



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 792**

51 Int. Cl.:
C12P 21/06 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05851359 .9**
96 Fecha de presentación : **02.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1819830**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **Procedimientos para la ingeniería de anticuerpos.**

30 Prioridad: **08.11.2004 US 984473**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.07.2011

73 Titular/es: **EPITOMICS, Inc.**
863 Mitten Road, Suite 103
Burlingame, California 94010-1303, US

72 Inventor/es: **Couto, Fernando Jose Rebelo do;**
Hendricks, Kristin B.;
Wallace, Stacey Ellen y
Yu, Guo-Liang

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 362 792 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 ingeniería de anticuerpos.

5 Campo de la invención

[0001] El campo de la presente invención es anticuerpos, particularmente procedimientos para la ingeniería, por ejemplo, humanizando, anticuerpos monoclonales.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Debido a su capacidad para elegir como diana prácticamente cualquier molécula con especificidad infinita, los anticuerpos monoclonales tienen el potencial de convertirse en uno de los principales agentes terapéuticos del futuro. Sin embargo, aunque este potencial fuera reconocido hace varios años, los primeros intentos por satisfacer el potencial fueron decepcionantes debido a que los anticuerpos monoclonales usados en terapia provocan una fuerte respuesta inmunitaria en pacientes (Schroff, 1985 Cancer. Res. 45:879-85, Shawler. J Immunol 1985 135:1530-5), incluso a bajas dosis (Dillman, Cancer Biother. 1994 9:17-28). Los científicos predicen que los anticuerpos humanos no producirían tales respuestas inmunitarias adversas. Sin embargo, no existen procedimientos adecuados para producir anticuerpos monoclonales humanos. Tecnologías alternativas para preparar anticuerpos humanos usando, por ejemplo, expresión en fago y animales transgénicos se han desarrollado más recientemente, pero no se usan ampliamente para fines terapéuticos.

[0003] La inmunogenicidad de anticuerpos depende de muchos factores que incluyen el procedimiento de administración, el número de inyecciones, la dosificación, la naturaleza de la conjugación, el fragmento específico utilizado, el estado de agregación y la naturaleza del antígeno (por ejemplo, Kuus-Reichel, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1994 1:365-72). Muchos o la mayoría de los factores pueden manipularse con el fin de disminuir una respuesta inmunitaria. Sin embargo, si la secuencia de anticuerpos original es reconocida como "peligrosa" o "extraña", las oportunidades son que tarde o temprano una respuesta inmunitaria fuerte evitará el uso de ese anticuerpo en terapia.

[0004] Con el fin de reducir estas respuestas se han hecho esfuerzos por sustituir en la medida de lo posible la secuencia no humana de un anticuerpo por secuencias humanas usando tecnología de ADN recombinante. Para este fin se han empleado anticuerpos quiméricos que contienen dominios constantes de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de anticuerpos humanos que se unen a dominios variables de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de anticuerpos de ratón. Los anticuerpos quiméricos todavía contienen un gran número de secuencias de aminoácidos no humanas en las regiones variables y, como tales, puede organizarse una respuesta inmunitaria significativa contra tales anticuerpos. El injerto de CDR es otra técnica de humanización en la que las porciones de unión a antígeno o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) de anticuerpos monoclonales se injertan por tecnologías de ADN recombinante en las secuencias de ADN que codifican la región estructural (es decir, las tecnologías de ADN recombinante en las secuencias de ADN que codifican la región estructural (es decir, la región no CDR) de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos. Un problema técnico de los anticuerpos injertados en CDR es que normalmente muestran una considerable afinidad disminuida. Para restaurar el aumento de la afinidad de anticuerpos injertados en CDR, ciertos residuos de la región estructural clave original (por ejemplo, residuos que se cree que participan en la determinación de la conformación de las CDR) se reintroducen en el anticuerpo injertado en CDR. Usando un enfoque de humanización diferente, Roguska ideó una estrategia de "reestructuración" para anticuerpos de ratón en la que solo se sustituyen los residuos expuestos que son diferentes a los residuos expuestos de un anticuerpo humano. El documento US2004/0086979 describe una estrategia de reestructuración para anticuerpos de conejo.

[0005] Sin embargo, aunque los anticuerpos humanizados por los procedimientos anteriores pueden mostrar inmunogenicidad reducida en pacientes humanos (Moreland, Arthritis Rheum 1993 36:307-18), muchos anticuerpos humanizados todavía son altamente inmunogénicos a una gran proporción de pacientes. Se cree que esto es debido a que las propias CDR son inmunogénicas (Ritter, Cancer Res 2001 61:6851-9; Welt, Clin Cancer Res 2003 9:1338-46).

[0006] Todos los procedimientos descritos anteriormente requieren que las regiones CDR del anticuerpo no humano sigan sin cambiar durante el procedimiento de humanización con el fin de mantener la especificidad y la afinidad de los anticuerpos. Sin embargo, como las regiones CDR no humanas son por sí mismas inmunogénicas en seres humanos, los procedimientos para humanizar las regiones CDR de un anticuerpo no humano sin reducir

significativamente la actividad de unión del anticuerpo son altamente deseables. La identificación de procedimientos adecuados para humanizar las regiones CDR de un anticuerpo no humano ha sido una tarea desalentadora, si no imposible, para la comunidad médica y de investigación.

5 **[0007]** Por consiguiente, existe una necesidad continua de mejorar los procedimientos para preparar anticuerpos no humanos que sean menos inmunogénicos en seres humanos y otros huéspedes mamíferos. En particular, existe la necesidad de procedimientos de humanización que reduzca la inmunogenicidad de regiones CDR de un anticuerpo no humano en seres humanos. La presente invención cumple estas y otras necesidades.

10 Bibliografía

[0008] Referencias de interés incluyen: patentes de EE.UU. 6.331.415 B1, 5.225.539, 6.342.587, 4.816.567, 5.639.641, 6.180.370, 5.693.762, 4.816.397, 5.693.761, 5.530.101, 5.585.089, 6.329.551 y las publicaciones Morea y col., Methods 20: 267-279 (2000), Ann. Allergy Asthma Immunol. 81:105-119 (1998), Rader y col., J. Biol. Chem. 15 276:13668-13676 (2000), Steinberger y col., J. Bio. Chem. 275: 36073-36078 (2000), Roguska y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973 (1994), Delagrave y col., Prot. Eng. 12: 357-362 (1999), Roguska y col., Prot. Eng. 9: 895-904 (1996), Knight y Becker, Cell 60: 963-970 (1990); Becker y Knight, Cell 63:987-997 (1990) Popkov, J Mol Biol 325:325-35 (2003); Rader y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 95:8910-8915; Mehr y col., J Immunol. 172:4790-6 (2004) y De Pascalis y col. J Imm. 2002, 169:3076-3084.

