



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 267**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 15/73** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05077948 .7**  
96 Fecha de presentación : **03.04.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1695985**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54 Título: **Procedimiento para la producción de anticuerpos humanizados mediante mutagénesis aleatoria.**

30 Prioridad: **07.04.1997 US 833504**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.06.2011**

73 Titular/es: **GENENTECH Inc.**  
**1 Dna Way**  
**South San Francisco, California 94080-4990, US**

72 Inventor/es: **Wells, James A.;**  
**Baca, Manuel y**  
**Presta, Leonard G.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 361 267 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

Procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados mediante mutagénesis aleatoria

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención está dirigida a procedimientos para preparar anticuerpos humanos. En particular, la presente invención está dirigida a procedimientos para preparar anticuerpos humanizados usando un sistema de presentación en fagos monovalente y de mutantes de anticuerpos producidos por mutagénesis aleatoria de un pequeño grupo de residuos estructurales críticos realizados en una sola región estructural humana. Más particularmente, esta invención está dirigida a la humanización de un anticuerpo murino que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los anticuerpos monoclonales (mAbs) tienen un potencial enorme como agentes terapéuticos, particularmente cuando se usan para regular sistemas definidos. Por ejemplo, en algunas circunstancias se podría desear regular un sistema, como por ejemplo la angiogénesis, en la que se forman vasos capilares nuevos a partir de las paredes de los vasos pequeños existentes. La angiogénesis generalmente es importante después de la aparición de una herida o de una infección ya que en los tejidos adyacentes a la lesión se puede estimular la inducción de crecimiento capilar. Sin embargo, la angiogénesis también es importante en el crecimiento tumoral, ya que, para un crecimiento continuado, un tumor debe inducir la formación de una red capilar que invada la masa tumoral.

[0003] Se han identificado determinados factores de crecimiento que regulan la angiogénesis. De particular interés es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que parece ser el agente por el cual algunos tumores adquieren su gran irrigación sanguínea. Molecular Biology of the Cell, 3rd Ed., Alberts et al., Garland Publishing, págs. 1154 (1994). Por lo tanto, los mAbs anti VEGF, por ejemplo, pueden ser útiles por un variedad de razones, incluyendo su uso en la regulación de la angiogénesis y más particularmente, como un agente antitumoral. Previamente se ha descrito un mAb A4.6.1 murino anti VEGF que bloquea la unión al receptor de VEGF. Se ha demostrado que este anticuerpo inhibe la señalización mitogénica. Kim y col., *Growth Factors* 7, 53 (1992); Kim y col., *Nature* 362, 841 (1993).

[0004] La mayoría de mAbs incluyendo el anti VEGF descrito anteriormente tienen un origen murino y otras fuentes no humanas, lo que limita la eficacia clínica. En particular, el cuerpo a menudo reacciona con una respuesta inmunogénica frente a los anticuerpos no humanos, en la que se elimina rápidamente el anticuerpo del sistema antes de que se produzca su efecto terapéutico. Además de la inmunogenicidad de los mAbs no humanos, que aparece cuando se administran a humanos, existen limitaciones adicionales debidas a la débil incorporación de función efectora.

[0005] Para sortear estas deficiencias, se pueden conferir las propiedades de unión antigénica de los mAbs no humanos a los anticuerpos humanos a través de un procedimiento conocido como "humanización" del anticuerpo. Un anticuerpo humanizado contiene la secuencia aminoacídica de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) (el centro de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo) del mAb no humano parental o correspondiente, *injertado* en la región estructural de un anticuerpo humano. Por lo tanto, la humanización de anticuerpos no humanos se conoce generalmente como injertos de CDR. El bajo contenido de secuencia no humana en tales anticuerpos humanizados (~5%) tiene una eficacia demostrada en la reducción de la inmunogenicidad y en la prolongación de la vida media sérica de los anticuerpos administrados a los humanos. Entre otros, los anticuerpos monoclonales humanizados ("inmunoglobulinas quiméricas") se describen en la patente de EE.UU. N° 4.816.567.

[0006] Desafortunadamente, la simple inserción de secuencias de CDR a menudo produce anticuerpos humanizados que se unen al antígeno de modo mucho más débil que el mAb parental no humano. Para restaurar la alta afinidad de unión, el anticuerpo debe atravesar procesos adicionales para ajustar la estructura de las hélices de unión al antígeno. Esto se logra reemplazando residuos clave en las regiones estructurales de los dominios variables del anticuerpo con la secuencia que encaje con la del anticuerpo murino parental. Estos residuos estructurales normalmente están implicados en el mantenimiento de la conformación de las hélices de CDR, aunque algunos residuos estructurales pueden contactar directamente con el antígeno. Se han realizado estudios que han evidenciado la importancia de determinados residuos estructurales para la conformación de las CDR y se ha recopilado una exhaustiva lista de todos los residuos estructurales que puedan afectar a la unión al antígeno.

Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 224, 487 (1992); Foote et al., *J. Mol. Biol.* 224, 489 (1992). La lista exhaustiva incluye unos treinta residuos "vernier" que pueden potencialmente contribuir a la estructura de las CDR. Aunque probablemente se produciría una mayor afinidad de unión al antígeno al cambiar todo el conjunto de residuos vernier de un anticuerpo humanizado de modo que encajara con la secuencia no humana parental correspondiente, esto no sería generalmente deseable debido a un aumento del riesgo de inmunogenicidad impuesta al añadir elementos adicionales de secuencia no humana. Así, desde un punto de vista terapéutico, es preferible limitar los cambios estructurales a un conjunto mínimo para obtener un anticuerpo humanizado de alta afinidad.

[0007] Por lo tanto, es deseable identificar un pequeño grupo de cambios que sean suficientes para optimizar la unión, sin embargo, se espera que los cambios requeridos difieran de un anticuerpo humanizado a otro. Para lograr el resultado deseado, un enfoque ha sido identificar la combinación adecuada de mutaciones construyendo un panel de mutaciones que tengan residuos estructurales "candidatos" reemplazados por sus homólogos murinos. Estas variantes se forman individualmente y se prueban con antígenos y después se combinan con otras variantes que tienen afinidades de unión favorables. Sin embargo, este procedimiento implica ciclos de mutagénesis dirigida individual, aislamiento y análisis y por lo tanto no es deseable ya que es una labor muy costosa y tediosa.

[0008] Para simplificar la humanización de anticuerpos, se han desarrollado varios enfoques diferentes. Véase, por ejemplo, Queen y col., *PNAS USA* 86, 10029(1989); Kettleborough et al., *Protein Eng.* 4,773(1991); Tempest et al., *Biotechnology* 9, 266 (1991); Padlan, *Mol. Immunol.* 28, 489 (1991); Roguska et al., *PNAS USA* 91, 969 (1994); Studnicka et al., *Protein Eng.* 7, 805 (1994); Allen et al., *J. Immunol.* 135, 368 (1985); Carter et al., *PNAS USA* 89,4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151, 2623 (1993); Eigenbrot et al., *Proteins* 18, 49 (1994); Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175, 217 (1992); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th), Public Health Service, NIH, Bethesda, MD (1991); Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271, 22611 (1996); WO-A-92/22653, GB-A-2 268 744, y WO 94/04679. El documento WO-A-92/22653 incluye una lista de sitios de mutación preferentes.

Es un objeto de la presente invención el proporcionar medios generales para seleccionar rápidamente mutaciones estructurales que mejoren la unión de anticuerpos humanizados a sus antígenos cognados en donde se eliminan los procedimientos actuales de optimización estructural basados en ciclos de mutagénesis dirigida individual y análisis.

[0009] Es además un objeto el proporcionar procedimientos rápidos de anticuerpos humanizantes que proporcionen anticuerpos con una baja inmunogenicidad y que utilicen una sola región estructural como respaldo.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCÓN

[0010] El anticuerpo humanizado inicial anti VEGF tiene una región estructural que deriva de secuencias de consenso para las subclases humanas más abundantes, a saber,  $V_L$ κ subgrupo I ( $V_L$ κI) y  $V_H$  subgrupo III ( $V_H$ III) en las que se injertan CDR de anticuerpos no humanos anti VEGF. La mutagénesis aleatoria de los residuos estructurales críticos en la construcción inicial produjo el anticuerpo humanizado anti VEGF descrito en la presente memoria descriptiva que tiene una afinidad por el antígeno 125 veces mayor en relación con el anticuerpo humanizado inicial sin cambios estructurales. Una sola mutación adicional produjo una mejora de seis veces en la unión. Este anticuerpo anti VEGF humanizado se puede reproducir por el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva o con técnicas recombinantes tradicionales dada la información de la secuencia ofrecida en la presente memoria descriptiva.

[0011] En la presente memoria descriptiva también se desvela un procedimiento tal como se define en la reivindicación 1 para producir e identificar rápidamente mutaciones estructurales que mejoren la capacidad de unión de los anticuerpos humanizados a sus antígenos cognados. Preferentemente, se injertan CDR no humanas en una región estructural  $V_L$ κI- $V_H$ III humana. También se realiza mutagénesis aleatoria de un pequeño grupo de residuos estructurales críticos seguida de una presentación monovalente de la genoteca resultante, de moléculas de anticuerpo en la superficie de un fago filamentoso. Las secuencias estructurales óptimas se identifican por selección basada en la afinidad. Opcionalmente, los anticuerpos seleccionados pueden sufrir mutaciones adicionales para reemplazar los residuos vernier situados en el interfaz  $V_L$ - $V_H$  por residuos que encajen con el anticuerpo no humano.

[0012] Los procedimientos descritos en la presente invención se pueden aplicar a cualquier anticuerpo no humano.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0013]

La figura 1 representa las secuencias aminoacídicas del A4.6.1 murino (Identificador de secuencia nº: 6 y 9 para los dominios  $V_L$  y  $V_H$ , respectivamente), A4.6.1 humanizado variante hu2.0 (Identificador de secuencia Nº: 7 y 10 para los dominios  $V_L$  y  $V_H$ , respectivamente), y A4.6.1 humanizado variante hu2.10 (Identificador de secuencia Nº: 8 y 11 para los dominios  $V_L$  y  $V_H$ , respectivamente). La numeración de las secuencias está según Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th), Public Health Service, NIH, Bethesda, MD (1991) y los errores se indican con asteriscos (A4.6.1 murino frente hu2.0) o flechas (hu2.0 frente hu2.10). La variante hu2.0 sólo contiene las secuencias CDR (negrita) del anticuerpo murino injertado en la cadena K ligera humana subgrupo I, región estructural de la cadena pesada subgrupo III. La variante hu2.10 es el clon humanizado consenso obtenido a partir de los experimentos de clasificación de fagos descritos en la presente memoria descriptiva.

