticuerpos (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4285-4289; Presta. *et al.* (1993) *J. Immunol.* **151**:2623-2632).

Entre un total de 82 residuos de aminoácidos en el marco de la cadena pesada, la secuencia consenso de V_H humano III y el anticuerpo mAb1A6 comparten 54 residuos de aminoácidos idénticos, lo que asciende a una identidad del 66 %. Entre 81 residuos marco de la cadena ligera, la secuencia consenso III V_H humana y el anticuerpo mAb1A6 tiene 52 residuos de aminoácidos en común, lo que iguala a una identidad del 64,2 %. (FIG. 1).

5 Entre un total de 57 residuos de aminoácidos marco que son diferentes entre las secuencias consenso mAb1A6 y humana, 49 de ellos están localizados o en la superficie de la molécula de anticuerpo, o son residuos con características similares, así los residuos de consenso humanos se pueden usar para sustituir residuos de ratón. Las restantes seis posiciones, V_H 37, 69, 71, 73, 94 y V_L 49, pertenecen a la zona "Vernier" como se describe por Toote y Winter (1992, *J. Mol. Biol.* **224**: 487-499). Como los residuos de la zonal "Vernier" forman una capa que es la base de las CDR y pueden hacer impacto con la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo, los residuos en estas posiciones fueron elegidos basados en la construcción del modelo molecular del anticuerpo.

V_L 49:

15 La inspección revela que esta posición es tanto en el centro del sitio de combinación del anticuerpo como en la cadena ligera / interfaz de la cadena pesada. La sustitución de un residuo ideal en esta posición puede mejorar la unión del antígeno tanto por el suministro del contacto de unión directo adicional como mejorando el carácter del interfaz. La tirosina, encontrada en anticuerpos humanos en esta posición, hace ambos. La construcción del modelo sugiere que Y49 puede formar tanto fuerzas de Van der Waals como puentes de H en contacto con ICAM. Y49 también puede relacionarse con la cadena pesada de W102, completando una red de residuos aromáticos que se relacionan que proporcionan tanto la interacción de la unión como la flexibilidad en la interfaz de la cadena ligera / cadena pesada. Por lo tanto, el residuo del consenso humano tirosina en esta posición es superior al residuo de ratón parenteral lisina.

V_H 37:

25 Este residuo está en el interfaz entre las cadenas ligeras y pesadas. Comparando el residuo de ratón parenteral metionina, el residuo de consenso humano valina se mete menos en el interfaz, proporcionando potencialmente más flexibilidad. La flexibilidad en el interfaz puede realzar la afinidad de unión aumentando la adaptabilidad estructural del anticuerpo.

V_H 69:

Este residuo se empaqueta en el interior del dominio variable. El residuo murino, metionina, hace un contacto de desestabilización potencialmente con la estructura de una cadena beta vecina. En contraste, el residuo humano isoleucina se empaqueta bien en el interior de la proteína.

30 V_H 73:

El modelado molecular indica que el residuo consenso humano, ácido aspártico (D73) puede relacionarse con K30 de la cadena pesada CDR1. Ya que la construcción del modelo sugiere que K30 no está implicado directamente en la unión del antígeno, este cambio de estabilización se predice que es neutro o beneficioso.

V_H 71 y V_H 94:

35 La inspección estructural indicó que ambas de estas posiciones requieren un residuo con una pequeña cadena lateral para el mantenimiento de la conformación del anticuerpo apropiado. Por lo tanto, el residuo consenso humano en esta posición, arginina, no es apropiado. Fueron seleccionados serina y glicina para la posición 71.

40 Según Chothia *et al.*, el residuo en V_H 94 está implicado en la estructura canónica de H1 o CDR1 (definido como V_H 26-V_H 32). El CDR1 de 1A6 pertenece a la estructura canónica 1 y familia 1 (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* **186**:651-663; Chothia *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* **227**:799-817; Chothia *et al.* (1989) *Nature* **342**:877-883). Correspondiente a esta estructura canónica, las secuencias humanas mostraron tres residuos posibles en la posición V_H 94: arginina, treonina o alanina (Chothia *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* **227**:799-817). Ya que la arginina no es apropiada para este anticuerpo particular, fueron elegidos alanina, treonina y otro pequeño residuo, ácido aspártico.

45 Finalmente, la construcción del modelo molecular indica que una parte del CDR2 en el dominio V_H, V_H 60-64, no tiene contacto directo con el antígeno. Por lo tanto los residuos de ratón en estas posiciones (DPKVQ) pueden ser sustituidos por residuos humanos ADSVK.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe la preparación de varias construcciones de expresión humanizadas scFv.

50 El cDNA de ScFvA humanizado (HumA) (FIG. 3) que contiene 750 bp fue sintetizado usando una serie de solapamiento de oligonucleótidos. Éstos oligonucleótidos solapantes (Tabla 1) fueron diseñados para codificar los aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) unidas por un conector ((G4S) 4) con un sitio Bam H1. La cadena pesada y la cadena ligera fueron clonadas por separado en el vector TOPO 2.1. Después de la

conformación de la secuenciación del ADN, la cadena pesada y ligera fueron subclonadas en el vector de expresión (pBAD/pIII A) para formar el ADN de longitud completa.

5 Los oligonucleótidos fueron primero hibridados en seis grupos que consisten en oligo AVH1/AVH2, oligo AVH3/AVH4, oligo AVH5/AVH6 para la cadena pesada, y oligo AVL1/AVL2, oligo AVL3/AVL4, oligo AVL5/AVL6 para la cadena ligera. Cada grupo hibridado fue ampliado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa. Los productos hibridados y ampliados del grupo 1-3 fueron reagrupados con oligo AVH7 como plantillas sobrelapantes que fueron amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la ADN polimerasa termostable de alta fidelidad (Roche) con los oligo AVH8 y AVH9 como cebadores. Los productos hibridados y ampliados del grupo 4-6 se reagruparon con oligo AVL7 como plantillas sobrelapantes que también fueron amplificadas por medio de la reacción en
10 cadena de la polimerasa (PCR) usando los oligo AVL8 y AVL9 como cebadores. Los productos PCR fueron directamente insertados en el vector de clonación de TA pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se trasladaron a células competentes de TOP10. Los plásmidos con insertos fueron aislados y secuenciados.

15 Los fragmentos de ADN de la cadena ligera y cadena pesada fueron aislados de su vector de clonación por la digestión con Nco I/Bam H I y Bam H I/Hpa I respectivamente, y clonados en pBAD/pIII en el vector de expresión un recorte con Nco I / Sal I (romo) para estar en el marco con el marcador His del extremo carboxi-terminal. Ambas cadenas del construcción de expresión pBAD-HumA fueron secuenciadas (MWG Biotech, Inc).

Todas las otras construcciones de expresión de scFv humanas (de HumB a H) fueron hechas con el mismo procedimiento que HumA descrito más arriba excepto usando diferentes oligonucleótidos (Tabla 1).