20

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0009] La invención proporciona un procedimiento para identificar posiciones de un anticuerpo que pueden modificarse sin reducir significativamente la actividad de unión del anticuerpo. El procedimiento implica identificar 25 una posición sustituible en un anticuerpo parental comparando su secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de varios anticuerpos relacionados, en el que dichos anticuerpos relacionados se unen específicamente al mismo antígeno que dicho anticuerpo parental, y en el que dichos anticuerpos relacionados y dicho anticuerpo parental se obtienen de células de un único animal no humano inmunizado con dicho antígeno. El aminoácido en la posición sustituible puede estar sustituido por un aminoácido diferente sin afectar 30 significativamente la actividad del anticuerpo. Los procedimientos objeto pueden emplearse para cambiar la secuencia de aminoácidos de una CDR sin reducir significativamente la afinidad del anticuerpo del anticuerpo, en procedimientos de humanización, o en otros procedimientos de manipulación por ingeniería de anticuerpos. La invención se usa en una variedad de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación.

35 **[0010]** Estas y otras ventajas y características de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras la lectura de los detalles de la invención como se describe más completamente a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 **[0011]**

La Fig. 1 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la invención.

45 La Fig. 2 es un alineamiento de secuencias de aminoácidos que ilustra un procedimiento a modo de ejemplo por el que pueden identificarse posiciones sustituibles dentro de una región CDR. De arriba a abajo, las secuencias de aminoácidos mostradas en la Fig. 2 son SEQ ID NOS: 1-11.

50 La Fig. 3 es dos paneles que muestran un alineamiento de secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo que ilustra un aspecto de un procedimiento a modo de ejemplo por el que las regiones CDR de un anticuerpo pueden humanizarse. De arriba a abajo, las secuencias de aminoácidos mostradas en la Fig. 3 son SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 15.

55 La Fig. 4 es un alineamiento de secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo. De arriba a abajo, las secuencias de aminoácidos mostradas en la Fig. 4 son SEQ ID NOS: 16-25. Las posiciones de la cadena beta se muestran en la parte superior. El sistema de numeración adoptado (véase Chothia, más adelante) se muestra próximo a la parte superior. Se indican las siguientes posiciones: c: son contactos de CDR; i: están en la interfaz de VK/VH; b: son residuos enterrados internos (véase Padlan, más adelante) y C son residuos de CDR. Las secuencias se marcan según convención.

La Fig. 5 muestra la secuencia de aminoácidos de 20 regiones VH3 a modo de ejemplo de un anticuerpo de conejo. De arriba a abajo, las secuencias de aminoácidos mostradas en la Fig. 5 son SEQ ID NOS: 26-45.

5 La Fig. 6 es un alineamiento de secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo que ilustra un aspecto de un procedimiento a modo de ejemplo por el que un anticuerpo de conejo puede humanizarse. De arriba a abajo, las secuencias de aminoácidos mostradas en la Fig. 6 son SEQ ID NOS: 46-48.

10 La Fig. 7 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo que ilustra cómo puede prepararse una secuencia consenso para un anticuerpo.

DEFINICIONES

15 **[0012]** Antes de describirse más la presente invención objeto debe entenderse que la presente invención no se limita a realizaciones particulares descritas ya que, por supuesto, tales pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es sólo con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención sólo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

20 **[0013]** A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

25 **[0014]** Debe observarse que como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de tales anticuerpos y referencia a "una región estructural" incluye referencia a una o más regiones estructurales y equivalentes de la misma conocidos para aquellos expertos en la materia, etc.

30 **[0015]** Las publicaciones tratadas en este documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder tal publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar confirmarse independientemente.

35 **[0016]** Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en este documento. Estos términos son bien entendidos por aquellos en el campo y se refieren a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos que se unen específicamente a un antígeno. Una forma de anticuerpo constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de cadenas de anticuerpos, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de las cadenas ligeras y 40 pesadas son juntas responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras de los anticuerpos.

45 **[0017]** Los polipéptidos de inmunoglobulina reconocidos incluyen las cadenas ligeras kappa y lambda y las cadenas pesadas alfa, gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, epsilon y mu o equivalentes en otras especies. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos) comprenden una región variable de aproximadamente 110 aminoácidos en el extremo NH₂- y una región constante kappa o lambda en el extremo COOH-. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos) comprenden similarmente una región variable (de aproximadamente 116 aminoácidos) y una de las regiones constantes de cadena pesada anteriormente 50 mencionadas, por ejemplo, gamma (de aproximadamente 330 aminoácidos).

55 **[0018]** Los términos "anticuerpos" e "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos o inmunoglobulinas de cualquier isotipo, fragmentos de anticuerpos que retienen la unión específica a antígeno que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fv, scFv y Fd, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios y proteínas de fusión que comprenden una porción de unión a antígeno de un anticuerpo y una proteína de un anticuerpo. Los anticuerpos pueden marcarse de forma detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, una enzima que genera un producto detectable, una proteína fluorescente, y similares. Los anticuerpos pueden conjugarse adicionalmente con otros restos tales como miembros de pares de unión específica, por ejemplo, biotina (miembro de par de unión específica de biotina-avidina) y similares. Los anticuerpos también pueden unirse a un soporte

sólido que incluye, pero no se limita a, placas de poliestireno o perlas, y similares. Por el término también están englobados Fab', Fv, F(ab')₂ y u otros fragmentos de anticuerpos que retienen la unión específica a antígeno, y anticuerpos monoclonales.

5 **[0019]** Los anticuerpos pueden existir en una variedad de otras formas que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab y (Fab')₂, además de anticuerpos híbridos bifuncionales (es decir, biespecíficos) (por ejemplo, Lanzavecchia y col., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y en cadenas individuales (por ejemplo, Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) y Bird y col., Science, 242, 423-426 (1988), que se incorporan en este documento por referencia). (Véase, generalmente, Hood y col., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, 10 Nature, 323, 15-16 (1986),).

[0020] Una región variable de las cadenas ligeras o pesadas de inmunoglobulina consiste en una "región estructural" (FR) interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". El grado de la región estructural y las CDR se ha definido con precisión (véase, 15 "Sequences of Proteins of Immunological Interest", E. Kabat y col., U.S. Departamento de Salud y Servicios Humanos, (1991)). Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región estructural de un anticuerpo, es decir, las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno.

20 **[0021]** Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de las cadenas ligeras y pesadas han sido normalmente contruidos por ingeniería genética a partir de genes de regiones variables y constantes de anticuerpos que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos tales como gamma 1 y gamma 3. 25 Un ejemplo de un anticuerpo quimérico terapéutico es una proteína híbrida compuesta por el dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de conejo y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano (por ejemplo, el anticuerpo quimérico anti-Tac preparado por las células del nº de acceso al depósito A.T.C.C. CRL 9688), aunque pueden usarse otras especies de mamífero.

30 **[0022]** Como se usa en este documento, el término "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón o conejo) que contiene uno o más aminoácidos (en una región estructural, una región constante o una CDR, por ejemplo) que han sido sustituidos por un aminoácido correspondientemente posicionado de un anticuerpo humano. En general, los anticuerpos humanizados producen una respuesta inmunitaria reducida en un huésped humano con respecto a una versión no 35 humanizada del mismo anticuerpo.

[0023] Se entiende que los anticuerpos humanizados diseñados y producidos por el presente procedimiento pueden tener sustituciones conservativas de aminoácidos adicionales que sustancialmente no tienen efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones del anticuerpo. Por sustituciones conservativas se pretenden combinaciones tales 40 como aquellas de los siguientes grupos: Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Los aminoácidos que no están presentes en el mismo grupo son aminoácidos "sustancialmente diferentes".