La figura 2 representa los residuos estructurales objetivo de la aleatorización.

La figura 3 representa la construcción del fagémido para la presentación en superficie de las fusiones Fab-pIII en el fago. La construcción del fagémido codifica una versión humanizada del fragmento Fab para el anticuerpo A4.6.1 fusionado con una porción de la proteína de revestimiento del gen III del M13. La proteína de fusión está compuesta por la Fab unida al extremo carboxi terminal de la cadena pesada de un solo residuo de glutamina (a partir de la supresión de un codón ámbar en supE *E. coli*), y después la región C terminal de la proteína del gen III (residuos 249-406). La transformación en  $F^+$  *E.coli*, seguida de una superinfección con el fago adyuvante M13K07, produce partículas de fagémidos en las que una pequeña proporción de éstas contienen una sola copia de la proteína de fusión.

#### Descripción detallada de la invención:

##### A. Definiciones

[0014] Los "anticuerpos" (ABs) y las "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas con las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan una especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto a los anticuerpos como otras moléculas similares a los anticuerpos que carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de la última clase, por ejemplo, se producen a bajos niveles en el sistema linfático y a mayores niveles en los mielomas.

[0015] Los "anticuerpos nativos" y las "inmunoglobulinas nativas" son por lo general glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una pesada mediante un enlace covalente disulfuro, mientras que la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas con distintos isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro separados regularmente dentro de la cadena. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ) seguido de una cantidad de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable ( $V_L$ ) en un extremo y uno constante en el otro, el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que ciertos residuos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la pesada. Chothia y col., *J. Mol. Biol.* 186, 651 (1985); Foote y col., *J. Mol. Biol.* 82, 4592 (1985).

[0016] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en sus secuencias de un anticuerpo a otro y se utilizan para la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular con relación a su antígeno particular. De todos modos, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos, denominados "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) o "regiones hipervariables", de los dominios variables tanto de la cadena ligera como la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Cada dominio variable de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro FR que, en gran parte, adoptan una configuración de hoja- $\beta$ . Dichas FR están conectadas por tres CDR que crean hélices que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la hoja- $\beta$ . Las CDR de cada cadena están ancladas juntas y muy próximas a las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del centro de unión al antígeno de los anticuerpos. Kabat y col., citado con anterioridad. Los dominios constantes no participan directamente en el proceso de unión al antígeno de un anticuerpo, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0017] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos Fab, cada uno de ellos con un solo punto de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento  $F(ab)_2$  que tiene dos puntos de unión a antígeno y todavía es capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno.

[0018] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un punto completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región está compuesta por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un punto de unión a antígeno en la superficie del dímero  $V_H-V_L$ . Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. No obstante, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior que el punto de unión completo.

[0019] Un fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se da en la presente memoria descriptiva a los Fab' en que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes presenta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos  $F(ab')_2$  de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros emparejamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0020] Las cadenas ligeras de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0021] Según la secuencia aminoacídica del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a "clases" diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden seguir dividiéndose en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

[0022] El término "anticuerpo" se emplea en su sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales individuales (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab,  $F(ab)_2$ , y Fv), mientras muestren la actividad biológica deseada.

[0023] El término "anticuerpo monoclonal", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos salvo por posibles mutaciones espontáneas que puedan aparecer minoritariamente. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales convencionales (policlonales) que típicamente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de estar sintetizados en un cultivo de hibridoma y no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" revela la característica del anticuerpo que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como una indicación de que sea necesario producir el anticuerpo por algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que deben usarse de acuerdo con la presente invención pueden conseguirse por el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler y *col.*, *Nature*, 256:495 (1975), o con ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. N° 4.816.567).

[0024] Los anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" son anticuerpos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Patente de EE.UU. N° 4.816.567.

- [0025] Las formas "humanizadas" de anticuerpo no humanas (por ejemplo, murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (como Fv, Fab, Fab<sup>1</sup>, F(ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígenos) que contienen secuencias mínimas derivadas de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos por los residuos de la CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata o el conejo, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los estructurales Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o estructurales importadas. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar y optimizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables de al menos uno, y típicamente dos, en que todos, o sustancialmente todos, las regiones CDR correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR sean las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Óptimamente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente humana. Para más detalle véase: Jones y col., *Nature* 321, 522 (1986); Reichmann y col., *Nature* 332,323(1988);y Presta, *Curr.Op. Struct. Biol.* 2, 593 (1992).
- 20 [0026] "No inmunogénico en un humano" significa que después de entrar en contacto el anticuerpo humanizado en una cantidad terapéuticamente eficaz con el tejido apropiado de un humano, no se demuestra sustancialmente un estado de sensibilidad o resistencia frente al anticuerpo humanizado después de la administración.
- 25 [0027] Como se emplea en la presente memoria descriptiva, "factor de crecimiento celular del endotelio vascular" o "VEGF" se refiere a un factor de crecimiento en mamíferos como se define en la patente de EE.UU. 5.332.671, incluyendo la secuencia aminoacídica humana de la figura 1. La actividad biológica del VEGF nativo es compartida por cualquier análogo o variante suya que sea capaz de promover el crecimiento selectivo de las células endoteliales vasculares pero no de las células endoteliales corneales bovinas, células endoteliales del cristalino, células corticoadrenales, fibroblastos BHK-21 o queratinocitos, o que posee un inmunopéptido que sufre reacciones inmunológicamente cruzadas con el anticuerpo producido contra al menos un epítipo del VEGF nativo correspondiente.
- 30 [0028] La "mutagénesis dirigida" es una técnica habitual en la materia, y se realiza usando cebadores de oligonucleótidos sintéticos complementarios con la molécula de ADN fágico monocatenario que se va a mutar, pero que mantenga la complementariedad, que presente la mutación deseada. Brevemente, el oligonucleótido sintético se usa como cebador para dirigir la síntesis de una cadena complementaria a la del fago, y la molécula de DNA bicatenario se usa para transformar un bacteria hospedadora con un soporte fágico. Los cultivos de las bacterias transformadas se siembran en agar de calidad superior, permitiendo la formación de colonias a partir de células únicas que lleven el fago. Teóricamente, el 50% de las colonias nuevas contendrá el fago la forma mutada, monocatenaria; y el otro 50% tendrá la secuencia original. El ADN de las colonias se hibrida con el cebador sintético fosforilado a una temperatura que permita la hibridación de un apareamiento exacto, pero a la cual, las diferencias con la cadena original sean suficientes como para evitar la hibridación. Las colonias cuyo ADN hibride con la sonda, después se seleccionan y se cultivan, y se recupera el ADN.
- 35 [0029] "Sistema de expresión" se refiere a secuencias de ADN con una secuencia codificadora deseada y secuencias de control enlazadas operativamente, de modo que los hospedadores transformados con estas secuencias sean capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, se puede incluir el sistema de expresión en un vector; sin embargo, el ADN pertinente también se puede integrar en el cromosoma del hospedador.
- 40 [0030] Como se usa en la presente memoria descriptiva, "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las denominaciones que incluyan progenie. Así, "transformantes" o "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de ésta independientemente del número de transferencias. Se entiende además que puede que no toda la progenie sea precisamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que tenga la misma funcionalidad que la analizada en la célula originalmente transformada. Cuando se empleen denominaciones distintas, se hará claramente fuera de contexto.
- 45 [0031] Los "plásmidos" se nombran con una p minúscula precedida y/o seguida de letras en mayúsculas y números. Los plásmidos de inicio en la presente memoria descriptiva están disponibles comercialmente si ningún

tipo de restricción, o se pueden construir a partir de plásmidos disponibles según los procedimientos publicados. Adicionalmente, en la técnica se conocen otros plásmidos equivalentes que son aparentes para cualquier experto en la materia.

5 [0032] “Afinidad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único centro de unión de un anticuerpo y un solo epítipo. Los anticuerpos de baja afinidad se unen débilmente al antígeno y tienden a disociarse con facilidad, mientras que los anticuerpos de gran afinidad se unen más estrechamente al antígeno y permanecen unidos más tiempo.

10 [0033] “Transformación” significa introducir ADN en un organismo de modo que el ADN se pueda replicar, ya sea como un elemento extracromosómico como por integración cromosómica. Dependiendo de la célula hospedadora empleada, la transformación se realiza usando técnicas habituales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110 (1972) y Mandel y col., *J. Mol. Biol.* 53, 154 (1970), se usa generalmente con procariontes u otras células que contienen una pared celular considerable. Para las células de mamífero sin dichas paredes celulares, se prefiere el método Graham y van der Eb de precipitación con fosfato de calcio *Virology* 52, 456 (1978). Axel describió los aspectos generales de las transformaciones en sistemas hospedadores de células de mamífero en la patente de EE.UU. N° 4.399.216, concedida el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo generalmente siguiendo el método de Van Solingen y col., *J. Bact.* 130, 946 (1977) y Hsiao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3829 (1979). Sin embargo, se pueden usar otros procedimientos para introducir el ADN en las células, como por ejemplo la inyección nuclear, la electroporación o la fusión con protoplastos.

25 [0034] La “recuperación” o el “aislamiento” de un fragmento de ADN a partir de la digestión de ADN, significa la separación de la digestión por electroforesis en un gel de poliacrilamida o de agarosa, la identificación del fragmento de interés comparando su movilidad electroforética en relación a los fragmentos de ADN de los marcadores de peso molecular conocido, el aislamiento de la sección del gel que contiene el fragmento deseado y la extracción del ADN del gel. Este procedimiento se conoce generalmente. Véase por ejemplo, Lawn y col., *Nucleic Acids Res.* 9, 6103 (1981) y Goeddel y col., *Nucleic Acids Res.* 8, 4057 (1980).

30 [0035] “Ligación” se refiere al procedimiento por el cual se forman enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de cadena doble. A menos que se indique lo contrario, la ligación se puede realizar usando tampones y condiciones conocidas con 10 unidades de la ADN ligasa del T4 (“ligasa”) por cada 0,5 mg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN que se van a ligar.