20 Para HumB, usando BVH6 y BVH7 para sustituir AVH6 y AVH7; para HumC, usando CVH5, CVH6 y CVH7 para sustituir AVH5, AVH6 y AVH7; para HumD, usando DVH6 y DVH7 para sustituir AVH6 y AVH7; para HumE, usando EVH4, BVH5, EVH6 y EVH7 para sustituir AVH4, AVH5, AVH6 y AVH7; para HumF, usando FVH6 y FVH7 para sustituir AVH6 y AVH7; para HumG, usando GVL3, GVL4, GVH5, GVH6 y GVH7 para sustituir AVL3, AVL4, AVH5, AVH6 y AVH7; para HumH, usando HVL3, HVL4, HVH4, HVH5, HVH6 y HVH7 para sustituir AVL3, AVL4, AVH4, AVH5, AVH6 y AVH7; para HumI, usando IVL3, IVL4, IVH4, IVH5, IVH6 e IVH7 para sustituir AVL3, AVL4, AVH4, AVH5, AVH6 y AVH7.

Tabla 1. Oligonucleótidos para scPys humanizado

Oligonucleótidos para la cadena ligera (V_L) de HumA

AVL-1 (SEQ ID NO:26):	CGAACCATGGCGATATCCAGATGACCCAATCTCCGTCTAGCCTGAGCGCCAGTGGTGGTG
AVL-2 (SEQ ID NO:27):	GTGAAGATTATTACTGATAGATTGGCTGGCGCGCAAGTAATGGTAACTCGATCACCAACAC
	TGGCGCTCAG
AVL-3 (SEQ ID NO:28):	CTATCAGTAATAATCTTCACTGGTATCAACAAAACCCGGGTAAGCTCCGAAACTTCTTATCT
	ATCAGGCC
AVL-4 (SEQ ID NO:29):	CCCGAGCCAGAGCCAGAGAGCGGCTCGGAACCCCGCTAATGCTCTGAGAGGGGTGATAG
	ATAAGAAG
AVL-5 (SEQ ID NO:30):	CTCTGGCTCTGGCTCGGGCACGGACTTACCCTTACCATCAGCTCTCTCAGCCGGAAGAC
	TTTGCACC
AVL-6 (SEQ ID NO:31):	CCTTGACCGAAGGTATACGGCCAGCTATTAGACTGCTGACAATAATAGGTGCAAAAGTCTTC
	CGGC
AVL-7 (SEQ ID NO:32):	GTATACCTTCGGTCAAGGTACCAAGGTCGAGATTAAGCGCGGGTGGCGGTTCTGGTGGC
	GGTGGTAGCG
AVL-8 (SEQ ID NO:33):	CGAACCATGGCGGATATCCAGATGACCCAATC
AVL-9 (SEQ ID NO:34):	CGGATCCACCGCCACCGCTACCCACCGCCACCCAG

Oligonucleótidos para la cadena pesada (V_H) de HumA

AVH-1 (SEQ ID NO:35):	GGTGGCGGTGGATCCGGTGGCGGTGGCAGCGAAGTTCAACTTGTGAGTCTGTTGGCGGGT
	CTGGTTCAGCCGG
AVH-2 (SEQ ID NO:36):	GTCCCTAATGTTGAAACCGCTTGCTGCGCAAGACAGCGCCAGAGCCACCCCGGCTGAACC
	AGACCGCCAC
AVH-3 (SEQ ID NO:37):	GGTTTCAACATTAAGGACACCTAATCCATTGGGTGAGGCAAGCTCCGGGTAAGGGTCTGG
	AGTGGG

continuación

AVH-4 (SEQ ID NO:38):
GGCCCTTCACGCTGTACGGTAAATGGTGTGTCGTTTCCGGGTGATACGTGCCACCCA
CTCCAGACCCCTTACC

AVH-5 (SEQ ID NO:39):
CGCTGACAGCGTGAAGGGCCGTTTTACTATTTCTAGCGACGACTCTAAGAACACCCGGGTAC
CTTCAGATGAACCTCTGCG

AVH-6 (SEQ ID NO:40):
CCAGTAGCCAGAGTCCGTGCAGTAGACGGGGTGTCCCTCGGCACGCAGAGAGTTTCAT
CTGAAGG

AVH-7 (SEQ ID NO:41):
GGACTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCAGCCTTGTACCCGTCTCTTCTGGT
TAAC

AVH-8 (SEQ ID NO:42):GGTGGCGGTGGATCCCGGT

AVH-9 (SEQ ID NO:43):GGGTTAACCCAGAGAGACGG

Oligonucleótidos para preparar otro scFv (Hum-B-1):