[0024] El término "unión específica" se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unirse preferencialmente a un analito particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes analitos. En ciertas realizaciones, 45 una interacción de unión específica discriminará entre analitos deseables y no deseables en una muestra, en algunas realizaciones más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1000 o 10.000 veces).

[0025] En ciertas realizaciones, la afinidad entre un agente de captura y un analito cuando se unen 50 específicamente en un complejo de agente de captura/analito se caracteriza por una K_D (constante de disociación) de menos de 10⁻⁶ M, inferior a 10⁻⁷ M, inferior a 10⁻⁸ M, inferior a 10⁻⁹ M, inferior a 10⁻⁹ M, inferior a 10⁻¹¹ M, o inferior a aproximadamente 10⁻¹² M o menos.

[0026] Un residuo de aminoácido que está en "estrecho contacto", "estrecha proximidad" o "en estrecha proximidad con" otro residuo de aminoácido es un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral que es 55 próxima a, es decir, dentro de 7, 6, 5 ó 4 Angstroms de, una cadena lateral de otro aminoácido. Por ejemplo, un aminoácido que está próximo a una CDR es un aminoácido de no CDR que tiene una cadena lateral que está próxima a una cadena lateral de un aminoácido en una CDR.

[0027] Una "región variable" de una cadena pesada o ligera del anticuerpo es un dominio maduro del extremo N de las cadenas. Todos los dominios, CDR y números de residuos se asignan basándose en alineamientos de secuencias y conocimiento estructural. La identificación y la numeración de los residuos de la región estructural y de CDR es como se describe por Chothia y otros (Chothia Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. J Mol Biol 1998;278:457-79).

[0028] VH es el dominio variable de una cadena pesada del anticuerpo. VL es el dominio variable de una cadena ligera del anticuerpo, que podría ser del isotipo kappa (K) o lambda. Los anticuerpos K-1 tienen el isotipo kappa-1, mientras que los anticuerpos K-2 tienen el isotipo kappa-2 y VL es la cadena ligera lambda variable.

[0029] Un "residuo enterrado" es un residuo de aminoácido cuya cadena lateral tiene menos del 50% de accesibilidad relativa del disolvente que se calcula como el porcentaje de la accesibilidad del disolvente con respecto a la del mismo residuo, X, situado en un péptido GGXGG extendido. Los procedimientos para calcular la accesibilidad del disolvente son muy conocidos en la técnica (Connolly 1983 J. Appl. Crystallogr. 16, 548-558).

[0030] Como se usa en este documento, los términos "determinar", "medir" y "evaluar" y "ensayar" se usan indistintamente e incluyen tanto determinaciones cuantitativas como cualitativas.

[0031] Los términos "polipéptido" y "proteína", usados indistintamente en este documento, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud que puede incluir aminoácidos codificados y sin codificar, aminoácidos químicamente o bioquímicamente modificados o derivatizados, y polipéptidos que tienen esqueletos peptídicos modificados. El término incluye proteínas de fusión que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias conductoras heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina del extremo N; proteínas inmunológicamente marcadas; proteínas de fusión con componentes de fusión detectables, por ejemplo, proteínas de fusión que incluyen como componente de fusión una proteína fluorescente, β -galactosidasa, luciferasa, etc.; y similares. Los polipéptidos pueden ser de cualquier tamaño, y el término "péptido" se refiere a polipéptidos que tienen 8-50 residuos (por ejemplo, 8-20 residuos) de longitud.

[0032] Como se usa en este documento, el término "aislado", cuando se usa en el contexto de un anticuerpo aislado, se refiere a un anticuerpo de interés que está al menos el 60% libre, al menos el 75% libre, al menos el 90% libre, al menos el 95% libre, al menos el 98% libre, e incluso al menos el 99% libre de otros componentes con los que el anticuerpo está asociado antes de la purificación.

[0033] Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en este documento para referirse a cualquier tratamiento de cualquier enfermedad o afección en un mamífero, por ejemplo, particularmente un ser humano o un ratón, e incluye:

- a) prevenir que se produzca una enfermedad, afección o síntoma de una enfermedad o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero al que todavía no se le ha diagnosticado que la tiene;
- b) inhibir una enfermedad, afección o síntoma de una enfermedad o afección, por ejemplo, detener su desarrollo y/o retrasar su aparición o manifestación en el paciente; y/o
- c) aliviar una enfermedad, afección o síntoma de una enfermedad o afección, por ejemplo, produciendo regresión de la afección o enfermedad y/o sus síntomas.

[0034] Los términos "sujeto", "huésped", "paciente" e "individuo" se usan indistintamente en este documento para referirse a cualquier sujeto mamífero para el que se desea diagnóstico o terapia, particularmente seres humanos. Otros sujetos pueden incluir ganado, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, etc.

[0035] Los "aminoácidos correspondientes" como se describirán en mayor detalle más adelante son residuos de aminoácidos que están en una posición idéntica (es decir, se encuentra enfrente uno del otro) cuando están alineadas dos o más secuencias de aminoácidos. Los procedimientos para alinear y numerar secuencias de anticuerpos se exponen en gran detalle en Chothia, antes, Kaba, antes, y otros. Como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo Kaba 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, DHHS, Washington, DC), algunas veces pueden hacerse uno, dos o tres huecos y/o inserciones de hasta uno, dos, tres o cuatro residuos, o hasta aproximadamente 15 residuos (particularmente en las CDR L3 y H3) a uno o ambos de los aminoácidos de un anticuerpo con el fin de realizar un alineamiento.

[0036] Un anticuerpo "natural" es un anticuerpo en el que las inmunoglobulinas pesadas y ligeras del anticuerpo han sido naturalmente seleccionadas por el sistema inmunitario de un organismo multicelular, a diferencia

de anticuerpos no naturalmente emparejados preparados, por ejemplo, por expresión en fago. Como tales, los anticuerpos parentales objeto no contienen normalmente ninguna secuencia víricamente derivada (por ejemplo, bacteriófago M13). El bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea son ejemplos de tejidos que producen anticuerpos naturales.

5

[0037] Una "posición sustituible", como se describirá en mayor detalle más adelante, es una posición particular de un anticuerpo que puede estar sustituida por diferentes aminoácidos sin disminuir significativamente la actividad de unión del anticuerpo. Los procedimientos para identificar posiciones sustituibles, y cómo pueden estar sustituidas, se describen en mucho mayor detalle más adelante. Una posición sustituible también puede denominarse en lo sucesivo "posición tolerante a una variación".

10

[0038] Un anticuerpo "parental", como se describirá en mayor detalle más adelante, es un anticuerpo que es la diana de sustituciones de aminoácidos. En ciertas realizaciones, los aminoácidos pueden ser "donados" por un anticuerpo "donante" para el anticuerpo parental para producir un anticuerpo alterado.

15

[0039] Los "anticuerpos relacionados", como se describirán en mayor detalle más adelante, son anticuerpos que tienen una secuencia similar y se producen por células que tienen un antecesor de linfocitos B común.