35 [0036] El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora enlazada operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un centro de unión a ribosomas, y posiblemente, otras secuencias aún menos conocidas. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

40 [0037] Un ácido nucleico está “enlazado operativamente” o “enlazado funcionalmente” cuando se coloca funcionalmente a continuación de otra secuencia nucleotídica. Por ejemplo, se enlaza operativamente el ADN de una presecuencia de una secuencia líder de secreción al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador están enlazados operativamente a una secuencia codificadora si afectan a la transcripción de la secuencia; o se enlaza operativamente un centro de unión a ribosomas a una secuencia codificadora si se coloca de modo que facilita la traducción. Generalmente, “enlazado operativamente” o “enlazado funcionalmente” significa que las secuencias de ADN que se están enlazando son contiguas y, en el caso de una secuencia líder de secreción, contigua y en pauta de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace está acompañado de una ligación en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o ligadores según la práctica habitual.

55 [0038] Como se emplea en la presente memoria descriptiva “enumerado representativamente” se refiere al número de la posición de un residuo en una secuencia particular y los números de posición correspondientes en diferentes secuencias. Los números de posición correspondientes son aquellas posiciones dentro de una secuencia, generalmente secuencias estructurales de anticuerpos humanos, que son funcionalmente equivalentes a la posición enumerada representativamente cuando se usan en la construcción de un anticuerpo humanizado.

60 [0039] Normalmente, los términos “aminoácido” y “aminoácidos” se refieren a todos los L- $\alpha$ -aminoácidos naturales. En algunas formas de realización, sin embargo, puede haber presentes D-aminoácidos en los

polipéptidos o péptidos de la presente invención para facilitar la restricción conformacional. Los aminoácidos se identifican con una sola letra o con denominaciones de tres letras.

Asp	D	ácido aspártico	Ile	I	Isoleucina
Thr	T	treonina	Leu	L	Leucina
Ser	S	Serina	Tyr	Y	Tirosina
Glu	E	Ácido glutámico	Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina	His	H	Histidina
Gly	G	Glicina	Lys	K	Lisina
Ala	A	Alanina	Arg	R	Arginina
Cys	C	cisteína	Trp	W	Triptófano
Val	V	Valina	Gln	Q	Glutamina
Met	M	metionina	Asn	N	asparagina

5 [0040] El término "variante de secuencia aminoacídica" se refiere a moléculas con diferencias en sus secuencias aminoacídicas en comparación con una secuencia aminoacídica nativa.

10 [0041] Las variantes por sustitución son en las que al menos se elimina un residuo aminoacídico de una secuencia nativa y se inserta un aminoácido diferente su lugar y en la misma posición. Las sustituciones pueden ser únicas, en las que sólo se sustituye un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, en las que se sustituyen dos o más aminoácidos en la misma molécula.

15 [0042] La hibridación se realiza preferentemente bajo "condiciones restrictivas" que significa (1) emplear durante los lavados una concentración iónica baja y una alta temperatura, por ejemplo, cloruro de sodio 0,015 M / citrato de sodio 0,0015 / dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50 °C, o (2) emplear durante la hibridación un agente desnaturante, como por ejemplo formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0,1% de polivinilpirrolidona / tampón de fosfato de sodio 50 nM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C. Otro ejemplo es usar 50% de formamida, SSC X5 (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6/8), pirofosfato de sodio al 0,1%, solución de Denhardt X5, ADN de esperma de salmón  
20 sometido a ultrasonidos (50 µg/ml), 0,1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC X0,2 y 0,1% de SDS. Otro ejemplo diferente es la hibridación usando un tampón de sulfato de dextrano al 10%, SSC X2 (cloruro de sodio / citrato de Sodio) y 50% de formamida a 55 °C, seguida de lavados en condiciones altamente restrictivas compuestos por SSC X0,1 con EDTA a 55 °C. Cuando se proporciona una secuencia nucleotídica de una molécula de ácido nucleico, dentro del alcance de la secuencia se consideran otras  
25 moléculas de ácido nucleico que también hibriden bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

30 [0043] Cuando se describen secuencias aminoacídicas, se sobreentiende que esas mismas secuencias pueden ser reproducidas reconstruyendo la secuencia aminoacídica sintéticamente o por mutación. Alternativamente, se entiende que se pueden usar técnicas recombinantes mientras se recupere la molécula de ADN que codifica las secuencias aminoacídicas. El ADN se recupera formando una genoteca con el ADN que codifica las secuencias aminoacídicas deseadas. Las sondas se generan después basándose en las secuencias aminoacídicas. Después se aísla el ADN que hibrida con la sonda y se analiza para determinar si el producto codificado por el ADN es el producto deseado. Generalmente, las células se transforman con el ADN (o el ARN) y se realizan estudios de expresión.

35

#### B. Metodología general para humanizar anticuerpos

40 [0044] Los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden usar para humanizar cualquier anticuerpo. Similarmente, se entiende que el anticuerpo humanizado específicamente descrito en la presente memoria descriptiva, anti VEGF humanizado, se puede reproducir mediante los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva o con técnicas de ADN recombinante tradicionales. Específicamente, ya que las mutaciones en residuos estructurales críticos están descritas en la presente memoria descriptiva, el anticuerpo humanizado se puede reproducir para que tenga las mismas mutaciones sin ser reproducido usando el sistema de presentación en fagos monovalentes. Más bien, el ADN que codifica las secuencias aminoacídicas descritas se  
45 puede sintetizar o reproducir con técnicas de ADN recombinante tradicionales. Después se expresa el producto del ADN, se identifica y se recupera. Alternativamente, se puede realizar mutagénesis dirigida sobre el anticuerpo por procedimientos conocidos en la técnica, o se puede sintetizar el anticuerpo de modo que tengas las mutaciones descritas en la presente memoria descriptiva.

[0045] Un procedimiento particularmente preferente para producir los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria descriptiva implica los siguiente: preparando un vector fagémido con el anticuerpo para la presentación monovalente de fragmentos Fab que tengan transplantadas secuencias CDR por mutagénesis dirigida en un vector que codifica la Fd de la cadena ligera humana y de la cadena pesada humana  $V_{HIII-C_{H1}Y}$ ;

- 5 construyendo una genoteca de fagémidos con el Fab del anticuerpo para mutagénesis aleatoria de un pequeño grupo de residuos estructurales críticos; expresando y purificando los fragmentos Fab humanizados; seleccionando las variantes Fab humanizadas y determinando las afinidades de unión. Estos pasos no tienen porqué realizarse en un orden particular. Estos pasos se describen específicamente a continuación en el “ejemplo específico” pero generalmente se realizan del siguiente modo:

10

*Preparación de un vector fagémido con el anticuerpo para presentación monovalente de fragmentos Fab.*

[0046] Primero se selecciona un anticuerpo que se vaya a humanizar y se identifican las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las secuencias CDR del anticuerpo se pueden identificar según la definición de secuencia de Kabat y col., citado con anterioridad. Las secuencias de las CDR se transplantan por mutagénesis dirigida a un vector que codifica las Fd de la cadena ligera  $V_{L\kappa I-C_{\kappa 1}}$  humana y de la cadena pesada  $V_{HIII-C_{H1}Y}$  humana. La secuencia que codifica el fragmento Fab se puede subclonar en un vector fagémido. Esta construcción codifica un anticuerpo humanizado inicial en el que el extremo C terminal de la cadena pesada se fusiona precisamente con el extremo carboxilo de la proteína de revestimiento de un fago. Preferentemente, se selecciona un vector fagémido que proporcione la expresión de ambas cadenas, la pesada y la ligera, fusionadas con el gen III en cepas supresoras *supE* de *E. coli*.

15

20

*Construcción de una genoteca de fagémidos con el Fab del anticuerpo*

25

[0047] Basándose en los resultados acumulados para humanizar varios anticuerpos no humanos en una región estructural  $V_{L\kappa I-V_{HIII}}$  humana, se consideró que los cambios estructurales requeridos para optimizar la capacidad de unión al antígeno estaban limitados a un subgrupo de los residuos. Véase, Carter et al., *PNAS USA* 89, 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151, 2623 (1993); Eigenbrot et al., *Proteins* 18, 49-62 (1994); Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175, 217 (1992). Por consiguiente, se seleccionó un novedoso grupo de residuos para la aleatorización.

30

La aleatorización de estos residuos estructurales clave identificados proporciona la genoteca deseada de variantes Fab que se van a presentar en la superficie del fago filamentosos. Específicamente, se seleccionaron los residuos  $V_{L\kappa 4}$  y 71 y los residuos  $V_{HIII}$  24, 37, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78, 93 y 94 como residuos estructurales clave importantes para la capacidad de unión al antígeno y fueron el objetivo de la aleatorización.

35

*Expresión y purificación de los fragmentos Fab humanizados*

[0048] Se conocen varios procedimientos en la técnica para expresar y purificar fragmentos. Como se ha descrito en la presente memoria descriptiva, se transformó una cepa 34B8 de *E. coli* no supresora, con el fagémido pMB419, o con sus variantes. Las bacterias individuales crecieron durante la noche a 37 °C en 5 ml de 2YT con 50  $\mu$ g/ml de carbenicilina. Estos cultivos se diluyeron en 200 ml de medio AP5 descrito en Chang y col., con 20  $\mu$ g/ml de carbenicilina y se incubaron durante 26 horas a 30 °C. Las células se centrifugaron a 4000 x g, se tiró el sobrenadante, y el sedimento se congeló a -20 °C durante al menos 2 horas. Los sedimentos celulares se resuspendieron después en 5 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7.6) con EDTA 1 mM, se agitaron a 4 °C durante 90 minutos y se centrifugaron a 10.000 xg durante 15 minutos. Se añadió el sobrenadante a 1 ml de columna de proteína G-SEFAROSA (una columna producida por Pharmacia) y se lavó con 10 ml de MES 10 mM (pH 5,5). El fragmento Fab unido se eluyó con 2,5 ml de ácido acético 100 mM y se neutralizó inmediatamente con 0,75 ml de Tris HCl 1 M, pH 8,0. Se cambió el tampón de las preparaciones de Fab por PBS y se concentraron usando concentradores CENTRICON-30 (producidos por Amicon). Las producciones típicas de Fab fueron de aproximadamente 1 mg/l de cultivo, después de la purificación con la proteína G. Las muestras de Fab purificadas se caracterizaron con espectrometría de masas con electronebulización, y las concentraciones se determinaron por análisis aminoacídico.