BVH-6 (SEQ ID NO:44):
CCAGTAGCCAGAGCCGTCAGTAGACGGGGTGTCTCCGGCACGCAGAGAGTTTCAT
CTGAAGG

BVH-7 (SEQ ID NO:45):
GGCCTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCAGCCTTGTACCCGTCTCTTCTGGT
TAAC

CVH-5 (SEQ ID NO:46):
CGCTGACAGCGTGAAGGGCCGTTTTACTATTTCTGGCGACGACTCTAAGAACACCCGGGTAC
CTTCAGATGAACCTCTGCG

CVH-6 (SEQ ID NO:47):
CCAGTAGCCAGAGGTCGTGCAGTAGACGGGGTGTCCCTCGGCACGCAGAGAGTTTCAT
CTGAAGG

CVH-7 (SEQ ID NO:48):
GACCTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCAGCCTTGTACCCGTCTCTTCTGGT
TAAC

DVH-6 (SEQ ID NO:49):
CCAGTAGCCAGAGGTCGTGCAGTAGACGGGGTGTCCCTCGGCACGCAGAGAGTTTCAT
CTGAAGG

continuación

DVH-7 (SEQ ID NO:50):
 GACCTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCCACCGCTTGTACCCGCTCTCTTCTGGT
 TAAC

EVH-4 (SEQ ID NO:51):
 GGCCCTGCACCTTCGGATCGTAAATGGTGTGTCGTTTCCCGGGTCGATACGGTGCCACCCCA
 CTCCAGACCCCTTACC

EVH-5 (SEQ ID NO:53):
 CGATCCGAAAGGTGCAGGGCCGTTTTACTATTTCTGCGGACGACTCTAAGAACACCCGGTAC
 CTTCAGATGAACTCTCTGCG

EVH-6 (SEQ ID NO:54):
 CCAGTAGCCAGAGGTCGTGCAGTAGTAGACGGCGGTGTCTCCGGCACGCAGAGAGTTTCAT
 CTGAAGG

EVH-7 (SEQ ID NO:55):
 GACCTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCCACCGCTTGTACCCGCTCTCTTCTGGT
 TAAC

FVH-6 (SEQ ID NO:56):
 CCAGTAGCCAGAGGTCGTGCAGTAGTAGACGGCGGTGTCTCCGGCACGCAGAGAGTTTCAT
 CTGAAGG

FVH-7 (SEQ ID NO:57):
 GACCTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCCACCGCTTGTACCCGCTCTCTTCTGGT
 TAAC

GVL-3 (SEQ ID NO:58):
 CTATCAGTAAATAATCTTCACCTGGTATCAACAATAACCGGGTAAAGCTCCGAAACTTCTTATCA
 AACACGCC

GVL-4 (SEQ ID NO:59):
 CCCGAGCCAGAGCCAGAGAGCGGCTCGGAACGCCGCTAATGCTCTGAGAGGGCGTGAAG
 ATAAGAAG

GVH-5 (SEQ ID NO:60):
 CGCTGACAGCGTGAAGGGCCGTTTTACTATTTCTGCGGACGACTCTAAGAACACCCGGTAC
 CTTCAGATGAACTCTCTGCG

GVH-6 (SEQ ID NO:61):
 CCAGTAGCCAGAGGTCGTGCAGTAGTAGACGGCGGTGTCTCCGGCACGCAGAGAGTTTCAT
 CTGAAGG

GVH-7 (SEQ ID NO:62):
 GACCTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACGCTTGTACCCGCTCTCTTCTGGT
 TAAC
 HVL-3 (SEQ ID NO:63):
 CTATCAGTAATAATCTTCACTGGTATCAACAAAAACCCGGTAAAGCTCCGAAACTTCTTATCA
 AACACGCC
 HVL-4 (SEQ ID NO:64):
 CCCGAGCCAGAGCCAGAGAGAGCGGGCTCGGAACCGCCGCTAATGCTCTGAGAGGCGGTGAAAG
 ATAAGAAG
 HVH-4 (SEQ ID NO:65):
 GGCCCTGCACCTTCGGATCGTAAATGGTGTGTTGCTGTTGCCGGTGCATACGTGCCACCCCA
 CTCAGACCCCTTACC
 HVH-5 (SEQ ID NO:66):
 CGATCCGAAGGTGCAGGGCCGTTTTACTATTTCTGCGGACGACTCTAAGAACACCCGCGTAC
 CTTCAGATGAACCTCTCTGCC
 HVH-6 (SEQ ID NO:67):
 CCAGTAGCCAGAGGTCGTGCAGTAGACGGCGGTGTCTCGGCACGCAGAGAGTTTAT
 CTGAAGG
 HVH-7 (SEQ ID NO:68):
 GACCTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACGCTTGTACCCGCTCTCTTCTGGT
 TAAC
 IVL-3 (SEQ ID NO:69):
 CTATCAGTAATAATCTTCACTGGTATCAACAAAAACCCGGTAAAGCTCCGAAACTTCTTATCA
 AACACGCC
 IVL-4 (SEQ ID NO:70):
 CCCGAGCCAGAGCCAGAGAGCGGGCTCGGAACCCGCTAATGCTCTGAGAGGCGGTGAAAG
 ATAAGAAG
 IVH-4 (SEQ ID NO:71):
 GGCCCTGCACCTTCGGATCGTAATGGTGTGTTGCTGTTGCCGGTGCATACGTGCCACCCCA
 CTCAGACCCCTTACC
 IVH-5 (SEQ ID NO:72):
 CGATCCGAAGGTGCAGGGCCGTTTTACTATGTCTGCGGACACCCTCTAAGAACACCCGCGTAC
 CTTCAGATGAACCTCTCTGCC

continuación

IVH-6 (SEQ ID NO:73):
continuation
CCAGTAGCCAGAGGTCGGTGCAGTAGACGGCGGTGTCCCTCGGCACGCAGAGTTTCAT
CTGAAGG

IVH-7 (SEQ ID NO:74):
GACCTCTGGCTACTGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCGCTTGTACCGTCTCTTCTGGT
TAAC

El constructo del modelo molecular permitió la síntesis de 9 versiones de anticuerpos humanizados en la forma de scFv (HumA-HumI, resumido en las Tablas 2 y 3). Cuatro de los anticuerpos humanizados, HumA-HumD, no tienen residuos marco de ratón parenterales, y cinco de ellos, HumE-HumI, contienen varios números de residuos de ratón parenterales en marco. La secuencia de HumB es comparada con el 1A6 de ratón parenteral y marco consenso humano en la FIG. 2.

5

Tabla 2. Construcciones de humanización

Posición Humano / Ratón	L49 Y/K	H37 V/M	H60-64 ADSVK/DPKVQ (SEQ ID NO:75 y 76)	H69 I/M	H71 R/A	H73 D/T	H94 R/T
HumA	Y	V	ADSVK	I	S	D	D
HumB	Y	V	ADSVK	I	S	D	A
HumC	Y	V	ADSVK	I	G	D	T
HumD	Y	V	ADSVK	I	S	D	T
HumE	Y	V	DPKVQ	I	A	D	T
HumF	Y	V	ADSVK	I	A	D	T
HumG	K	V	ADSVK	I	A	D	T
HumH	K	V	DPKVQ	I	A	D	T
HumI	K	M	DPKVQ		M A T		T

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado

HumA:

Dominio VH (SEQ ID NO:1)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala Pro
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Ala
 Asp Ser Val Lys Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Asp (Ser Gly Tyr Trp
 Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Dominio VL (SEQ ID NO:3)

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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

Hum B:

(continuación)

Dominio VH. (SEQ ID NO:4)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Ala
 Asp Ser Val Lys Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala (Ser Gly Tyr
 Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Dominio VL. (SEQ ID NO:5)

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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

Hum C:

(continuación)

Dominio VH (SEQ ID NO:6)
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Ala
 Asp Ser Val Lys Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr (Ser Gly Tyr
 Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Dominio VL (SEQ ID NO:7)
 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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

Hum D:

(continuación)

· Dominio VH (SEQ ID NO:8)

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Ala
 Asp Ser Val Lys Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr (Ser Gly Tyr
 Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

· Dominio VL (SEQ ID NO: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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg**

Hum E:

(continuación)

Dominio VH (SEQ ID NO:10)
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr
 Asp Pro Lys Val Gln Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr (Ser Gly
 Tyr Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Dominio VL (SEQ ID NO:11)

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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

Hum F:

(continuación)

Dominio VH(SEQ ID NO:12)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Ala
 Asp Ser Val Lys Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr (Ser Gly Tyr
 Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Dominio VL (SEQ ID NO:13)

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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Tyr (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

Hum G:

(continuación)

Dominio VH (SEQ ID NO:14)
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Ala
 Asp Ser Val Lys Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu

 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr (Ser Gly Tyr
 Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 Dominio VL (SEQ ID NO:15)
 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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

Hum H:

(continuación)

Dominio VH (SEQ ID NO:16)

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr
 Asp Pro Lys Val Gln Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr (Ser Gly
 Tyr Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**

Dominio VL (SEQ ID NO:17)

**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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg**

Hum I:

Dominio VH (SEQ ID NO:18)

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Met Arg Gln Ala**

(continuación)

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr
 Asp Pro Lys Val Gln Gly) Arg Phe Thr Met Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr (Ser Gly
 Tyr Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Dominio VL (SEQ ID NO:19)

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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Lys (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

Los residuos CDR están incluidos entre paréntesis.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la expresión y la purificación de proteínas del anticuerpo de cadena sencilla 1A6 humanizado.