Un antecesor de linfocitos B común tal contiene un genoma que tiene una región VJC de las cadenas ligeras reorganizada y una región VDJC de las cadenas pesadas reorganizada y produce un anticuerpo que todavía no ha experimentado maduración por afinidad. Los linfocitos B "nativos" o "vírgenes" presentes en tejido del bazo son, a modo de ejemplo, antecesores comunes de los linfocitos B. Los anticuerpos relacionados se unen al mismo epítotope de un antígeno y son normalmente muy similares en secuencia, particularmente en sus CDR L3 y H3. Tanto las CDR H3 como L3 de anticuerpos relacionados tienen una longitud idéntica y una secuencia idéntica próxima (es decir, se diferencian 0, 1 ó 2 residuos). Los anticuerpos relacionados están relacionados mediante un antecesor de anticuerpos común, el anticuerpo producido en el antecesor de linfocitos B que todavía no ha recibido tratamiento. El término "anticuerpos relacionados" no pretende describir un grupo de anticuerpos que no tenga un antecesor de anticuerpos común producido por un linfocito B.

20

25

30 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERIDAS**

[0040] La invención proporciona un procedimiento para identificar posiciones de un anticuerpo que pueden modificarse sin reducir significativamente la actividad de unión del anticuerpo. El procedimiento implica identificar una posición sustituible en un anticuerpo parental comparando su secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de varios anticuerpos relacionados, en el que dichos anticuerpos relacionados se unen específicamente al mismo antígeno que dicho anticuerpo parental, y en el que dichos anticuerpos relacionados y dicho anticuerpo parental se obtienen de células de un animal no humano individual inmunizado con dicho antígeno. El aminoácido en la posición sustituible puede estar sustituido por un aminoácido diferente sin afectar significativamente la actividad del anticuerpo. Los procedimientos objeto pueden emplearse para cambiar la secuencia de aminoácidos de una CDR sin reducir significativamente la afinidad del anticuerpo del anticuerpo, en procedimientos de humanización, o en otros procedimientos de manipulación de anticuerpos. La invención se usa en una variedad de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación.

35

40

[0041] En la posterior descripción de la invención objeto, los procedimientos de identificar posiciones tolerantes a una variación se tratan primero, seguido de una descripción de diversos protocolos en los que se usan aquellos procedimientos.

45

PROCEDIMIENTOS PARA IDENTIFICAR UNA POSICIÓN TOLERANTE A UNA VARIACIÓN DE UN ANTICUERPO

50

[0042] Como se ha mencionado anteriormente, la invención proporciona un procedimiento para identificar una posición tolerante a una variación, es decir, sustituible, de un anticuerpo. Una vez se identifica una posición tal, el aminoácido en esa posición puede ser sustituido por un aminoácido diferente sin disminuir significativamente la actividad de unión del anticuerpo. El procedimiento objeto es particularmente empleable en procedimientos en los que se desea identificar residuos sustituibles en regiones de un anticuerpo que de otro modo se creería que son esenciales para la unión a antígeno. Por ejemplo, los procedimientos objeto pueden emplearse para identificar posiciones sustituibles en una región CDR de un anticuerpo. En realizaciones particulares, los procedimientos objeto pueden emplearse para identificar una posición sustituible en una región CDR de un anticuerpo que va a humanizarse. Una vez identificado, el aminoácido en esa posición puede sustituirse por un aminoácido "humano"

55

(por ejemplo, un aminoácido que ocupa la posición equivalente de un anticuerpo de la línea germinal humana que tiene una secuencia similar a la del anticuerpo que va a humanizarse). Por consiguiente, el procedimiento objeto se usa particularmente en procedimientos de humanización, aunque, como se describirá en mayor detalle más adelante, los procedimientos objeto pueden ser fácilmente empleados en una amplia variedad de procedimientos de manipulación por ingeniería de anticuerpos.

[0043] En términos muy generales y con referencia a la Fig. 1, los procedimientos objeto implican inmunizar un animal productor de anticuerpos con un antígeno **2** y obtener la secuencia de aminoácidos de varios anticuerpos monoclonales que se unen a ese antígeno **4**. Entonces se comparan las secuencias de aminoácidos de esos anticuerpos (por ejemplo, alineando aquellas secuencias) y los anticuerpos se clasifican según su similitud entre sí para identificar grupos relacionados de anticuerpos **6**. Los anticuerpos dentro de cada grupo de anticuerpos relacionados generalmente comparten un anticuerpo antecesor común, y han evolucionado a partir de ese anticuerpo antecesor mediante hipermutación somática, conversión de genes y otros mecanismos productores de mutaciones celulares que se producen durante la maduración por afinidad y las fases finales del desarrollo de linfocitos B. Una vez se han establecido los grupos de anticuerpos relacionados, las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos dentro de un grupo pueden compararse para identificar posiciones sustituibles **8**. Una posición sustituible de un anticuerpo individual puede identificarse en virtud del hecho de que la identidad del aminoácido en esa posición varía entre los anticuerpos individuales de un grupo de anticuerpos relacionados. Una vez identificado, el aminoácido en la posición sustituible de un anticuerpo individual puede sustituirse por un aminoácido diferente sin disminuir significativamente la afinidad del anticuerpo **10**. Como los anticuerpos que contienen sustituciones de aminoácidos en esas posiciones sustituibles se produjeron originalmente y se probaron eficazmente por el sistema inmunitario del animal inmunizado inicial, la sustitución en esas posiciones sería bien tolerada por el anticuerpo. En realizaciones particulares, una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución humanizante **12** (es decir, una sustitución que hace que la secuencia de aminoácidos sea más similar a la de un anticuerpo humano), una sustitución dirigida **14** (por ejemplo, una sustitución que hace que la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo sea más similar a la de un anticuerpo relacionado), una sustitución al azar (por ejemplo, una sustitución con cualquiera de los 20 aminoácidos que se producen naturalmente) o una sustitución conservativa (por ejemplo, una sustitución con un aminoácido que tiene propiedades bioquímicas similares a las que se han sustituido).

[0044] Como se ha mencionado anteriormente, el procedimiento objeto implica inmunizar un animal adecuado con un antígeno y obtener las secuencias de aminoácidos de varios anticuerpos reactivos con antígenos de ese animal. Las secuencias de aminoácidos del anticuerpo se obtienen normalmente secuenciando ADNc que codifican las cadenas pesadas y ligeras de aquellos anticuerpos. Los ADNc se obtienen a partir de células productoras de anticuerpos del animal.

[0045] Cualquier animal adecuado, por ejemplo, un animal de sangre caliente, en particular un mamífero tal como un conejo, ratón, rata, camello, oveja, vaca o cerdo o un ave tal como un pollo o pavo, puede inmunizarse con un antígeno seleccionado usando cualquiera de las técnicas muy conocidas en la técnica adecuadas para generar una respuesta inmunitaria. Los procedimientos para inmunizar animales son muy conocidos en la técnica y se describen en Harlow (Antibodies: A Laboratory Manual, primera edición (1988) Cold Spring Harbor, N.Y.) y Weir (Handbook of Experimental Immunology, vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). En realizaciones particulares puede emplearse un conejo que tiene un genotipo sin definir o definido.