40

45

50

*Selección de las variantes Fab humanizadas*

55

[0049] Se reviste una placa de microvaloración con el antígeno etiquetado y purificado. Se desecha la solución de revestimiento, se bloquean los pocillos y se añade la solución madre del fagémido. Después de un periodo de tiempo, se lavan los pocillos y se eluye y titula el fago que se ha unido. Los fagos restantes eluidos del pocillo recubierto con VEGF se propagan para el uso en el siguiente ciclo de selección. Este procedimiento se puede repetir varias veces para obtener el número de clones deseado. Por ejemplo, se pueden seleccionar y secuencias

unas pocas docenas de clones individuales.

*Determinación de las afinidades de unión a VEGF*

- 5 [0050] Se miden las constantes de asociación y disociación de la unión de las variantes humanizadas al VEGF. Se analizan los perfiles de unión y se seleccionan las variantes que muestran las mayores afinidades.

*Administración del anticuerpo anti VEGF humanizado*

- 10 [0051] La administración del anticuerpo anti VEGF humanizado se puede extrapolar a partir de los datos presentados en el anticuerpo anti VEGF murino descrito en Kim y col., *Growth Factors* 7, 53 (1992); Kim et al., *Nature* 362, 841 (1993). En particular, Kim y col., demuestran que la administración de una cantidad tan pequeña como 10 µg dos veces a la semana de un anticuerpo anti VEGF tuvo como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral. Los efectos máximos se lograron con dosis de anticuerpo de 50-100 µg.

- 15 [0052] El siguiente ejemplo pretende solamente ilustrar el mejor modo conocido actualmente para practicar la invención pero no se considera que la invención esté limitada a los detalles de este ejemplo.

Ejemplo específico I

20

Construcción de un vector fagémido y el anticuerpo anti VEGF humanizado inicial

- [0053] El mAb murino anti VEGF A4.6.1 ha sido previamente descrito por Kim y col., *Growth Factors*, 7, 53 (1992); Kim y col., *Nature*, 362, 841 (1993). La primera variante Fab del A4.6.1 humanizado, hu2.0, se construyó por mutagénesis dirigida usando un molde con desoxiuridina del plásmido pAK2 que codifica el fragmento Fd de una cadena ligera  $V_{L\kappa I-C\kappa I}$  humana y una cadena pesada  $V_{HIII-C_{H1}\gamma I}$  humana. Carter y col., *PNAS USA* 89, 4285 (1992). Las secuencias CDR A4.6.1 transplantadas se escogieron según la definición de secuencia de Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immuno-logical Interest* (5th), Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), salvo para la CDR-H1 que se amplió para que incluyera tanto la definición de secuencia como de estructural, a saber,  $V_{H}$  residuos 26-3 5, Chothia y col., *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1987). La secuencia que codifica el fragmento Fab se subclonó en el vector fagémido pHGHamg3. Bass and Wells, *Proteins*, 8, 309 (1990); Lowman y col., *Biochem.* 30, 10832 (1991). Esta construcción, pMB4-19, codifica el Fab A4.6.1 humanizado inicial, hu2.0, con el extremo C terminal de la cadena pesada fusionada precisamente al el extremo carboxilo de la proteína de revestimiento del gen III de M13. pMB4-19 es una construcción similar a pDH188, un plásmido previamente descrito para la presentación monovalente de fragmentos Fab. Garrard y col., *Biotechn.* 9: 1373-1377 (1991). Existen notables diferencias entre el pMB4-19 y el pDH188 que incluyen un segmento del gen III de M13 más corto (codones 249-406) y el uso de un codón de parada ámbar justo detrás del fragmento Fd de la cadena pesada del anticuerpo. Esto permite la expresión de la cadena pesada secretada y de las fusiones cadena pesada-gen III en cepas de supresoras *supE* de *E. coli*.

40

[0054] En la figura 1 se muestra el fragmento Fab A4.6.1 humanizado (hu2.0) en el que se injertaron las CDR del A4.6.1 en una región estructural  $V_{L\kappa I}-V_{HIII}$  humana. El dominio  $V_{L}$  de hu2.0 está expuesto en el Identificador de secuencia N°: 7 y el dominio  $V_{H}$  de hu2.0 está expuesto en el Identificador de secuencia N°: 10.

- 45 [0055] El resto de residuos que no sean las CDR injertadas se mantuvieron como en la secuencia humana. La capacidad de unión de este anticuerpo humanizado inicial a VEGF fue tan débil que no se pudo detectar. Basándose en la afinidad relativa de otras variantes A4.6.1 humanizadas con una débil capacidad de unión (datos no mostrados), la  $K_D$  para la capacidad de unión de hu2.0 se estimó en  $>7 \mu M$ . Esto contrasta con una afinidad de 1,6 nM para una construcción de Fab quimérica compuesta por los dominios  $V_L$  y  $V_H$  intactos de un A4.6.1 murino
- 50 y de dominios constantes humanos. De este modo, la capacidad de unión de hu2.0 a VEGF fue de al menos 4000 veces menos que la de la quimera.

Diseño de una genoteca de fagémidos con Fab anti VEGF

- 55 [0056] El grupo de cambios estructurales necesarios para optimizar la capacidad de unión al antígeno usando una región estructural humana  $V_{L\kappa I}-V_{HIII}$  se seleccionó como se muestra en la tabla 1 y en la figura 2. La genoteca de fagémidos del A4.6.1 humanizado se construyó por mutagénesis dirigida según el método de Kunkel y col., *Methods Enzymol.* 204, 125 (1991). Se preparó un derivado del pMB4-19 con tripletes de parada TAA en los

codones de V<sub>H</sub> 24, 37, 67 y 93 para usar como molde de la mutagénesis (todas las numeraciones de secuencia están según Kabat y col., citado con anterioridad). Esta modificación se realizó para evitar una posterior contaminación de fondo por secuencias silvestres. Los codones diana para la aleatorización fueron el 4 y el 71 (cadena ligera) y 24, 37, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78, 93 y 94 (cadena pesada).

5

Tabla 1

Residuos estructurales clave importantes para la unión al antígeno y dianas de la aleatorización				
Residuo Estructura		Residuo humano consenso V <sub>KLI</sub> , V <sub>HIII</sub>	Residuo A4.6.1 murino	Randomización <sup>a</sup>
V <sub>L</sub>	4	Met	Met	Met, Leu
	71	Phe	Tyr	Phe, Tyr
V <sub>H</sub>	24	Ala	Ala	Ala, Val, Thr
	37	Val	Val	Val, Ile
	67	Phe	Phe	Phe, Val, Thr, Leu, Ile, Ala
	69	Ile	Phe	Ile, Phe
	71	Arg	Leu	Arg <sup>b</sup> , Leu <sup>b</sup>
	73	Asp	Thr	Asp <sup>b</sup> , Thr <sup>b</sup>
	75	Lys	Ala	Lys <sup>b</sup> , Ala <sup>b</sup>
	76	Asn	Ser	Asn <sup>b</sup> , Ser <sup>b</sup>
	78	Leu	Ala	Leu, Ala, Val, Phe
	93	Ala	Ala	Ala, Val, Leu, Ser, Thr
	94	Arg	Lys	Arg, Lys

10

<sup>a</sup> Diversidad aminoacídica en la genoteca de fagémidos

<sup>b</sup> V<sub>H</sub> 71, 73, 75, 76 aleatorizados para producir todos los tetrámeros V<sub>H</sub>III murinos (L71/T73/A75/S76) o todos los humanos (R71/D73/K75/N76).

15

[0057] Una preocupación en el diseño de la genoteca de fagémidos del A4.6.1 humanizado fue que los residuos diana para la aleatorización estaban muy distribuidos por las secuencias V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>. Las limitaciones en la longitud de los oligonucleótidos sintéticos hacen que la aleatorización simultánea de cada una de estas posiciones estructurales se pueda lograr solamente mediante el uso de múltiples oligonucleótidos. Sin embargo, como el número total de oligonucleótidos aumenta, la eficacia de la mutagénesis disminuye (es decir, la proporción de los mutantes obtenidos que incorporan la secuencia derivada de todos los oligonucleótidos mutagénicos). Para sortear este problema, se incorporaron dos características en la construcción de la genoteca. Lo primero fue preparar cuatro moldes distintos para la mutagénesis que codificaran cada una de las posibles combinaciones estructurales V<sub>L</sub>. Esto fue sencillo de hacer dada la limitada diversidad de la región estructural de la cadena ligera (sólo 4

20

25

secuencias diferentes), pero fue muy beneficioso porque eliminó la necesidad de dos oligonucleótidos de la estrategia de mutagénesis. En segundo lugar, se prepararon dos oligonucleótidos de 126 bases a partir de fragmentos sintéticos más pequeños. Esto permitió la aleatorización de los codones de V<sub>H</sub> 67, 69, 71, 73, 75, 76, 93 y 94 con un solo pero largo oligonucleótido en lugar de con dos más pequeños. Por lo tanto, en la estrategia de mutagénesis por aleatorización final se emplearon sólo dos oligonucleótidos simultáneamente sobre los cuatro moldes diferentes.