5 Para la producción del 1A6 scFv humanizado, fueron cultivadas células TOP10 transformadas con el constructo de expresión deseado en matraces oscilantes en medio TB (101 Bio) hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de 0,8. La expresión de proteínas fue inducida con arabinosa al 0,02 % durante dieciocho horas a temperatura ambiente. Las células se granularon por centrifugación a 4.000 g durante 15 minutos. Las bolitas de células fueron suspendidas de nuevo en un volumen 1/50 de tampón de lisis (fosfato de sodio 20 mM, Tritón X-100 al 1 %, NaCl 500 mM, imidazol 40mM, 2-mercaptoetanol 2 mM), PMSF 0,2 mM, 1mg/ml de lisozima y se incubaron en hielo durante 30 minutos. La suspensión celular se sonicó y se añadió otra parte alícuota de PMSF. Los restos celulares se granularon por centrifugación a 12.000 x g y el sonicado clarificado fue filtrado y separado por fraccionamiento por cromatografía de afinidad con metal. Las proteínas marcadas con histidina inducidas se unieron a una columna quelante de metal Hi Trap™ (Amersham/Pharmacia) equilibrada con Ni²⁺ según las instrucciones del fabricante. La columna fue lavada entonces con cuatro volúmenes de columna de tampón que consistía en imidazol 100 mM, fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM. Las fracciones de proteínas eluidas de la columna en Imidazol 500 mM, fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4 se recogieron, se reunieron y se dializaron a 4°C contra solución salina tamponada de fosfato (PBS)/EDTA 2mM, entonces se dializaron contra PBS.

Ejemplo 4

20 Este ejemplo describe los estudios de medición de la afinidad de unión de proteínas de anticuerpo de cadena sencilla humanizadas para ICAM-1.

25 Para evaluar la afinidad de unión de proteínas de cadena sencilla humana marcadas con histidina (hsc) se usó ICAM soluble en un ensayo ELISA. Se revistió una placa EIA de 96 pocillos (Corning, Inc) con 100 μ l/pocillo de ICAM-1 soluble (Bender MedSystems) a 1 μ g/ml en NaHCO₃ 0,1 M. Después de lavar con TBST (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05 %), la placa fue bloqueada con leche sin grasa al 3 % en TBST a 37°C durante 1 hora. Después de lavar con TBST, la placa se incubó con muestras scFv (100 ml / pocillo) diluido en la leche sin grasa al 1 % / solución de TBST a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con TBST, fue añadido el anticuerpo (C-term) (Invitrogen) anti-His conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1:2000 en leche/TBST sin grasa al 1 % y la placa fue incubada a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa fue lavada a fondo con TBST y fueron añadidos 100 μ l/pocillo de solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametbenzidina (Laboratorios Kirkegaard y Perry). Después de 5 minutos de incubación, el desarrollo del color fue parado añadiendo 100 μ l/pocillo de HCl 0,12 N y fue medida la absorbancia de los pocillos a 450 nm con un lector de placas (ICN).

Los estudios de unión revelaron que todas las proteínas scFv humanizadas (hsc) se manifestaban con una afinidad de unión mayor de diez veces más alta para ICAM-1 que la del scFv del ratón parenteral (Tabla 4).

Tabla 4. 1A6 scFv de ratón y 1A6 scFv humanizado

ScFv	K _D (M)	CE 50 (μ M)*
Msc1A6	1,18 x 10 ⁻⁶	> 10
HumA	1,50 x 10 ⁻⁷	2,8
HumB	2,62 X 10 ⁻⁸	0,19
HumC	5,80 x 10 ⁻⁸	0,22
HumD	2,33 X 10 ⁻⁸	0,05
HumF	4,60 x 10 ⁻⁸	0,29
HumH	2,09 x 10 ⁻⁸	4,2
HumI	1,50 x 10 ⁻⁷	> 10

* Protección del 50 % de células HeLa contra la infección por RVH15 en 1 MOI.

Ejemplo 5

40 Este ejemplo describe datos que demuestran que los anticuerpos 1A6 humanizados protegen contra la infección por RVH. Este ejemplo también describe los datos que demuestran que la protección era sustancialmente mayor que la del anticuerpo 1A6 de ratón.

Las células de HeLa fueron puestas en placas a 1×10^5 células por pocillo de una placa de cultivo de tejido de 48 pocillos y fueron cultivadas durante 24 horas. El medio de cultivo fue aspirado y 100 μ l de proteínas de 1A6 humanizado fueron añadidas a cada pocillo en la dilución indicada. Las placas fueron incubadas durante una hora a 37°C en incubadora, la disolución de proteína fue quitada, fueron añadidos 200 ml de RVH15 (en MOI de 1) y las placas se incubaron durante una hora a 33°C. Las células fueron lavadas entonces y fue añadido 1 ml/pocillo de medio de crecimiento. Las células infectadas fueron incubadas a 33°C durante 48 horas. El medio fue aspirado entonces y las células viables restantes se tiñeron con violeta de cristal. Finalmente, el violeta de cristal fue extraído con 2 ml por pocillo de metanol, y la tinción extraída fue determinada midiendo la A_{570} . La protección en porcentaje fue calculada para cada punto por triplicado usando la fórmula:

$$\% \text{ protección} = \frac{(100) (\text{Absorbancia de muestra} - \text{Absorbancia de virus solo})}{(\text{Absorbancia de células infectadas} - \text{Absorbancia de virus solo})}$$

10

La eficacia protectora fue cuantificada como EC_{50} , que es la dosis de una proteína de anticuerpo que puede proteger el 50 % de células hela de la infección por RVH. La EC_{50} de varias proteínas 1A6 humanizadas son resumidas en la Tabla 4, y los datos de este ensayo de protección son mostrados en la FIG. 4. Este ensayo reveló que la EC_{50} de la proteína scFv Hum19 era más de sesenta veces más alta que la de la proteína scFv 1A6 de ratón parenteral (FIG. 4). Los resultados de la protección *in vitro* se correlación bien con la afinidad de unión del anticuerpo.

15

Ejemplo 6

Este ejemplo describe otras estrategias para humanizar 1A6.

Fueron producidas otras dos versiones del 1A6 humanizado injertando los bucles de CDR del dominio V_H en dos secuencias marco consenso humanas diferentes, Hum40 y Hum50. La Hum40 es un 1A6 humanizado que resulta de CDR que se injerta en el subgrupo II de V_H consenso humano (Hum2) y Hum50 es un 1A6 humanizado que resulta de CDR que se injerto en el subgrupo I de V_H consenso humano (Hum1) (Padlan (1991) *Mol. Immunol.* **28**:489-498; FIG. 5).

20

Hum40:

El subgrupo II de V_H humano (Hum2) comparte 50 residuos de aminoácidos idénticos entre 82 residuos marco con la secuencia de V_H de 1A6 murina, lo que asciende a una identidad del 61 % (FIG. 5 y 6). Entre los 32 residuos de aminoácidos que se diferencian entre el 1A6 murino y HumII, seis de ellos pertenecen a la zona "Vernier" (Foote y Vinter, (1992), *J. Mol. Biol.* **224**:487-499), y pueden afectar a la afinidad de unión por el antígeno. Los residuos zonales "Vernier" críticos son V_H 67, 69, 71, 78, 93 y 94.