[0046] Dentro del contexto de la presente invención, la frase "antígeno seleccionado" incluye cualquier sustancia para la que un anticuerpo puede prepararse que incluye, entre otros, polipéptidos (incluyendo péptidos), carbohidratos, moléculas inorgánicas u orgánicas, análogos en estado de transición que se parecen a productos intermedios en un procedimiento enzimático, ácidos nucleicos, células, incluyendo células cancerosas, extractos de células, patógenos, incluyendo virus vivos o atenuados, bacterias y similares. Como será apreciado por un experto en la materia, los antígenos que son de baja inmunogenicidad pueden ir acompañados de un adyuvante o hapteno con el fin de aumentar la respuesta inmunitaria (por ejemplo, adyuvante de Freund completo o incompleto) o con un vehículo tal como hemocianina de lapa californiana (KLH). Antígenos adecuados incluyen fragmentos extracelularmente expuestos de Her2, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD20, Lym-1, CD6, receptor de activación del complemento (CAR), EGP40, VEGF, glucoproteína asociada a tumores TAG-72 AFP (alfa-fetoproteína), BLyS (ligando relacionado con TNF y APOL), CA125 (antígeno del carcinoma 125), CEA (antígeno carcinoembrionario), CD2 (antígeno de superficie de linfocitos T), CD3 (heteromultímero asociado a TCR), CD4, CD11a (integrina alfa-L), CD14 (antígeno de diferenciación de monocitos), CD20, CD22 (receptor de linfocitos B), CD23 (receptor de IgE de baja afinidad), CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2), CD30 (receptor de citocinas), CD33 (antígeno de superficie de células mieloides), CD40 (receptor del factor de necrosis tumoral), CD44v6 (media en la adhesión de leucocitos), CD52 (CAMPATH-1), CD80 (coestimulador para CD28 y CTLA-4), componente del complemento C5, CTLA, EGFR,

eotaxina (citocina A11), HER2/neu, HLA-DR, HLA-DR10, HLA clase II, IgE, GPIIb/IIIa (integrina), integrina $\alpha V\beta 3$, integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$, integrina $\beta 2$, IFN-gamma, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6R (receptor de IL6), IL-12, IL-15, KDR (VEGFR-2), Lewis Y, mesotelina, MUC1, MUC 18, NCAM (molécula de adhesión a células neurales), fibronectina oncofetal, PDGFR (receptor del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas), PMSA, antígeno del carcinoma renal G250, RSV, E-selectina, TGFbeta1, TGFbeta2, TNFalfa, TRAIL-R1, VAP-1 (proteína de adhesión vascular 1) o VEGF, o similares.

- 5 **[0047]** En muchas realizaciones, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a una parte de un dominio extracelular de una de las proteínas enumeradas anteriormente se emplea como antígeno.
- 10 **[0048]** Una vez ha sido inmunizado un animal adecuado y una respuesta inmunitaria contra el antígeno ha sido establecida por el animal, las células productoras de anticuerpos del animal se criban para identificar células que producen anticuerpos que tienen una actividad deseada. En muchas realizaciones, estos procedimientos pueden emplear tecnología de hibridomas. Sin embargo, en otras realizaciones, los procedimientos pueden emplear
- 15 citometría de flujo (FACS) de poblaciones de células obtenidas de bazo de conejo, médula ósea, ganglio linfático, plasma u otros órganos linfáticos, por ejemplo, mediante incubación de las células con anti-IgG de conejo marcado y clasificando las células marcadas usando un clasificador de células FACSVantage SE (Becton-Dickinson, San Jose, CA).
- 20 **[0049]** En muchas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios VH y VL de un anticuerpo se aíslan de una célula de hibridoma productora de anticuerpos. Con el fin de producir líneas de hibridoma productoras de anticuerpos, un animal se inmuniza con un antígeno y, una vez se ha establecido una respuesta inmunitaria específica del conejo, las células del bazo del animal inmunizado se fusionan con una célula inmortal adecuada (por ejemplo, célula NIH 3T3, DT-40 ó 240E, etc.; Spieker-Polet y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 9348-9352, 1995) para
- 25 producir células de hibridoma. Los sobrenadantes de estas células de hibridoma se criban para la secreción de anticuerpos por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) y clones positivos que secretan anticuerpos monoclonales específicos para el antígeno pueden seleccionarse y expandirse según procedimientos estándar (Harlow y col., Antibodies: A Laboratory Manual, primera edición (1988) Cold spring Harbor, N.Y.; y Spieker-Polet y col., antes). Los anticuerpos monoclonales adecuados pueden seleccionarse adicionalmente basándose en la
- 30 actividad de unión, que incluye su especificidad de unión, afinidad de unión, avidéz de unión, una actividad de bloqueo o cualquier otra actividad que produzca un efecto (por ejemplo, promoción o inhibición de un fenotipo celular, por ejemplo, crecimiento celular, proliferación celular, migración celular, viabilidad celular (por ejemplo, apoptosis), diferenciación celular, adherencia celular, cambios en la forma de las células (por ejemplo, formación de células tubulares), citotoxicidad dependiente de complemento CDC, citotoxicidad mediada por células dependiente
- 35 de anticuerpos ADCC, activación de receptores, cambios en la expresión génica, cambios en la modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación), cambios en la elección como diana de proteínas (por ejemplo, localización de NFkB, etc.), etc., o inhibición de la multimerización de receptores (por ejemplo, dímero o trimerización) o interacciones receptor-ligando).
- 40 **[0050]** Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos se aíslan de estas células usando técnicas de biología molecular estándar tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o transcripción inversa PCR (RT-PCR) (Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.).
- 45 **[0051]** En realizaciones particulares, las secuencias que codifican al menos las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se amplifican a partir de ADNc usando técnicas muy conocidas en la técnica tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase Mullis, patente de EE.UU. nº 4.683.195; Mullis y col., patente de EE.UU. nº 4.683.195; Polymerase Chain Reaction: Current Communication in Molecular Biology, Cold Springs Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Brevemente, los segmentos de ADNc que codifican el dominio
- 50 variable del anticuerpo se amplifican exponencialmente realizando reacciones secuenciales con una ADN polimerasa. La reacción es cebada por un cebador de ADN de 5' y de 3'. En algunas realizaciones, el cebador antisentido de 3' se corresponde con una secuencia de ADN en la región constante (o de unión) de la cadena de la inmunoglobulina y el cebador de 5' (o panel de cebadores relacionados) se corresponde con una secuencia de ADN en la región variable de la cadena de inmunoglobulina. Esta combinación de cebadores de oligonucleótidos se ha
- 55 usado en la amplificación por PCR de ADNc de inmunoglobulina murina de secuencia desconocida (véase Sastry y col., Proc Natl. Acad. Sci. 86:5728-5732, 1989 y Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3833-3837, 1989). Alternativamente puede realizarse una "reacción en cadena de la polimerasa anclada" (véase Loh y col., Science 243:217-220, 1989). En este procedimiento, el ADNc de la primera cadena se ceba con un cebador de ADN de 3' como antes, y luego se añade una cola de poli(dG) al extremo 3' de la cadena con desoxinucleotidiltransferasa