30

[0058] Más específicamente, para aleatorizar los codones de la cadena pesada 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78, 93 y 94 con un solo oligonucleótido mutagénico primero se prepararon dos oligonucleótidos de 126 mer a partir de fragmentos de 60 y 66 mer por ligación enzimática sobre el molde. Específicamente, se combinaron 1,5 nmol del oligonucleótido fosforilado 5' GAT TTC AAA CGT CGT NYT ACT WTT TCT AGA GAC AAC TCC AAA AAC ACA BYT TAC CTG CAG ATG AAC (Identificador de secuencia N°: 12) o GAT TTC AAA CGT CGT NYT ACT WTT TCT TTA GAC ACC TCC GCA AGC ACA BYT TAC CTG CAG ATG AAC (Identificador de secuencia N°: 1) con 1,5 nmol de AGC CTG CGC GCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAC TGT DYA ARG TAC CCC CAC TAT TAT GGG (Identificador de secuencia N°: 2). Los codones aleatorizados están subrayados y N representa A/G/ T/C; W representa A/T; B representa G/T/C; D representa G/A/T; R representa A/G; e Y representa C/T ("/" representa "o"). Después, 1,5 nmol del oligonucleótido molde CTC AGC GCG CAG GCT GTT CAT CTG CAG GTA (Identificador

35

40

- de secuencia N°: 3), con una secuencia complementaria a los extremos 5' de los Identificadores de secuencia N°: 12 y 1 y se añadió el extremo 3' del Identificador de secuencia N°: 3 para hibridar con cada extremo de la ligación. A esta mezcla, se añadió Taq ligasa (ligasa termoestable de New England Biolabs) y tampón, y la reacción se sometió a 40 ciclos térmicos (95 °C durante 1,25 minutos y 50 °C durante 5 minutos) para establecer ciclos del oligonucleótido molde entre las uniones ligadas y las no ligadas. Los productos de oligonucleótidos de 126 mer se purificaron en un gel de poliacrilamida con 6% de urea/TBE y se extrajeron de la poliacrilamida a tampón. Los dos productos de 126 mer se combinaron en una proporción igual con etanol, se precipitaron y se solubilizaron en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM. El producto mezcla de oligonucleótido de 126 mer se etiquetó 504-01.
- 10 [0059] De este modo, la aleatorización de los codones estructurales ( $V_L$  4, 71;  $V_H$  24, 37, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 93, 94) se efectuó en dos etapas. La primera, la aleatorización  $V_L$  se logró preparando tres derivados adicionales del molde pMB4-19 modificado. Los codones estructurales 4 y 71 de la cadena ligera se reemplazaron individualmente o por pares usando dos oligonucleótidos mutagénicos GCT GAT ATC CAG TTG ACC CAG TCC CCG (Identificador de secuencia N°: 13) y TCT GGG ACG GAT TAC ACT CTG ACC ATC (Identificador de secuencia N°: 4). Se preparó un molde que contiene desoxiuridina para cada uno de estos nuevos derivados. Junto con el molde original, estas cuatro construcciones codificaron cada una de las cuatro posibles combinaciones de secuencias estructurales de la cadena ligera (véase la tabla 1).
- 15 [0060] Los oligonucleótidos 504-01, la mezcla de dos oligonucleótidos de 126 mer, y CGT TTG TCC TGT GCA RYT TCT GGC TAT ACC TTC ACC AAC TAT GGT ATG AAC TGG RTC CGT CAG GCC CCG GGT AAG (Identificador de secuencia N°: 5) se usaron para aleatorizar los codones estructurales de la cadena pesada usando cada uno de los cuatro moldes como se describe. Se electroporaron las cuatro genotecas en células de *E. coli* XL-1 BLUE (células marcadoras producidas por Stratagene) y se combinaron. El número total de transformantes independientes fue aproximadamente de  $>1,2 \times 10^8$ , aproximadamente 1.500 veces superior al número máximo de secuencias de ADN de la genoteca.
- 20 [0061] A partir de esta estrategia, cada uno de los residuos 4 y 71 de la cadena ligera y los 24, 37, 67, 78 y 93 de la cadena pesada se aleatorizaron parcialmente para permitir la selección de la secuencia del A4.6.1 murino de la secuencia  $V_{L\text{kl-V}_H\text{III}}$  humana, u otras secuencias frecuentemente encontradas en otras regiones estructurales humanas y murinas (tabla I). Nótese que la aleatorización de estos residuos no se limitó a la elección entre las secuencias estructurales consenso  $V_{L\text{kl-V}_H\text{III}}$  humana o A4.6.1. Más bien, la inclusión de aminoácidos adicionales comúnmente presentes en otras secuencias estructurales humanas y murinas ofrece la posibilidad de que una diversidad adicional pueda conducir a la selección de un número mayor de variantes funcionales.
- 30 [0062] Alguno de los residuos estructurales de la cadena pesada fueron aleatorizados de modo binario según las secuencias estructurales  $V_H\text{III}$  humana y A4.6.1 murina. Los residuos de  $V_H$  71, 73, 75 y 76 se colocan en una horquilla junto al centro de unión al antígeno. Las cadenas laterales de  $V_H$  71 y 73 están ampliamente ocultas por las estructuras canónicas del anticuerpo y su papel potencial en el mantenimiento de la conformación de las CDR-H2 y CDR-H3 es muy conocido. Kettleborough y col., *Protein Eng.* 4, 773 (1991); Carter y col., *PNAS USA* 89, 4285 (1992); Shalaby y col., *J. Exp. Med.* 175, 217 (1992). Por otro lado, aunque las cadenas laterales de  $V_H$  75 y 76 están muy expuestas (figura 2), sin embargo, no se ha comprobado que estos dos residuos puedan influir además en la capacidad de unión al antígeno (Eigenbrot, *Proteins* 18, 49 [1994]), presumiblemente debido al contacto directo con el antígeno en algunos complejos anticuerpo-antígeno. Debido a su proximidad en la secuencia y a la posible interdependencia, se aleatorizaron  $V_H$  71, 73, 75 y 76 en bloque de modo que sólo se podrían seleccionar dos combinaciones posibles de estos tetrámeros; todas las secuencias  $V_H\text{III}$  humanas o A4.6.1 murinas. Finalmente, se aleatorizaron los residuos de  $V_H$  69 y 94, pero sólo para representar las secuencias  $V_H\text{III}$  y A4.6.1. Los residuos de  $V_H$  69 y 94 no se reemplazaron en previas humanizaciones de anticuerpos, pero porque diferían entre las secuencias consenso  $V_H\text{III}$  y A4.6.1 (figura 1) y como se observó que eran potencialmente importantes para la conformación de la región CDR (Foote y col., *J. Mol. Biol.* 224, 487 [1992]), se incluyeron en esta estrategia de aleatorización.
- 40
- 45
- 50

#### Genoteca del Fab A4.6.1 humanizados presentado en la superficie del fagémido

- 55 [0063] Se ha desarrollado una variedad de sistemas para la presentación funcional de fragmentos de anticuerpos en la superficie del fago filamentoso. Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.* 12, 433 (1994). Estos incluyen la presentación de fragmentos Fab o de una sola cadena Fv (scFv) como fusiones con las proteínas de revestimiento del gen III o del gen VIII del bacteriófago M13. El sistema seleccionado en la presente memoria descriptiva es

similar al descrito en Garrard y col., *Biotechn.* 9, 13 73 (1991) en el que se presenta monovalentemente un fragmento Fab como una fusión con el gen III (figura 3). Este sistema tiene dos características destacables. En particular, a diferencia de los scFvs, los fragmentos Fab no tienen tendencia a formar especies diméricas, la presencia de las cuales puede impedir la selección de los anticuerpo con mayor fuerza de unión a debido a efectos de la avidéz. Adicionalmente, la monovalencia de la proteína presentada elimina una segunda fuente potencial de efectos de avidéz que de otro modo podrían resultar de la presencia de copias múltiples de una proteína en cada partícula de fagémido. Bass y Wells, *Proteins* 8, 309 (1990); Lowman y col., *Biochemistry* 30, 10832 (1991).

[0064] Las partículas de fagémidos que presentan los fragmentos Fab A4.6.1 humanizados se propagaron en células *E. coli* XL-1 Blue. Brevemente, las células que llevan la construcción pMB4-19 aleatorizada crecieron durante la noche a 37 °C en 25 ml de medio 2YT con carbenicilina 50 µg/ml y aproximadamente 10<sup>10</sup> fagos adyuvantes M13KO7 (Viera y Messing, *Methods Enry-mol.* 153,3[1987]). La solución madre de fagémidos se purificarón a partir de los sobrenadantes del cultivo precipitando con una solución salina de polietilenglicol, y se resuspendió en 100 µl de PBS (aproximadamente 10<sup>14</sup> fagémido/ml)

Selección de las variantes Fab A4.6.1 humanizadas

[0065] Se revistieron el pocillo de una placa de microtitulación con VEGF<sub>121</sub> purificado durante toda la noche a 4 °C. La solución de revestimiento se desechó y este pocillo y uno sin recubrir se bloquearon con un 6% de leche desnatada durante 1 hora y se lavó con PBS que contenía un 0,05% de TWEEN-20™ (detergente). Entonces, se añadieron a cada pocillo 10 µl de la solución madre de fagémidos, diluidos hasta 100 µl con Tris 20 mM (pH 7,5) con 0,1% de BSA (seroalbúmina bovina) y 0,05% de TWEEN-20™. Después de 2 horas, se lavaron los pocillos y se eluyó el fago unido con 100 µl de glicina 0,1 M (pH 2,0) y se neutralizó con 25 µl de Tris 1 M pH 8,0. Se usó una alícuota para valorar el número de fagos eluidos. Los fagos restantes eluidos del pocillo recubierto con VEGF se propagan para el uso en el siguiente ciclo de selección. Se realizaron un total de 8 ciclos de selección después de los cuales se seleccionaron 20 clones individuales y se secuenciaron (Sanger y col., *PNAS USA* 74, 5463 [1977]).

[0066] Se seleccionaron de este modo las variantes de la genoteca de fagémidos con el Fab A4.6.1 humanizado basándose en la capacidad de unión a VEGF. El enriquecimiento de fagémidos funcionales, medido comparando las valoraciones de fagos eluidos del pocillo recubierto con VEGF de la placa de microtitulación en comparación con el pocillo sin recubrir, se aumentó hasta el séptimo ciclo de cribado de afinidad. Después de u ciclo adicional de clasificación, se secuenciaron 20 clones para identificar los residuos estructurales preferentes seleccionados en casa posición aleatorizada. Estos resultados, resumidos en la tabla 2, revelaron un fuerte consenso entre los clones seleccionados. Diez de los veinte clones tenían una secuencia de ADN idéntica, denominada hu2.10. De las trece posiciones estructurales aleatorizadas, se seleccionaron ocho sustituciones en el hu2.10 (V<sub>L</sub> 71; V<sub>H</sub> 37, 71, 73, 75, 76, 78 y 94). De modo interesante, los residuos V<sub>H</sub> 37 (Ile) y 78 (Val) no como la secuencia V<sub>H</sub>III humana o la A4.6.1 murina. Este resultado sugiere que algunas posiciones estructurales se pueden beneficiar de ampliar la diversidad de secuencias estructurales más allá de la humana diana y la murina parental.