25

El análisis de los aminoácidos en las posiciones V_H 67, 69 78 y 93 revelan que los residuos consenso humanos y los residuos murinos tienen propiedades muy similares. Por lo tanto, los residuos consenso humanos son usados para sustituir a los residuos murinos en estas posiciones. El análisis estructural revela que los residuos en V_H 71 y 94 deberían tener pequeñas cadenas laterales, lo que excluye a los residuos de consenso humanos, lisina y arginina en estas dos posiciones. Serina y alanina, ambas con pequeñas cadenas laterales, fueron por lo tanto seleccionadas para V_H 71 y V_H 94, respectivamente. Por consiguiente, el dominio V_H de Hum40 contiene todos los residuos consenso humanos en las posiciones marco excepto V_H 71 y V_H 94. Los residuos que no se relacionan con los residuos murinos o con los humanos fueron elegidos a V_H 71 y V_H 94 debido a sus rasgos estructurales (FIG. 6).

30

35

Hum50:

El subgrupo V_H humano I (Hum1) comparte 62 residuos de aminoácidos idénticos entre 82 residuos marco con la secuencia de V_H de 1A6 murina, que asciende a una identidad del 76 % (FIG. 5 y 7). Entre los 20 residuos de aminoácidos que se diferencian entre 1A6 murino y Hum1, cuatro de ellos pertenecen a la zona "Vernier" (Foote y Vinter, (1992), *J. Mol. Biol.* **224**:487-499), y pueden afectar a la afinidad de unión por el antígeno. Los residuos zonales "Vernier" críticos son V_H 48, 67, 93 y 94. El análisis de los aminoácidos en las posiciones V_H 48, 67 y 93 revelan que los residuos consenso humanos y los residuos murinos tienen propiedades muy similares. Por lo tanto, los residuos consenso humanos son usados para sustituir residuos murinos en estas posiciones. El análisis estructural revela que el residuo en V_H 94 debería tener una pequeña cadena lateral, lo que excluye el residuo consenso humano arginina. La alanina fue seleccionada por lo tanto para V_H 94. Por consiguiente, Hum50 contiene todos los residuos consenso humano en las posiciones marco excepto el V_H 94 (FIG. 7).

40

45

Ejemplo 7

Este ejemplo describe la preparación de la proteína de Fab de 1A6 humanizado.

5 Se hicieron tres constructos de expresión: Fab19, Fab40 y Fab50. El Fab19 está formado por dominios variables (V_H y V_L) derivados de 1A6 humanizado, HumB (véase la Tabla 3), que está basado en la secuencia consenso humana de la cadena pesada el subgrupo III de V_H y la cadena ligera λ humana del subgrupo I. Fab40 y Fab50 contienen dominios V_H de Hum40 y Hum50 respectivamente y las mismas cadenas ligeras que Fab19. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de Fab19, Fab40 y Fab50 está puesta en una lista en la Tabla 5, y las secuencias de genes correspondientes están puestas en una lista en la Tabla 6.

10 Los segmentos de genes del dominio variable de la cadena ligera (V_L) y la región constante de la cadena ligera (CL) que fue derivada de la región constante de la cadena ligera λ_1 humana (Palm e Hilschmann, 1975, *Z. Physiol. Chem.* 356:167-191) fueron sintetizados por separado por amplificación PCR. Después de la conformación de la secuenciación, los dos segmentos de genes fueron fusionados junto para formar el gen de V_L - C_L de la cadena ligera. Un intento similar se usó para clonar el segmento del gen que contenía el dominio variable de la cadena pesada (V_H) y la región constante de la cadena pesada (CH) que está basado en la secuencia del dominio CH1 de la IgG1 humana (Ellison *et al.*, 1982, *Nucl. Acids Res.* 10:4071).

15 Se diseñó un vector de expresión para la producción de proteínas de Fab. Los dominios V_H y V_L son exactamente fusionados en sus extremos 5' finales a un segmento de genes que codifica la secuencia señal de la enterotoxina II. La secuencia intermedia en el gen dicistrónico contiene un sitio de entrada de ribosoma, mientras que el extremo 3' del gen contiene terminador el transcripcional de bacteriofago λ t_0 . Se usó el promotor ptac isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG)-inducible para conducir la expresión de este mensaje dicistrónico.

20 Para la producción de las proteínas de Fab de 1A6 humanizado, fueron cultivadas células JM83 mutadas con el constructo de expresión deseado en matraces oscilantes en medio TB (Bio 101) hasta que alcanzaron un OD_{600} de 1,2. La expresión de la proteína fue inducida con MIPTG 0,2m durante dieciocho horas a temperatura ambiente. Las células se granularon por centrifugación a 4 000 g durante 15 minutos.

25 Las bolitas de células fueron suspendidas de nuevo en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 1,0 M, EDTA 5 mM, PMSF 0,2 mM, 1mg/ml de lisozima) a la solución del 10-15 % y se incubaron en hielo durante 20 minutos. La suspensión celular se sonicó y fue añadida otra parte alícuota de PMSF. Los restos celulares fueron quitados por centrifugación a 12 000 x g y el sonicado clarificado fue filtrado y dividido en fracciones por afinidad cromatografía, usando Proteína A agarosa para Fab 19 y Proteína G agarosa para Fab40 y Fab50. Después de lavar las columnas de proteína A o proteína G con Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 2,0 M, EDTA 5 mM, la proteína unida se eluyó de las columnas con Glicina 0,1 N, pH 2,5, y se reunieron en los tubos que contenían 1/10 volumen de Tris 0,1 M, pH 9,0. Las fracciones de proteína fueron reunidas y luego dializadas contra TBS.

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de Fab19, Fab40 y Fab50

Dominio V_L de Fab19, Fab40 y Fab50 (SEO ID NO:5):

**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 Asn Asn Leu His) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (His Ala Ser Gln Ser Ile Ser) Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr) Phe Gly Gln
35 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg**

Dominio V_H de Fab19 (SEQ ID NO:4):

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 Ser Cys Ala Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Ala
 Asp Ser Val Lys Gly) Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala (Ser Gly Tyr
 Trp Phe Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Dominio V_H de Fab40 (SEQ ID NO:20):

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Thr Leu Thr
 Cys Thr Val Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
 Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys
 Val Gln Gly) Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Asn Leu
 Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala (Ser Gly Tyr Trp Phe Ala
 Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Dominio V_H de Fab50 (SEQ ID NO:21):

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser
 Cys Lys Ala Ser (Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly (Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Asp Pro
 Lys Val Gln Gly) Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala (Ser Gly Tyr Trp Phe
 Ala Tyr) Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

Los residuos CDR se incluyen entre paréntesis.