terminal. Entonces, el producto se amplifica por PCR usando el cebador de ADN de 3' específico y otro oligonucleótido que consiste en una cola de poli(dC) unida a una secuencia con sitios de restricción convenientes. Sin embargo, en muchas realizaciones, el polinucleótido completo que codifica una cadena pesada o ligera se amplifica usando cebadores que atraviesan los codones de iniciación y los codones de terminación de ambos ADNc de inmunoglobulina; sin embargo, dependiendo de los productos de amplificación deseados, pueden usarse cebadores adecuados. En una realización representativa, ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de conejo pueden amplificarse usando los siguientes cebadores: cadena pesada, extremo 5' (CACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTG; SEQ ID NO:49); cadena pesada, extremo 3' (CTCCCGCTCTCCGGGTAAATGAGCGCTGTGCCGCGCA; SEQ ID NO:50); cadena ligera kappa, extremo 5' (CAGGCAGGACCCAGCATGGACACGAGGGCCCCACT; SEQ ID NO:51); y L kappa, extremo 3' (TCAATAGGGGTGACTGTTAGAGCGAGACGCCTGC; SEQ ID NO:52). Sitios de restricción adecuados y otras colas pueden manipularse por ingeniería en los oligonucleótidos de amplificación para facilitar la clonación y el procesamiento adicional de los productos de amplificación. También pueden usarse procedimientos de amplificación usando cebadores anidados, siendo tales cebadores anidados muy conocidos para un experto en la materia. Los dominios variables de los anticuerpos pueden secuenciarse directamente a partir de productos de PCR, o a partir de fragmentos clonados de ADN.

[0052] Por consiguiente un animal se inmuniza con un antígeno y se obtiene la secuencia de aminoácidos de una pluralidad (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 5 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 30 o más, 50 o más, 80 o más 100 o más, normalmente hasta 500 ó 1000 o más) de anticuerpos monoclonales que se unen a ese antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de las células de un único animal inmunizado con el antígeno.

[0053] Una vez se han determinado las secuencias de aminoácidos de los dominios V_H y V_L de un conjunto de anticuerpos de unión a antígeno, los aminoácidos se comparan para identificar un grupo de anticuerpos relacionados que tenga una secuencia similar. Esto puede hacerse numerando las posiciones de aminoácidos de cada anticuerpo usando un sistema de numeración adecuado tal como el proporcionado por Chothia o Kabat, antes. Los residuos de CDR y/o región estructural pueden identificarse usando estos procedimientos. Las secuencias numeradas pueden alinearse a simple vista o empleando un programa de alineamiento tal como uno de los juegos CLUSTAL de programas (Thompson y col. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). Las regiones variables de anticuerpos dentro de un grupo relacionado de anticuerpos tienen secuencias de aminoácidos que son muy similares. Por ejemplo, los dominios V_H o V_L de anticuerpos dentro de un grupo relacionado de anticuerpos pueden tener secuencias de aminoácidos que son idénticas al menos aproximadamente el 90% (por ejemplo, idénticas al menos el 95% o al menos el 98% o al menos el 99%), ignorando cualquier hueco o inserción hecho para facilitar el alineamiento de las secuencias. Los anticuerpos dentro de un grupo relacionado de anticuerpos tienen un dominio V_L que es similar entre sí, además de dominios V_H que son similares entre sí. En otras palabras, en ciertas realizaciones los dominios V_H o V_L de dos anticuerpos relacionados diferentes normalmente contienen hasta aproximadamente cinco (es decir, uno, dos, tres, cuatro o cinco o más) diferencias de aminoácidos. Una diferencia de aminoácidos puede estar presente en cualquier posición del dominio variable, que incluye en cualquier CDR o en cualquier región estructural. Los anticuerpos de conejo relacionados tienen CDR H3 que son casi idénticas, además de CDR L3 que son casi idénticas. En estas realizaciones, dos anticuerpos cualesquiera que están relacionados tendrán CDR L3 y H3 que son cada uno idénticos en longitud y tienen secuencias casi idénticas (es decir, que contienen 0, 1 ó 2 cambios de aminoácidos). En otras palabras, las CDR L3 de los dos anticuerpos son idénticas en longitud y casi idénticas en secuencia y las CDR H3 de los dos anticuerpos son idénticas en longitud y casi idénticas en secuencia. Dos conjuntos a modo de ejemplo de anticuerpos relacionados se muestran en la Fig. 4, y las secuencias de 20 regiones VH3 a modo de ejemplo de anticuerpos de conejo sin relacionar se muestran para comparación.

[0054] Dependiendo del antígeno particular usado, la especie y el genotipo del animal usado, y el número de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos secuenciados, puede identificarse un número relativamente bajo (por ejemplo, inferior a aproximadamente 5 ó 10 grupos). En ciertas realizaciones, sólo uno o dos grupos pueden identificarse. Los anticuerpos dentro de cada grupo muestran más del 90% de secuencia entre sí, mientras que dos anticuerpos cualesquiera de dos grupos diferentes cualesquiera normalmente muestran menos del 90% entre sí a través de la longitud completa de los dominios variables de los anticuerpos.

[0055] Con el fin de identificar una posición sustituible de un anticuerpo, la secuencia de aminoácidos de ese anticuerpo se compara con las secuencias de otros anticuerpos que pertenecen al mismo grupo que ese anticuerpo. Si la identidad de ese aminoácido varía entre los diferentes anticuerpos relacionados de un grupo en cualquier posición particular, entonces la posición es una posición sustituible del anticuerpo. En otras palabras, una posición

sustituible es una posición en la que la identidad del aminoácido varía entre los anticuerpos relacionados. Las posiciones que contienen un aminoácido constante no son posiciones sustituibles.

[0056] Este aspecto de la invención puede ejemplificarse con referencia a la Fig. 2. La Fig. 2 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo de 10 anticuerpos diferentes hipotéticos a modo de ejemplo, que están relacionados. Las secuencias de aminoácidos de las regiones estructurales (FW) de estos anticuerpos se omiten de la Fig. 2, aunque los principios tratados anteriormente y más adelante son fácilmente aplicables a las secuencias de la región estructural. En cada posición, el aminoácido puede ser invariable (es decir, constante) o variable (puede cambiar) de un anticuerpo a otro. En el ejemplo mostrado en la Fig. 2, el aminoácido en las posiciones a, b, d, e, g, h, i, j, k, m, n, o, q, r, s, u, v, w, x, z y α son constantes, mientras que los aminoácidos en las posiciones c, f, l, p, t e y son variables. Las posiciones c, f, l, p, t e y son posiciones sustituibles (o tolerantes a una variación), mientras que las posiciones a, b, d, e, g, h, i, j, k, m, n, o, q, r, s, u, v, w, x, z y α no son posiciones sustituibles.