Tabla 2: Secuencias seleccionadas de la genoteca Fab de fagémidos con A4.6.1 humanizado

Variante	Substituciones de residuos													
	V <sub>L</sub>		V <sub>H</sub>											
	4	71	24	37	67	69	71	73	75	76	78	93	94	
A4.6.1 murino	M	Y	A	V	F	F	L	T	A	S	A	A	K	
hu2.0 (CDR-injerto)	M	F	A	V	F	I	R	N	K	N		A	R	

Clones de fagos  
seleccionados:  
hu2.1 (2)

hu2.1 (2)	-	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	V	-	K
hu2.2 (2)	L	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	V	-	K
hu2.6 (1)	L	-	-	I	T	-	L	T	A	S	V	-	K
hu2.7 (1)	L	-	-	I	T	-	-	-	-	-	V	-	K
hu2.10(10)	-	Y	-	I	-	-	L	T	A	s	V	-	K

Las diferencias entre los anticuerpos hu2.0 y el A4.6.1 murino están subrayadas. El número de clones idénticos identificados para cada secuencia de fago seleccionada se indica entre paréntesis. Los guiones en las secuencias de los clones seleccionados indican la selección de la región estructural V<sub>L</sub>KI-V<sub>H</sub>III humana (es decir, como en hu2.0).

5

[0067] Hubo otras cuatro secuencias aminoacídicas únicas entre los diez clones restantes analizados: hu2.1, hu2.2, hu2.6 y hu2.7. Todos estos clones, además del hu2.10, contenían sustituciones estructurales idénticas en las posiciones V<sub>H</sub> 37 (Ile), 78 (Val) y 94 (Lys), pero conservaban la secuencia de consenso V<sub>H</sub>III humana en las posiciones 24 y 93. Cuatro clones habían perdido la secuencia codificadora de la cadena ligera y no se unían a VEGF cuando se analizaron en un ensayo ELISA con fagos (Cunningham y col., *EMBO J.* 13, 2508 [1994]). Ocasionalmente, apreciamos la pérdida de la secuencia de la cadena ligera o de la cadena pesada en otras genotecas de fagémidos con Fab (datos no publicados), y estos clones se seleccionan presumiblemente basándose a la expresión aumentada. Tales artefactos a menudo se pueden minimizar reduciendo el número de ciclos de clasificación o propagando las genotecas en medios sólidos.

10

15

Determinación de las afinidades de unión a VEGF

[0068] Se midieron las constantes de asociación ( $k_{on}$ ) y de disociación ( $k_{off}$ ) para la capacidad de unión de variantes Fab humanizadas a VEGF<sub>121</sub> mediante resonancia de plasmón superficial (Karlsson et al, *J. Immun. Methods* 145, 229 [1991]) en un instrumento (Karlsson y col, *J. Immun. Methods* 145, 229 [1991]) en una Pharmacia de Pharmacia. Se inmovilizó covalentemente el VEGF<sub>121</sub> al chip del biodetector a través de los grupos amino primarios. La capacidad de unión de las variantes Fab A4.6.1 humanizadas se midió usando soluciones de flujo de Fab en PBS/0,05% TWEEN-20™ (detergente) sobre el chip a una velocidad de flujo de 20 µl/m. Después de cada medición de unión, se eliminó el Fab residual del ligando lavando con 5 µl de una solución acuosa de HCl 50 mM a una velocidad de flujo de 3 µl/m. Los perfiles de unión se analizaron con un regresión no lineal usando un modelo de unión monovalente sencillo (BIAevaluation software v2.0; Pharmacia).

20

25

[0069] Se expresaron las variantes seleccionadas de los fagos hu2.1, hu2.2, hu2.6, hu2.7 y hu2.10 en *E. coli* usando matraces en agitación y se purificaron los fragmentos Fab a partir de los extractos periplásmicos por cromatografía de afinidad con proteína G. Las producciones recuperadas de Fab para estos cinco clones oscilaron entre 0,2 (hu2.6) y 1,7 mg/l (hu2.1). La afinidad de cada una de estas variantes por el antígeno (VEGF) se midió por resonancia de plasmón superficial en un instrumento BIAcore como se muestra en la tabla 3.

30

Tabla 3

Afinidad de unión a VEGF de las variantes A4.6.1 humanizadas

Variante	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$	$K_D(mut)$ (A4.6.1)	$K_D$
	$M^{-1}s^{-1} / 10^4$	104s-1	nM		

Quimera A4.6.1	5,4	0,85	1,6	
hu2.0	ND	ND	>7000**	
<b>Clones de fagos seleccionados:</b>				>4000
hu2.1	0,70	0,47	18	260
hu2.2	0,67	0,67	16	340
hu2.6	0,63	2,0	4,5	67
hu2.7			24	360
hu2.10			3,5	55
*hu2.10V			1,8	9,3
				35
				5,8

\*hu2.10V = hu2.10 con la mutación  $V_L$  Leu46 -> Val; los errores estimados en las mediciones de unión del Biacore son +/- 25%;

\*\*Demasiado baja para poder medirla, estimación de unión menor

5

[0070] El análisis de estos datos de unión, revelaron que el clon consenso hu2.10 poseía la mayor afinidad por VEGF entre las cinco variantes analizadas. Así, nuestra genoteca de fagémidos con Fab, se enriqueció selectivamente con el clon con una capacidad de unión más fuerte. La  $K_D$  calculada para hu2.10 fue 55 nM, al menos 125 veces más fuerte que la de hu.20 que no contenía cambios estructurales ( $K_D > 7 \mu\text{M}$ ). Las otras cuatro variantes seleccionadas mostraron una capacidad de unión a VEGF más débil, que no superó una  $K_D$  de 360 nM en el caso de la más débil (hu2.7). Curiosamente, la  $K_D$  para hu2.6, 67 nM, fue sólo ligeramente más débil que la de hu2.10 y sólo se descubrió una copia de este clon entre los 20 clones secuenciados. Esto puede deberse a los menores niveles de expresión y presentación, como fue el caso cuando se expresó el fragmento Fab soluble de esta variante. Sin embargo, a pesar de la menos tasa de expresión, esta variante es útil como anticuerpo humanizado.

15

#### Mejora adicional de la variante hu2.10 humanizada

20

[0071] A pesar de la enorme mejora en la afinidad por el antígeno con la variante humanizada inicial, la capacidad de unión de hu2.10 a VEGF aún fue 35 veces más débil que la del fragmento Fab quimérico con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  del A4.6.1 murino. Esta diferencia considerable sugirió que aún podría ser posible otra optimización de la región estructural humanizada mediante mutaciones adicionales. De los residuos vernier identificados por Foote y col., *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1992), sólo los residuos  $V_L$  46,  $V_H$  2 y  $V_H$  48 diferían en el A4.6.1 en comparación con la región estructural  $V_{L\text{Kl}}-V_H$  III (figura 1) pero no se aleatorizó en nuestra genoteca de fagémidos. Un modelo molecular del fragmento Fv de A4.6.1 humanizado mostró que el sitio  $V_L$  46 se asienta en el interfaz  $V_L-V_H$  y que podría influir en la conformación de CDRH3. Además este aminoácido es casi siempre leucina en la mayoría de las regiones estructurales  $V_L\text{K}$  (Kabat y col., citado con anterioridad), pero es valina en el A4.6.1. Por consiguiente, se realizó una sustitución Leu -> Val en esta posición del hu2.10 como base. Los análisis de la cinética de unión para esta nueva variante, hu2.10V, indicó una mejora de 6 veces en la  $K_D$  para la unión a VEGF. La  $K_D$  para hu2.10V (9,3 nM) fue de este modo 6 veces la de la quimera. En contraste con  $V_L$  46, no se observó ninguna mejora en la afinidad de unión de hu2.10 con el reemplazamiento de  $V_H$  2 o  $V_H$  48 con el residuo correspondiente del A4.6.1 murino.

30

35

[0072] Curiosamente, parte de la mejora antes del último cambio en la afinidad se debió a un incremento en la constante de asociación ( $k_{on}$ ), que sugiere que  $V_L$  46 puede desempeñar un papel en la preorganización de la estructura del anticuerpo en una conformación más adecuada para la unión al antígeno. Otras mutaciones con una afinidad por el antígeno afectada se debieron principalmente a cambios en la constante de disociación ( $k_{off}$ ) para la unión. La comparación de hu2.1 y hu2.10 revela una mejora de 5 veces la afinidad para la sustitución de los residuos  $V_H$  1, 73, 75, 76 con la secuencia A4.6.1. La conversión de  $V_L$ -71 a la secuencia (Phe -> Tyr) de A4.6.1 tuvo un efecto inapreciable en la capacidad de unión (hu2.2 frente a hu2.7), mientras que las variantes con leucina en  $V_L$  4 se unieron ligeramente peor (<2 veces) que las que tenían metionina, el residuo natural tanto en las regiones estructurales A4.6.1 y  $V_{KL}$  I humana (hu2.2 frente a hu2.1). La comparación de otras variantes A4.6.1 humanizadas no mostradas en la presente memoria descriptiva, revelaron que el cambio  $V_H$  94 Arg -> Lys producía una mejora de 5 veces en la  $K_D$ , debido al contacto directo con el antígeno por este residuo, o a un papel

40

estructural en el mantenimiento de una conformación adecuada de CDR-H3. La variante hu2.6 tiene tres diferencias en la secuencia en relación al clon consenso hu2.10, pero sin embargo tiene una  $K_D$  similar, lo que sugiere que estas tres sustituciones tiene un escaso efecto en la capacidad de unión al antígeno. El efecto inapreciable de los cambios conservativos en  $V_L$  4 y 71 coinciden con los datos de unión para otras variantes, incluso el cambio en  $V_H$  67 (Phe -> Thr) tuvo un escaso efecto en la capacidad de unión.

#### Comentarios como conclusión

[0073] La descripción anterior detalla procedimientos específicos que se pueden utilizar para realizar la presente invención. Habiendo detallado dichos procedimientos específicos, los expertos en la materia sabrán bien cómo idear procedimientos fiables alternativos para llegar a la misma información utilizando los frutos de la presente invención. De este modo, sin embargo, aunque el texto anterior pueda parecer detallado, no debe interpretarse como limitante del alcance global del mismo.

15

#### LISTADO DE SECUENCIAS

[0076]

20 (1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Genentech, Inc.