Tabla 6. Las secuencias del gen del dominio variable de Fab19, Fab40 y Fab50

Gen de V_L de Fab19, Fab40 y Fab50 (SEO ID NO:22):

GATATCCAGATGACCCAATCTCCGTCTAGCCTGAGCGCCAGTGTTGGTGATCG
 AGTTACCATACTTGCCGCGCCAGCCAATCTATCAGTAATAATCTTCACTGGT
 ATCAACAAAAACCGGGTAAAGCTCCGAAACTTCTTATCTATCACGCCTCTCA
 GAGCATTAGCGGCGTTCGAGCCGCTTCTCTGGCTCTGGCTCGGGCACGGAC
 TTTACCCTTACCATCAGCTCTCTTCAGCCGGAAGACTTTGCCACCTATTATTGT
 CAGCAGTCTAATAGCTGGCCGTATACCTTCGGTCAAGGTACCAAGGTCGAGA
 TTAAGCGG

Gen de V_H de Fab19 (SEO ID NO:23):

GAAGTTCAACTTGTTGAGTCTGGTGGCGGTCTGGTTCAGCCCGGGGGCTCTCT
 GCGCCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGTTTCAACATTAAGGACACCTACATCCATT
 GGGTGAGGCAAGCTCCGGGTAAAGGGTCTGGAGTGGGTGGCACGTATCGACCC
 GGCAAACGACAACACCATTTACGCTGACAGCGTGAAGGGCCGTTTTACTATT
 TCTAGCGACGACTCTAAGAACACCGCGTACCTTCAGATGAACTCTCTGCGTG
 CCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCACGGCCTCTGGCTACTGGTTTGCCTAC
 TGGGGCCAGGGCACGCTTGTCACCGTCTCGAGC

Gen de V_H de Fab40 (SEO ID NO:24):

CAGGTTCAACTTCAGGAGTCTGGTCCGGGTCTGGTTAAACCCTCTGAGACCTT
 GACCCTTACCTGCACGGTTAGCGGTTTCAACATTAAGGACACCTACATCCATT
 GGATTAGGCAACCGCCGGGTAAAGGGTCTGGAGTGGATTGGCCGTATCGACCC
 GGCAAACGACAACACCATTTACGACCCGAAGGTGCAAGGTCGTGTTACCATT
 ACCTCTGACACCTCTAAGAACCAGGTGTCTCTCAATCTCAATAGCGTTACAGC
 GGCTGACACCGCCGTCTACTACTGCGCCGCATCTGGCTACTGGTTTGCCTACT
 GGGGCCAGGGCACGCTTGTCACCGTCTCGAGC

Gen de V_H de Fab50 (SEO ID NO:25):

CAGGTTCAACTTGTGCAGTCTGGTGCAGAGGTGAAGAAACCCGGCGCATCTG
TGAAGGTGTCTTGCAAAGCAAGCGGTTTCAACATTAAGGACACCTACATCCA
TTGGGTTAGGCAAGCGCCGGGTCAAGGTCTGGAGTGGGTGGGCCGTATCGAC
CCGGCAAACGACAACACCATTTACGACCCGAAGGTGCAAGGTCGTGTTACCA
TGACCGCAGACACCTCTACAAACACCGCGTACATGGAGCTGTCTTCTCTGCGT
TCTGAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCCGCATCTGGCTACTGGTTTGCCTA
CTGGGGCCAGGGCACGCTTGTCACCGTCTCGAGC

Ejemplo 8

5 Este ejemplo describe la medición de afinidades de unión de proteínas de Fab de 1A6 humanizado frente a su antígeno ICAM-1.

10 Las afinidades de unión de proteínas Fab fueron evaluadas usando un ensayo ELISA. Una placa de 96 pocillos de EIA (Coming, Inc) fue revestida con 100 μ l/pocillo de ICAM-1 soluble (Doblador MedSystems) a 1 μ g/ml en NaHCO₃ 0,1 M. Después de lavar con TBST (Tris 50 mM, pH8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05 %), la placa fue bloqueada con leche sin grasa al 3 % en TBST a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con TBST, la placa fue incubada con el anticuerpo específico de Fab de IgG antihumano conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma, A-0923) diluido 1:3.000 en leche/TBST sin grasa al 1 % a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa fue lavado a fondo con TBST y fueron añadidos 100 μ l/pocillo de solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Laboratorios Kirkegaard y Perry). Después de una incubación de 10 minutos, el desarrollo del color fue parado añadiendo 100 μ l/pocillo de HCl 0,12 N. La absorbancia a 450 nm fue medida con un lector de placas (ICN), y luego se representó frente a la concentración de anticuerpo. La constante de afinidad (K_D), también llamada constante de disolución de equilibrio, es igual a la concentración de una proteína de Fab que da lugar a una unión de ICAM-1 al 50 % del nivel de saturación.

15 Los estudios de unión revelaron que Fab19 tiene una afinidad de unión mucho más alta para ICAM-1 que su forma de scFv (HumB, véase la Tabla 4). Las afinidades de unión de tres proteínas de Fab humanizadas tienen el orden siguiente: Fab19> Fab40> Fab50.

20

Tabla 7. Afinidad de unión de los 1A6 Fab humanizados

Muestra	K_D (M)
Fab19	9,3 x 10 ⁻⁹
Fab 40	5,1 X 10 ⁻⁸
Fab 50	1,3 x 10 ⁻⁷

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que se une a ICAM-1, en el que dicho anticuerpo tiene un dominio V_H y V_L seleccionado de: SEQ ID NO: 1 y 3 (HumA); SEQ ID NO: 4 y 5 (HumB); SEQ ID NO: 6 y 7 (HumC); SEQ ID NO: 8 y 9 (HumD); SEQ ID NO: 12 y 13 (HumF); SEQ ID NO: 16 y 17 (HumH); SEQ ID NO: 18 y 19 (HumI); y SEQ ID NO: 5 y 20 (Hum40).
- 5 2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es una subsecuencia de una molécula de inmunoglobulina intacta, siendo capaz la subsecuencia de unirse a un epítipo de ICAM-1, y en el que dicha subsecuencia se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de cadena solos y fragmentos Fab, Fab' y (Fab)₂.
- 10 3. Un anticuerpo humanizado, diferenciándose dicho anticuerpo del anticuerpo que se define en la reivindicación 1 en la cual tiene de 1 a 3, de 3 a 5 o de 5 a 10 sustituciones de aminoácidos, a condición de que dicho anticuerpo humanizado sea capaz de unirse a un epítipo de ICAM-1, y en el que dicho anticuerpo humanizado tiene mayor afinidad de unión con el antígeno con relación al anticuerpo no humanizado parenteral, en el que dicho anticuerpo no humanizado parenteral es el anticuerpo 1A6 murino, y en el que dichas sustituciones son sustituciones conservadoras.
- 15 4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, teniendo dicho anticuerpo una eficacia protectora de al menos 2 veces mayor que el anticuerpo no humanizado.
5. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, teniendo dicho anticuerpo una eficacia protectora al menos 5 veces mayor que el anticuerpo no humanizado.
6. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, teniendo dicho anticuerpo una eficacia protectora al menos 10 veces mayor que el anticuerpo no humanizado.
- 20 7. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, teniendo dicho anticuerpo una eficacia protectora al menos 20 veces mayor que el anticuerpo no humanizado.
8. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, teniendo dicho anticuerpo una eficacia protectora al menos 30 veces mayor que el anticuerpo no humanizado.
9. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo no humanizado parenteral tiene las cadenas pesadas y ligeras de SEQ ID NOS: 77 y 79, respectivamente.
- 25 10. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el patógeno es rinovirus humano (RVH).
11. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el patógeno es un virus coxsackie, virus respiratorio sincitial o causativo de la malaria.
- 30 12. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo es multiespecífico o multifuncional.
13. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 o 10, en el que el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina intacta que comprende 2 polipéptidos de la cadena pesadas de la cadena entera y 2 polipéptidos de la cadena ligera de la cadena entera.
- 35 14. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el anticuerpo se une a otros anticuerpos idénticos o diferentes para formar un multímero.
15. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 14, en el que el multímero comprende un homo- o hetero-dímero, trímero, tetrámero o pentámero.
16. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 14 o 15, en el que el multímero está formado por medio de un dominio multimerización.
- 40 17. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 16, en el que el dominio de multimerización comprende una secuencia de aminoácidos humana.

18. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 16 o 17, que comprende además un conector localizado entre el dominio de multimerización y el anticuerpo.
19. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 14 o 15, en el que los anticuerpos diferentes son humanos, humanizados o no humanos.
- 5 20. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
21. Un casete de expresión que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 20 operativamente unido a un elemento del control de la expresión.
22. Un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 20.
- 10 23. El vector de la reivindicación 22, en el que la secuencia de ácidos nucleicos está operativamente unida a un elemento del control de la expresión.
24. Una célula que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 20 o el casete de expresión de la reivindicación 21 o el vector de la reivindicación 22 o 23.
25. La célula de la reivindicación 24, en el que la célula es procariota o eucariota.
- 15 26. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
27. La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en la que el vehículo es compatible con una inhalación o administración nasal a un sujeto.
- 20 28. Un método *in vitro* para inhibir la infección patógena de una célula que comprende poner en contacto un patógeno o una célula con una cantidad de un anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 suficiente para inhibir la infección patógena de la célula.
29. Un método *in vitro* para inhibir la infección por RVH de una célula que comprende poner en contacto RVH o una célula susceptible a la infección por RVH con una cantidad de un anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 10 o 12 a 19 eficaces para inhibir la infección por RVH de la célula.
- 25 30. El uso del anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de una infección patógena.
31. El uso del anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 10 o de 12 a 19 de la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de una infección por RVH, para la inhibición de la progresión del RVH o para el tratamiento de una infección por RVH.
- 30 32. El método de la reivindicación 28 o 29 o el uso de la reivindicación 30 o 31, en el que el anticuerpo se une a un antígeno presente en la superficie de la célula.
33. El método de la reivindicación 28, 29 o 32 o el uso de la reivindicación 30, 31 o 32, en el que la célula expresa ICAM-1.
- 35 34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 28, 29, 32 o 33 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, en el que la célula es una célula epitelial.
35. El uso del anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 10 o de 12 a 19 de la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de uno o varios síntomas del resfriado común.
36. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 35, en el que el anticuerpo humanizado debe ser administrado localmente.

- 37.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 36, en el que el anticuerpo humanizado debe ser administrado por medio de inhalación o intranasalmente.
- 38.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 37, en el que la composición farmacéutica debe ser administrada a un sujeto que padece o está en peligro de padecer asma.
- 5 **39.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 38, en el que la composición farmacéutica debe ser administrada a un sujeto que es un recién nacido o tiene de 1 a 5, de 5 a 10 o de 10 a 18 años.

Figura 1

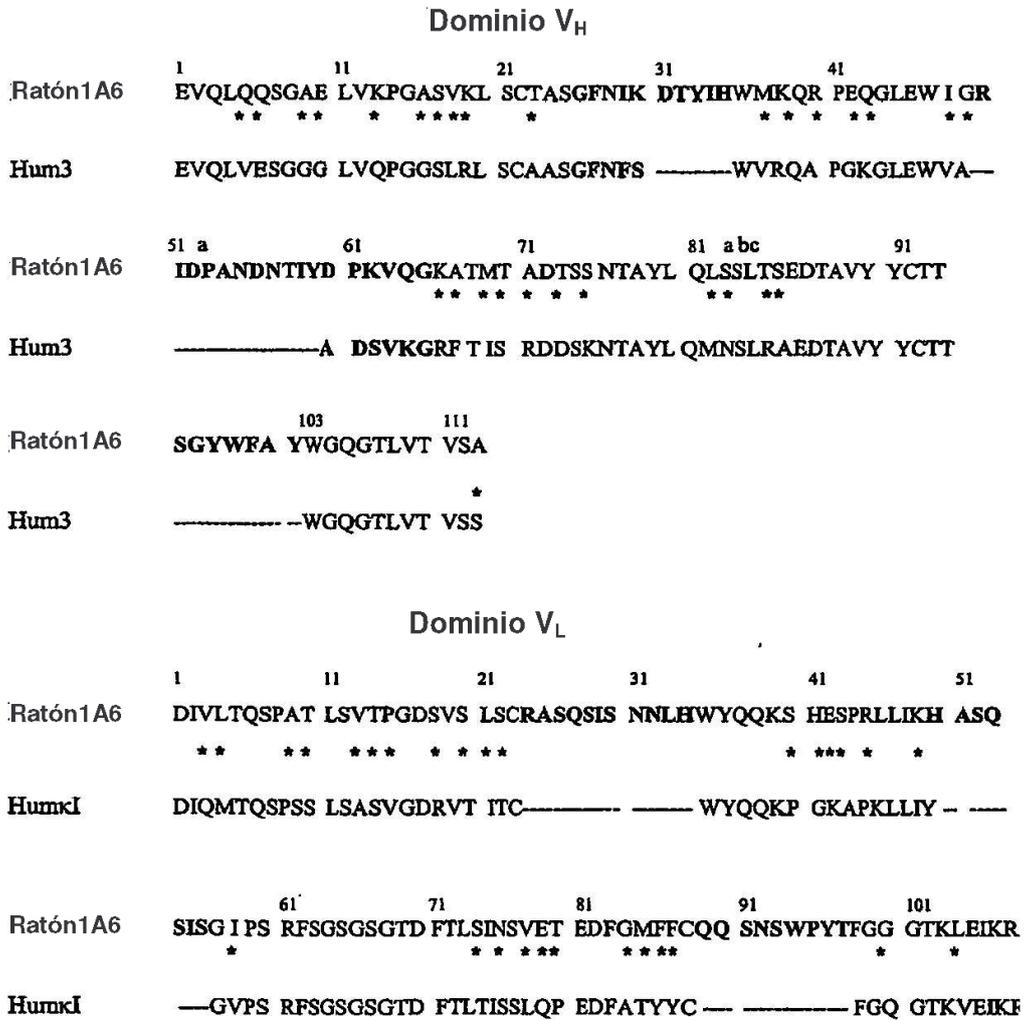


Figura 2

Dominio V_H

	1	11	21	31	41	
Ratón	EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHWMKQR PEQGLEWI GR					
	* * * * *					
HumB	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYDHWVRQA PGKGLEWVAR					
Hum3	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNFS -----WVRQA PGKGLEWVA--					
Ratón	51 a	61	71	81 a bc	91	
	IDPANDNTIYD PKVQGKATMT ADTSS NTAYL QS NSLTSED TAVY YCT T					
	* * * * * * * * * *					
HumB	IDPANDNTIYA DSVKG RFT IS SDDSKNTAYL QMNSLRAEDTAVY YCTA					
	* * * * *					
Hum3	-----A DSVKG RFT IS RDDSKNTAYL QMNSLRAEDTAVY YCTR					
Ratón	103	111				
	SGYWFA YWGQGT LVT VSS					
HumB	SGYWFA YWGQGT LVT VSS					
Hum3	-----WGQGT LVT VSS					