[0057] En otra realización, el procedimiento anterior puede emplearse para proporcionar una secuencia consenso de anticuerpos. En una secuencia consenso tal, una posición no sustituible está indicada por el aminoácido presente en esa posición, y una posición sustituible está indicada como una "X". Dependiendo de cómo vayan a emplearse los anticuerpos, X puede ser a) cualquier aminoácido, b) cualquier aminoácido presente en esa posición en cualquiera de los anticuerpos relacionados en el grupo o una variante conservativamente sustituida de la misma o c) cualquier aminoácido presente en esa posición en cualquiera de los anticuerpos relacionados en el grupo. Por ejemplo, en el ejemplo mostrado en la Fig. 2, la secuencia consenso de anticuerpos tiene una secuencia: RTXATXCLFQ - FW1 - RXWTVXA - FW2 - PSXSHTVXIT (SEQ ID NO:54) en la que X puede ser cualquier aminoácido, cualquier aminoácido presente en esa posición en un anticuerpo relacionado o un aminoácido conservativamente sustituido presente en esa posición en un anticuerpo relacionado. Cualquier anticuerpo que tenga una secuencia que está englobada por la secuencia consenso deberá unirse al mismo antígeno como cualquiera de los anticuerpos relacionados. Secuencias consenso a modo de ejemplo para las cadenas pesadas y ligeras de tres conjuntos de anticuerpos relacionados que se unen a TNF α se muestran en la Fig. 7. Los aminoácidos no X son los mismos que los mostrados en la posición equivalente de las secuencias de anticuerpos mostradas en la Fig. 4. En ciertas realizaciones, una secuencia consenso puede sólo contener la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR de un anticuerpo.

30 SUSTITUCIÓN DE UN AMINOÁCIDO EN UNA POSICIÓN SUSTITUIBLE El procedimiento descrito anteriormente puede emplearse en procedimientos de diseño y de preparación de una variante de un anticuerpo parental que al menos mantiene (es decir, mantiene o aumenta) la actividad de unión a antígeno del anticuerpo parental. Debido a que los anticuerpos que contienen sustituciones en posiciones sustituibles ya han sido producidos y probados por un animal inmunizado, las sustituciones en esas posiciones pueden hacerse con el conocimiento de que no deben disminuir significativamente la actividad de unión del anticuerpo. En general, una variante de anticuerpo de un anticuerpo parental tiene una afinidad de unión a antígeno que es al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% (por ejemplo, al menos el 150%, al menos el 200%, al menos el 500%, al menos el 1000%, normalmente hasta al menos el 10.000%) de la afinidad de unión del anticuerpo parental a un antígeno particular.

40 [0058] Como se ilustra en la Fig. 1, una posición sustituible de un anticuerpo parental puede estar sustituida por a) uno cualquiera de los 20 aminoácidos que se producen naturalmente para producir sustituciones al azar, b) un aminoácido que tiene propiedades bioquímicas similares a las del aminoácido ya presente en la posición sustituible para producir sustituciones conservativas, c) un aminoácido que está presente en la misma posición en un anticuerpo relacionado para producir una sustitución directa, o d) un aminoácido que está presente en la misma posición en un anticuerpo humano similar para producir una sustitución humanizante. Puede hacerse una sustitución en cualquier parte de una región variable del anticuerpo, que incluye cualquier región estructural o CDR. En ciertas realizaciones, un único aminoácido sustituible puede estar sustituido. Sin embargo, en otras realizaciones, una pluralidad de aminoácidos sustituibles (por ejemplo, hasta aproximadamente 5 ó 10 o más) pueden estar sustituidos. En realizaciones particulares, el tipo de sustitución que puede hacerse en cada posición sustituible puede indicarse por los tipos de aminoácidos presentes en esa posición en los anticuerpos relacionados. Por ejemplo, si los aminoácidos sin relacionar (por ejemplo, Ala, Gly, Cys, Glu y Thr) están presentes en una cierta posición de un grupo de anticuerpos relacionados, entonces cualquier aminoácido podría estar sustituido en esa posición sin reducir significativamente la actividad de unión del anticuerpo. Similarmente, si un subconjunto de aminoácidos no polares (por ejemplo, Val, Ile, Ala y Met) está presentes en una cierta posición de un conjunto de anticuerpos relacionados, entonces otros aminoácidos no polares (por ejemplo, Leu) podrían estar sustituidos en esa posición sin reducir significativamente la actividad de unión del anticuerpo.

[0059] En cualquiera de estos procedimientos, las variantes de anticuerpos resultantes pueden probarse para

confirmar que cualquier actividad de unión no ha sido significativamente reducida por la sustitución. Además, y como se describirá en mayor detalle más adelante, puede producirse una biblioteca de anticuerpos variantes que contiene una pluralidad de aminoácidos sustituidos y cribarse para proporcionar un anticuerpo con una actividad mejorada. Por ejemplo, una o más posiciones sustituibles de un anticuerpo pueden estar sustituidas por cualquier combinación de sustituciones al azar, conservativas o dirigidas para producir una biblioteca de variantes que son cada una individualmente probadas para identificar un anticuerpo que tiene una actividad de unión mejorada.

Sustituciones conservativas

- 10 **[0060]** El aminoácido en una posición sustituible de un anticuerpo puede sustituirse por un aminoácido que tiene propiedades similares (basadas en el tamaño, polaridad, hidrofobia y similares) a las del aminoácido que va a sustituirse. En otras palabras, el aminoácido en una posición sustituible de un anticuerpo puede sustituirse con un aminoácido diferente de la misma clase, pudiendo clasificarse los aminoácidos del siguiente modo: aromáticos: Phe, Tyr, Trp; apolares: Leu, Val, Ile, Ala, Met; alifáticos: Ala, Val, Leu, Ile; ácidos: Asp, Glu; básicos: His, Lys, Arg; polares: Gln, Asn, Ser, Thr, Tyr. En ciertas realizaciones, el aminoácido en una posición sustituible de un anticuerpo puede estar sustituido según la siguiente tabla:

Aminoácido que va a sustituirse	Aminoácido que sustituye
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Sustituciones dirigidas

- 20 **[0061]** El aminoácido en una posición sustituible de un anticuerpo puede sustituirse por un aminoácido diferente que está presente en la misma posición en un anticuerpo relacionado (es decir, un anticuerpo relacionado). Por ejemplo y con referencia a la Fig. 2, la Ala en la posición sustituible c en el anticuerpo 1 podría sustituirse por una Gly, Cys, Glu o Thr, ya que estos aminoácidos se encuentran en la posición sustituible c en los anticuerpos 3, 5, 7 y 10, respectivamente; el cumplimiento en la posición sustituible f en el anticuerpo 1 podría sustituirse con una Val o una Ile, ya es que estos aminoácidos se encuentran en la posición sustituible f en los anticuerpos 4 y 8, respectivamente; el Phe en la posición sustituible 1 en el anticuerpo 1 podría sustituirse con una Tyr o Trp, ya que estos aminoácidos se encuentran en la posición sustituible 1 en los anticuerpos 6 y 9, respectivamente, etc., para las posiciones p, t e y del anticuerpo 1.

30 *Sustituciones humanizantes*

- [0062]** El aminoácido en una posición sustituible de un anticuerpo parental puede sustituirse por un aminoácido diferente que está presente en la misma posición de un anticuerpo humano. En estas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del dominio variable de un anticuerpo parental se compara normalmente con una base de datos de secuencias de anticuerpos humanos, y se selecciona un anticuerpo humano que tiene una secuencia de aminoácidos que es similar a la que del anticuerpo parental. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental y el anticuerpo humano se comparan (por ejemplo, alineadas), y uno o más aminoácidos sustituibles del anticuerpo

parental se sustituyen por aminoácidos correspondientemente posicionados en el anticuerpo humano. Esta realización se ejemplifica en el panel superior de la Fig. 3, en la que todos los aminoácidos sustituibles están sustituidos por su equivalente humano. Los aminoácidos subrayados en negrita de la secuencia humanizada (hmAb) indican aminoácidos que han sido sustituidos. Los aminoácidos doblemente subrayados en negrita no han sido sustituidos ya que el aminoácido "humano" ya estaba presente en el anticuerpo parental.