25 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTICUERPOS HUMANIZADOS Y PROCEDIMIENTOS PARA SINTETIZAR ANTICUERPOS HUMANIZADOS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 14

30

(iv) DIRECCIÓN DE CONTACTO:

(A) DIRECCIÓN: Flehr, Hohbach, Test, Albritton  
Herbert

(B) CALLE: Four Embarcadero Center, Suite 3400

(C) CIUDAD: San Francisco

35

(D) ESTADO: California

(E) PAÍS: Estados Unidos

(F) CP: 94111

40

(v) FORMULARIO LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE EMDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

45

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version  
#1.30

(vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUALES:

50

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT HEREWITH

(B) FECHA DE DEPÓSITO 02/04/1998

(C) CLASIFICACIÓN:

(vi) DATOS DE SOLICITUD ANTERIORES:

55

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/833,504

(B) FECHA DE DEPÓSITO: 07/04/1997

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: Dreger, Walter H.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 24,190
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: A-64254

5 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

- (A) TELÉFONO: (415) 781-1989
- (B) TELEFAX: (415) 398-3249

10 (2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 66 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 1:

25 **GATTTCAAAC GTCGTNYTAC TWTTCCTTA GACACCTCCG CAAGCACABY TTACCTGCAG 60**  
**ATGAAC 66**

30 (2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 60 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 2:

**AGCCTGCGCG CTGAGGACAC TGCCGTCTAT TACTGTDYAA RGTACCCCCA CTATTATGGG 60**

45 (2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 3:

60 **CTCAGCGCGC AGGCTGTTCA TCTGCAGGTA 30**

(2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 4:

15 **TCTGGGACGG ATTACACTCT GACCATC** 27

(2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 75 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 5:

30 **CGTTTGTCCT GTGCARYTTC TGGCTATACC TTCACCAACT ATGGTATGAA CTGGRTCCGT** 60  
**CAGGCCCCGG GTAAG** 75

35 (2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 6:

50 **Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly**  
**1 5 10 15**

**Asp Arg Val Ile Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr**  
**20 25 30**

55 **Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Val Leu Ile**  
**35 40 45**

**Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly**  
**50 55 60**

60 **Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro**  
**65 70 75 80**

**Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp**  
**85 90 95**

**Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys**  
**100 105**

5

(2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 7:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 7:

25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

30

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

35

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

40

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 8:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 8:

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 10 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 (2) Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 123 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 (C) TIPO DE CADENA: desconocido  
 (D) TOPOLOGÍA: desconocido

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 9:

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

(2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 123 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 10:

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

(2) INFORMACION PARA Identificador de secuencia N° 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 123 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocido

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 11:

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



(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: desconocido  
(D) TOPOLOGÍA: desconocido

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

10 (A) NOMBRE/CLAVE: misc\_feature  
(B) LOCALIZACIÓN: 459..460  
(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "La cadena ligera comienza en la base número 459."

(ix) CARACTERÍSTICA:

15 (A) NOMBRE/CLAVE: misc\_feature  
(B) LOCALIZACIÓN: 1101..1102  
(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "La cadena ligera termina en la base número 1101."

20 (ix) CARACTERÍSTICA:

25 (A) NOMBRE/CLAVE: misc\_feature  
(B) LOCALIZACIÓN: 1254..1255  
(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "La cadena pesada comienza en la base número 1254."

(ix) CARACTERÍSTICA:

30 (A) NOMBRE/CLAVE: misc\_feature  
(B) LOCALIZACIÓN: 2424..2425  
(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "La cadena pesada termina en la base número 2424."

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Identificador de secuencia N° 14:

	GAATTCAACT	TCTCCATACT	TTGGATAAGG	AAATACAGAC	ATGAAAAATC	TCATTGCTGA	60
5	GTTGTTATTT	AAGCTTTGGA	GATTATCGTC	ACTGCAATGC	TTCGCAATAT	GGCGCAAAAT	120
	GACCAACAGC	GGTTGATTGA	TCAGGTAGAG	GGGGCGCTGT	ACGAGGTAAA	GCCCGATGCC	180
	AGCATTCCCTG	ACGACGATAC	GGAGCTGCTG	CGCGATTACG	TAAAGAAGTT	ATTGAAGCAT	240
10	CCTCGTCAGT	AAAAAGTTAA	TCTTTTCAAC	AGCTGTCATA	AAGTTGTCAC	GGCCGAGACT	300
	TATAGTCGCT	TTGTTTTTAT	TTTTTAATGT	ATTTGTA ACT	AGAATTCGAG	CTCGGTACCC	360
	GGGGATCCTC	TAGAGGTTGA	GGTGATTTTA	TGAAAAAGAA	TATCGCATTT	CTTCTTG CAT	420
15	CTATGTTCTG	TTTTTCTATT	GCTACAAACG	CGTACGCTGA	TATCCAGATG	ACCCAGTCCC	480
	CGAGCTCCCT	GTCCGCCTCT	GTGGGCGATA	GGGTCACCAT	CACCTGCAGC	GCAAGTCAGG	540
	ATATTAGCAA	CTATTTAAAC	TGGTATCAAC	AGAAACCAGG	AAAAGCTCCG	AAAGTACTGA	600
20	TTTACTTCAC	CTCCTCTCTC	CACTCTGGAG	TCCCTTCTCG	CTTCTCTGGA	TCCGGTCTG	660
	GGACGGATTA	CACTCTGACC	ATCAGCAGTC	TGCAGCCAGA	AGACTTCGCA	ACTTATFACT	720
	GTC AACAGTA	TAGCACCCTG	CCGTGGACGT	TTGGACAGGG	TACCAAGGTG	GAGATCAAAC	780
25	GAACTGTGGC	TGCACCATCT	GTCTTCATCT	TCCCGCCATC	TGATGAGCAG	TTGAAATCTG	840
	GAACTGCTTC	TGTTGTGTGC	CTGCTGAATA	ACTTCTATCC	CAGAGAGGCC	AAAGTACAGT	900
30	GGAAGGTGGA	TAACGCCCTC	CAATCGGGTA	ACTCCAGGA	GAGTGT CACA	GAGCAGGACA	960
	GCAAGGACAG	CACCTACAGC	CTCAGCAGCA	CCCTGACGCT	GAGCAAAGCA	GACTACGAGA	1020
	AACACAAAGT	CTACGCCTGC	GAAGTCACCC	ATCAGGGCCT	GAGCTCGCCC	GTCACAAAGA	1080
35	GCTTCAACAG	GGGAGAGTGT	TAAGCTGATC	CTCTACGCCG	GACGCATCGT	GGCCCTAGTA	1140
	CGCAACTAGT	CGTAAAAAGG	GTATCTAGAG	GTTGAGGTGA	TTTTATGAAA	AAGAATATCG	1200
40	CATTTCTTCT	TGCATCTATG	TTCGTTTTTT	CTATTGCTAC	AAACGCGTAC	GCTGAGGTTT	1260
45							
50							
55							
60							

AGCTGGTGGA GTCTGGCGGT GGCCTGGTGC AGCCAGGGGG CTCACTCCGT TTGTCTGTG 1320  
 CAGCTTCTGG CTATACCTTC ACCAACTATG GTATGAACTG GATCCGTGAG GCCCCGGGTA 1380  
 AGGGCCTGGA ATGGGTGGA TGGATTAAAC CCTATACCGG TGAACCGACC TATGCTGCGG 1440  
 ATTTCAAACG TCGTTTTACT ATTTCTTTAG ACACCTCCGC AAGCACAGTT TACCTGCAGA 1500  
 TGAACAGCCT GCGCGCTGAG GACACTGCCG TCTATTACTG TGCAAAGTAC CCCCACTATT 1560  
 ATGGGAGCAG CCACTGGTAT TTCGACTGTCT GGGGTCAAGG AACCTGGTC ACCGTCTCCT 1620  
 CGGCCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG 1680  
 GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTGA AGGAGTACTT GGGGGRACCG GTGACGGTGT 1740  
 CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCTT 1800  
 CAGGACTCTA CTCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA 1860  
 CCTACATCTG CACCGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGACPAAG AAAGTTGAGC 1920  
 CCAAATCTTG TGACAAAAC CACCTCTAGA GTGGCGGTGG CTCTGGTTC GGTGATTTTG 1980  
 ATTATGAAA GATGGCAAAC GCTAATAAGG GGGCTATGAC CGAAAATGCC GATGAAAACG 2040  
 CGCTACAGTC TGACGCTAAA GGCAAACCTG ATTCTGTGCG TACTGATTAC GGTGCTGCTA 2100  
 TCGATGGTTF CATTGGTGAC GTTCCGGCC TTGCTAATGG TAATGGTGCT ACTGGTGATT 2160  
 TTGCTGGCTC TAATCCCAA ATGGCTCAAG TCGGTGACGG TGATAATTCA CCTTTAATGA 2220  
 ATAATTTCCG TCAATATTTA CCTTCCCTCC CTCAATCGGT TGAATGTGCG CCTTTTGTCT 2280  
 TTAGCGCTGG TAAACCATAT GAATTTTCTA TTGATTGTGA CAAAATAAAC TTATTCCGTG 2340  
 GTGTCTTTGC GTTCTTTTA TATGTTGCCA CCTTTATGTA TGTATTTTCT ACGTTTGCTA 2400  
 ACATACTGCG TAATAAGGAG TCTTAATCAT GCCAGTTCTT TTGGCTAGCG CCGCCCTATA 2460  
 CCTGTCTGTC CTCCTCCGCT TCGGTGCGGG TGCATGGAGC CGGGCCACCT CGACCTGAAT 2520  
 GGAAGCCGGC GGCACCTGCG TAACGGATTC ACCACTCCAA GAATTTGGAGC CAATCAATTC 2580  
 TTGCGGAGAA CTGTGAARTGC GCAAACCAAC CCTTGGCAGA ACATATCCAT CGCGTCCGCC 2640  
 ATCTCCAGCA GCCGCACGCG GCGCATCTCG GGCAGCGTTG GGTCTGGCC ACGGGTGCGC 2700  
 ATGATCGTGC TCCTGTCTGT GAGGACCCGG CTAGGCTGGC GGGGTGCCT TACTGGTTAG 2760  
 CAGAAATGAAT CACCGATACG CGAGCGAAGC TGAAGCGACT GCTGCTGCAA AACGTCTGCG 2820  
 ACCTGAGCAA CAACATGAAT GGTCTTCGGT TTCCGTGTTT CGTAAAGTCT GGAAACGCGG 2880  
 AAGTCAGCGC CCTGCACCAT TATGTTCCGG ATCTGCATCG CAGGATGCTG CTGGCTACCC 2940  
 TGTGGAAACAC CTACATCTGT ATTAACGAAG CGCTGGCATT GACCCTGAGT GATTTTTCTC 3000  
 TGGTCCCGCC GCATCCATAC CGCCAGTTGT TTACCCTCAC AACGTTCCAG TAACCGGGCA 3060  
 TGTTATCAT CATGAACCCG TATCGTGAGC ATCCTCTCTC GTTTCATCGG TATCATTACC 3120  
 CCCATGAACA GAAATTCCCC CTTACACGGA GGCATCAAGT GACCAAACAG GAAAAACCG 3180