Dominio V_L

	1	11	21	31	41	51
Ratón	DIVLTQSPAT LSVTPGDSVS LSCRASQSSIS NNLHWYQQKS HESPRLLIKH ASQ					
	* * * * * * * * * *					
HumB	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSSIS NNLHWYQQKP GKAPKLLIYH ASQ					
HumkI	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC----- WYQQKP GKAPKLLIY - -					
Ratón	61	71	81	91	101	
	SISG I PS RFSGSGSGTD FTLSINSVET EDFGMFFCQQ SNSWPYTFGG GTKLEIK					
	* * * * * * * * * *					
HumB	SISGVPS RFSGSGSGTD FILTISSLQP EDFATYYCQQ SNSWPYTFGQ GTKVEIK					
HumkI	---GVPS RFSGSGSGTD FILTISSLQP EDFATYYC --- FGQ GTKVEIK					

Figura 3

CGAACCATGGGCGATATCCAGATGACCCAATCTCCGTCTAGCCTGAGCGCCA
GTGTTGGTGATCGAGTTACCATTACTTGCCGCGCCAGCCAATCTATCAGTAAT
AATCTTCACTGGTATCAACAAAAACCGGGTAAAGCTCCGAAACTTCTTATCTA
TCACGCCTCTCAGAGCATTAGCGGCGTTCCGAGCCGCTTCTCTGGCTCTGGCT
CGGGCACGGACTTTACCCTTACCATCAGCTCTCTTCAGCCGGAAGACTTTGCC
ACCTATTATTGTCAGCAGTCTAATAGCTGGCCGTATACCTTCGGTCAAGGTAC
CAAGGTCGAGATTAAGCGCGGCGGTGGCGGTTCTGGTGGCGGTGGTAGCGGT
GGCGGTGGATCCGGTGGCGGTGGCAGCGAAGTTCAACTTGTTGAGTCTGGTG
GCGGTCTGGTTCAGCCGGTGGCTCTCTGCGCCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGT
TTCAACATTAAGGACACCTACATCCATTGGGTGAGGCAAGCTCCGGGTAAGG
GTCTGGAGTGGGTGGCACGTATCGACCCGGCAAACGACAACACCATTTACGC
TGACAGCGTGAAGGGCCGTTTTACTATTTCTAGCGACGACTCTAAGAACACCG
CGTACCTTCAGATGAACTCTCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGC
ACGGACTCTGGCTACTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACGCTTGTACCCGT
CTCTTCTGGTTAACCC

Figura 4

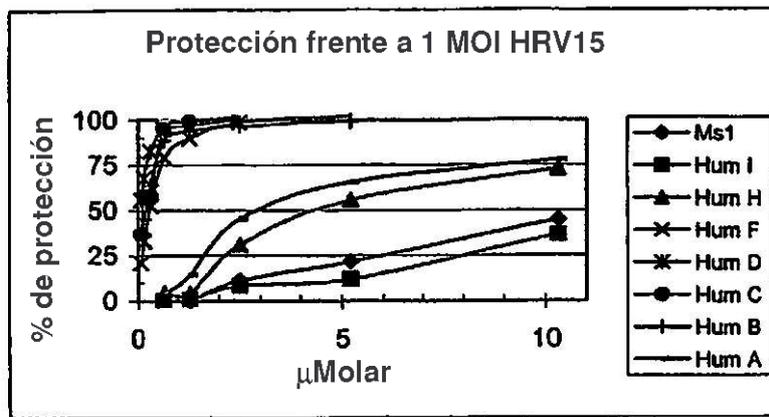


Figura 5

		10		20																							
M1A6 VH:	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S		
Hum2:	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	T	L	T	C	T	V	S		
Hum1:	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S		
		30		40		50																					
M1A6 VH:	G	F	N	I	K	D	T	Y	I	H	W	M	K	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	R		
Hum2:	G	F	S	I	S									W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G
Hum1:	G	G	T	F	S									W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	V	G
																	66			70							
M1A6 VH:	I	D	P	A	N	D	N	T	I	Y	D	P	K	V	Q	G	K	A	T	M	T	A	D	T	S		
Hum2:																	R	V	T	I	T	K	D	T	S		
Hum1:																	R	V	T	M	T	A	D	T	S		
		80		a b c		90																					
M1A6 VH:	S	N	T	A	Y	L	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	T	S	G		
Hum2:	K	N	Q	V	S	L	N	L	N	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	A				
Hum1:	T	N	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	A				
		103		110																							
M1A6 VH:	Y	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S											
Hum2:						W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S											
Hum1:						W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S											

Figura 6

Dominio V_H

	1	11	21	31	41	
Ratón	EVQIQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHWMKQR PEQGLEWI GR					
	* * ** * * * * * * * * * * * * *					
Hum40	QVQLQESGPG LVKPSSETLTL TCTVSGFNK DTYIHWIRQP PGKGLEWI GR					
Hum2	QVQLQESGPG LVKPSSETLTL TCTVSGFISIS -----WIRQP PGKGLEWI G--					
	51 a	61	71	81 a bc	91	
Ratón	IDPANDNTIYD PKVQGKATMT ADTSSNTAYL QL SSLTSED TAVY YCT T					
	* * * * * * * * * * * * * * * * *					
Hum40	IDPANDNTIYD PKVQGRVTIT SDTSKNQVSL NLNSVTAADTAVY YCAA					
	* * * * * * * * * * * * * * * * *					
Hum2	-----RVTIT KDTSKNQVSL NLNSVTAADTAVY YCAR					
	103	111				
Ratón	SGYWFA YWGQGLVT VSA					
	* * * * * * * * * * * * * * * * *					
Hum40	SGYWFA YWGQGLVT VSS					
Hum2	-----WGQGLVT VSS					

Figura 7

Dominio V_H

	1	11	21	31	41
Ratón	EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHWMKQR PEQGLEW I GR				
	* * ** * *				
Hum50	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGFNIK DTYIHWVVRQA PGQGLEWVGR				
Hum1	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFS -----WVRQA PGQGLEWVG—				
	51 a	61	71	81 a bc	91
Ratón	IDPANDNTIYD PKVQGKATMT ADTSSNTAYL QLSSLTSED TAVY YCT T				
	** * ** *				
Hum50	IDPANDNTIYD PKVQGRVTM T ADTSTNTAYM ELSSLRSED TAVY YCAA				
	*				
Hum1	----- RVT MT ADTSTNTAYM ELSSLRSED TAVY YCAR				
	103	111			
Ratón	SGYWFA YWGQGLVT VSA				
	*				
Hum50	SGYWFA YWGQGLVT VSS				
Hum1	----- --WGQGLVT VSS				