5

CCCTTAACAT GGCCCGCTTT ATCAGAAGCC AGACATTAAC GCTTCTGGAG AAACCAACG 3240  
 AGCTGGACGC GGATGAACAG GCAGACATCT GTGAATCGCT TCACGACCAC GCTGATGAGC 3300  
 TTTACCGCAG GATCCGGAAA TTGTAAACGT TAATATTTTG TTAAAATTCG CGTTAAATTT 3360  
 TTGTAAATC AGCTCATTTT TTRACCAATA GGCCGAAATC GGCAAAATCC CTATAAATC 3420  
 AAAAGAATAG ACCGAGATAG GGTGAGTGT TGTTCCAGTT TGGAAACAAGA GTCCACTATT 3480  
 AAAGAACGTG GACTCCAACG TCAAAGGGCG AAAAACCCTC TATCAGGGCT ATGGCCCACT 3540  
 ACGTGAACCA TCACCCTAAT CAAGTTTTTT GGGGTCGAGG TGCCGTAAAG CACTAAATCG 3600  
 GAACCTAAA GGGAGCCCC GATTTAGAGC TTGACGGGGA AAGCCGGCGA ACGTGGCGAG 3660  
 AAAGGAAGGG AAGAAAGCGA AAGGAGCGGG CGCTAGGGCG CTGGCAAGTG TAGCGGTCAC 3720  
 GCTGCGCGTA ACCACCACAC CCGCCGCGCT TAATGCGCGG CTACAGGGCG CGTCCGGATC 3780  
 CTGCCTCGCG CGTTTCGGTG ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC 3840  
 GGTACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCCCGTCAGG GCGCGTCAGC 3900  
 GGGTGTGGC GGGTGTGGG GCGCAGCCAT GACCCAGTCA CGTAGCGATA GCGGAGTGTA 3960  
 TACTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT 4020  
 GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAA TACCGCATCA GCGCTCTTC CGCTTCCTCG 4080  
 CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTGTTTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG 4140  
 GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA 4200  
 GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAG GCCGCGTTCG TGGCGTTTTT CCATAGGCTC 4260  
 CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA 4320  
 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGGCTC TCCTGTTCCG 4380  
 ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGCTTTCT 4440  
 CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCAA GCTGGGCTGT 4500  
 GTGGAGGAG GCGCGGTTGA GCGCGAGCGG TGGGCGTTNF GCGGTACTA TCGTGTGAG 4560  
 TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC 4620  
 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC 4680  
 ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA 4740  
 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTGTTTTGC 4800  
 AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTCTACG 4860  
 GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAATCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA 4920  
 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT 4980  
 ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA 5040  
 GCGATCTGTC TATTTGTTTC ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCTGTA GATAACTACG 5100

ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA 5160  
 CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT 5220  
 CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT 5280  
 AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTGCAGGCAT CGTGGTGTCA 5340  
 CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTCAGC TCCGGTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA 5400  
 TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA 5460  
 AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT 5520  
 GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA 5580  
 GAATAGTGTA TCGGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCCGGGT CAACACGGGA TAATACCGCG 5640  
 CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACCTC 5700  
 TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA 5760  
 TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT 5820  
 GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GCGGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTTT 5880  
 CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT 5940  
 ATTTAGAAAA AATAACAAT AGGGGTTCG CGCACATTC CCCGAAAAGT GCCACCTGAC 6000  
 GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC 6060  
 TTTCGTCTTC AA 6072

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir e identificar mutaciones en la región estructural que mejora la unión de anticuerpos humanizados con sus antígenos afines, comprendiendo el método:
- 5 (a) injertar regiones determinantes de complementariedad (CDR) no humanas en una región estructural humana que comprende  $V_{Lk}$  subgrupo I ( $V_{LkI}$ ) y  $V_H$  subgrupo III ( $V_{HIII}$ );
- (b) mutagenizar aleatoriamente residuos de la región estructural de un grupo de trece posiciones críticas de la región estructural;
- 10 (c) expresar de forma monovalente la biblioteca resultante de moléculas de anticuerpo en la superficie del fago filamentoso;
- (d) identificar las secuencias óptimas de la región estructural mediante selección basada en afinidad; y
- (e) opcionalmente mutar adicionalmente anticuerpos seleccionados mediante la sustitución de residuos vernier que se sitúan en el interfaz  $V_L$ - $V_H$  por residuos que se emparejan con el anticuerpo parental no humano,
- 15 donde los residuos críticos de la región estructural de la etapa (b) son los residuos 4 y 71 de  $V_L$  y los residuos 24, 37, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78, 93 y 94 (numeración de Kabat) de  $V_H$ .
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los residuos críticos de la región estructural son parcialmente aleatorios para permitir la selección de una secuencia de la región estructural murina, la secuencia de la región estructural consenso  $V_{LkI}$ - $V_{HIII}$  humana, o las secuencias de la región estructural halladas generalmente en otras regiones estructurales humanas y murinas.
- 20 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo humanizado es un anticuerpo anti-VEGF.
- 25

Dominio V<sub>L</sub>

```

A4.6.1      10          20          30          40
            DIQMTQTSSLSASLGDRVILSCSASQDISNYLNWYQQKP
            **          *          *          *
hu2.0       DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKP
hu2.10      DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKP

A4.6.1      50          60          70          80
            DGTVKVLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDYSLTISNLEP
            **** *          **          *          *
hu2.0       GKAPKLLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQP
            .
hu2.10      GKAPKLLIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISLQP

A4.6.1      90          100
            EDIATYYCQQYSTVPWTFGGGKLEIK
            *          *          *
hu2.0       EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK
hu2.10      EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK
    
```

Dominio V<sub>H</sub>

```

A4.6.1      10          20          30          40
            EIQLVQSGPELKQPGETVRISCKASGYTFTNYGMNWVKQA
            *          *          *          *
hu2.0       EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA
            .
hu2.10      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWIRQA

A4.6.1      50 a          60          70          80
            PGKGLKWMGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLETSASTAYL
            *          *          *          *
hu2.0       PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTISRDNKNTLYL
            .          .          .          .
hu2.10      PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTISLDTSASTVYL

A4.6.1      abc          90          100abcdef          110
            QISNLKNDTATYFCAKYPHYYGSSHWFYFDVWGAGTTVTVSS
            ***          *          *          *
hu2.0       QMNSLRAEDTAVYYCARYPHYYGSSHWFYFDVWGQGTLVTVSS
            .
hu2.10      QMNSLRAEDTAVYYCARYPHYYGSSHWFYFDVWGQGTLVTVSS
    
```

**FIG. 1**

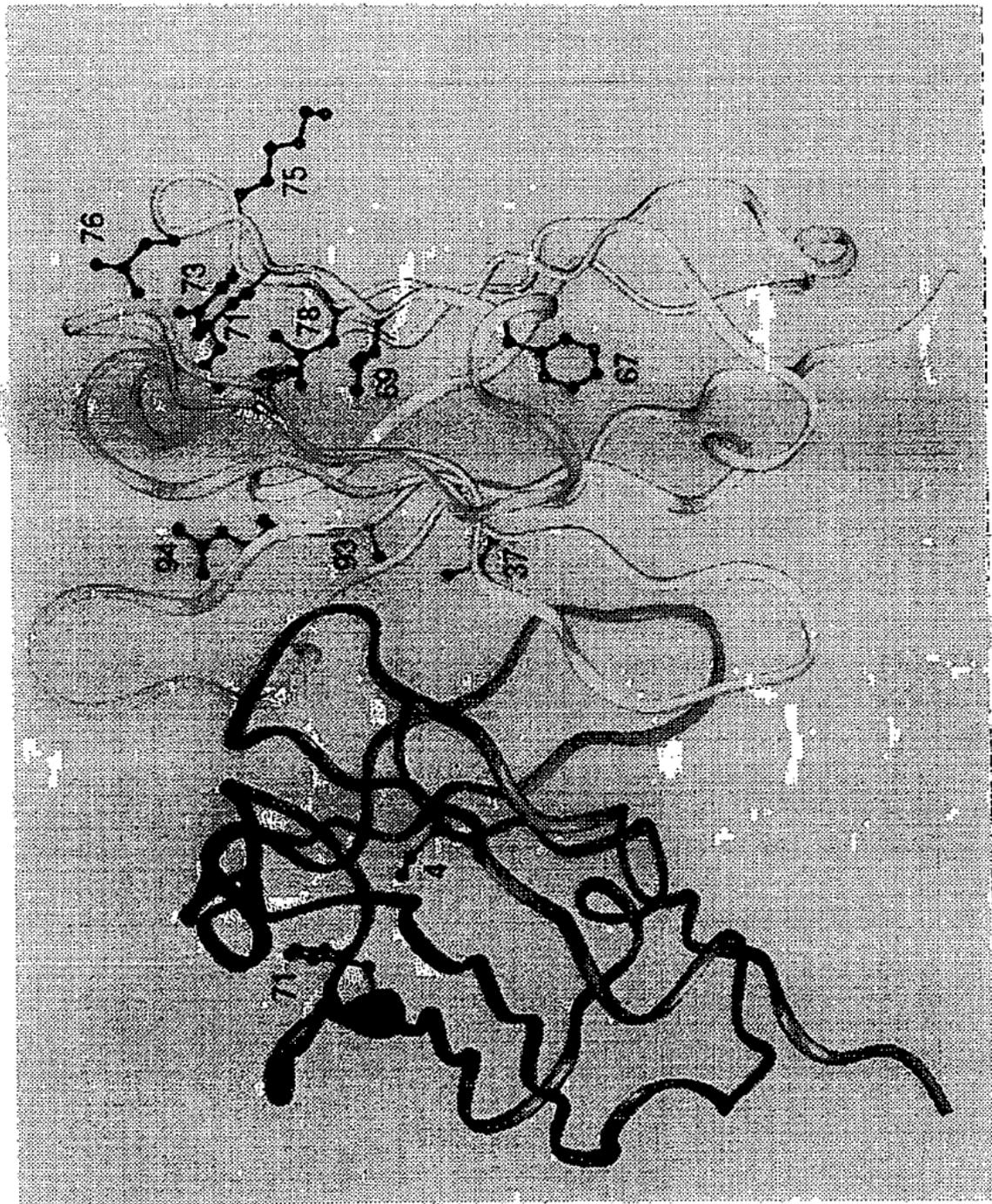


FIG. 2