[0063] En una mejora de esta realización, la sustitución humanizante puede ser una sustitución dirigida en la que un aminoácido en una posición sustituible está sustituida por un aminoácido que está presente en tanto el anticuerpo humano como un anticuerpo relacionado. Esta realización se ilustra en el panel inferior de la Fig. 3. En este figura, la Ala en la posición c del anticuerpo 1 está sustituida con una Thr, en la que una Thr se encuentra en esa posición en tanto el anticuerpo 10 (como se muestra en la Fig. 2) como un anticuerpo humano similar. Además, la Gln en la posición y del anticuerpo 1 está sustituida por una Tyr, en la que una Tyr se encuentra en esa posición en tanto el anticuerpo 9 (como se muestra en la Fig. 2) como un anticuerpo humano similar. Otros aminoácidos sustituibles (es decir, aquellos en las posiciones f, l, p y t) no están sustituidos en esta realización ya que ninguno de los anticuerpos relacionados tienen el mismo aminoácido que el anticuerpo humano en esta posición.

[0064] En otras realizaciones, los aminoácidos de sustitución pueden elegirse ya que son menos polares que los otros aminoácidos y, por tanto, menos inmunogénicos.

[0065] Un anticuerpo humano adecuado para uso en este procedimientos se identifica comparando las secuencias del dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo parental (o una secuencia consenso del conjunto de anticuerpos relacionados) con una base de datos de secuencias de anticuerpos humanos. Normalmente, una de las 10 secuencias más similares en términos de identidad de secuencias de aminoácidos (tanto por identidad en porcentaje como valor P) se empleará como donante de residuos de aminoácidos. En cierta realización, uno de los tres anticuerpos más similares (por ejemplo, el más similar) en términos de identidad de secuencias de aminoácidos (identidad en porcentaje o valor P) a una secuencia de anticuerpos parentales puede usarse como donante de residuos de aminoácidos. El anticuerpo humano seleccionado y el anticuerpo parental normalmente tendrán al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 65% de identidad, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencias de aminoácidos a través de todo el dominio variable en una o ambas de las cadenas secuenciadas. En ciertas realizaciones, tanto las cadenas ligeras como las pesadas del mismo anticuerpo humano pueden usarse como donantes de aminoácidos. En la mayoría de las realizaciones, el anticuerpo parental se compara con secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana.

[0066] Puede buscarse en diversas bases de datos de anticuerpos para identificar las inmunoglobulinas de anticuerpos humanos más homólogas para una secuencia de inmunoglobulina de conejo dada. Además de las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), varias de las bases de datos más comúnmente usadas se enumeran a continuación:

Base de datos V BASE de genes de anticuerpos humanos: esta base de datos es mantenida por el Consejo de investigación médica (MRC), de Cambridge, RU, y se proporciona por la página web: www.mrc-cpe.cam.ac.uk. Esta base de datos es un directorio exhaustivo de todas las secuencias de la región variable de la línea germinal humana compiladas de más de mil secuencias publicadas que incluyen aquellas en las actuales publicaciones de las bibliotecas de datos Genbank y EMBL.

Base de datos Kabat de secuencias de proteínas de interés inmunológico (Johnson, G y Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Research*, 29: 205-206) encontrada en la página web de la Universidad de Northwestern, Chicago (immuno.bme.nwu.edu).

[0067] Base de datos Immunogenetics: mantenida por y fundada en la página web del Instituto europeo de bioinformática: www.ebi.ac.uk. Esta base de datos es una base de datos especializada integrada que contiene información de secuencias de nucleótidos de genes importantes en la función del sistema inmunitario. Recoge y anota secuencias que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas que participan en el reconocimiento inmunitario.

[0068] ABG: directorios de genes de la línea germinal de ratón – un directorio de segmentos de la línea germinal VH y VK de ratón, parte de la página web del Grupo de anticuerpos en el Instituto de Biotecnología, UNAM (Universidad Nacional de México)

[0069] Los motores de búsqueda contruidos pueden usarse para buscar en las secuencias más similares en términos de homología de secuencias de aminoácidos. En los procedimientos de la presente invención, BLAST (Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) se realiza usando parámetros por defecto que incluyen elegir la matriz BLOSUM62, un umbral esperado de 10, separar por filtración de baja complejidad, huecos permitidos y un tamaño de palabra de 3.

[0070] Durante los procedimientos objeto de humanización se hacen una, dos, tres, cuatro, cinco o seis o más, normalmente hasta aproximadamente 10 o más, sustituciones humanizantes de aminoácidos. Los aminoácidos no consecutivos se sustituyen generalmente en estos procedimientos.

[0071] Los procedimientos anteriormente descritos para hacer sustituciones humanizantes en un anticuerpo pueden emplearse como una alternativa a, en combinación con, o además de procedimientos de humanización de anticuerpos conocidos tales como el injerto de CDR y procedimientos de reestructuración tratados en la introducción.

[0072] Por ejemplo, los procedimientos de humanización objeto pueden incorporarse en cualquier procedimiento de humanización que requiera hacer sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo parental para hacerlos más similares a un anticuerpo humano conocido (véase, por ejemplo, las solicitudes de EE.UU. nº de serie 10/638.210 y 10/637.317, ambas presentadas el 7 de agosto de 2003, y otras referencias citadas en los antecedentes, todos incorporados por referencia en este documento en su totalidad). Por ejemplo, muchos procedimientos de humanización anteriores se dirigen a identificar aminoácidos particulares en un anticuerpo parental que puede estar sustituido por un aminoácido humano (es decir, el aminoácido encontrado en la misma posición en un anticuerpo humano). Como mejora de estos procedimientos anteriores, los presentes procedimientos pueden emplearse para identificar cuáles de aquellos aminoácidos particulares son aminoácidos sustituibles y son, por tanto, tolerantes a una variación. Como las sustituciones de aminoácidos en estas posiciones sustituibles son fácilmente toleradas por un anticuerpo (es decir, no disminuyen significativamente la afinidad de unión), pueden hacerse sustituciones humanizantes de aminoácidos sin reducir significativamente la actividad de anticuerpos. Por ejemplo, sólo posiciones sustituibles que están sobre la superficie de un anticuerpo y no en un área significativa de la estructura secundaria pueden sustituirse por un aminoácido humano. Además, el procedimiento puede emplearse en combinación con procedimientos para eliminar epítopes de linfocitos T colaboradores de un anticuerpo tales como los procedimientos de "desinmunización" descritos en la patente de EE.UU. publicada nº 20030153043 y otras. Por ejemplo, sólo pueden hacerse cambios de aminoácidos desinmunizantes que se producen en posiciones sustituibles. Tales cambios no deberán abolir la actividad de los anticuerpos.

[0073] En realizaciones particulares, los procedimientos objeto pueden emplearse para humanizar las CDR de un anticuerpo. Estas realizaciones pueden emplearse, además de otros procedimientos de humanización que están dirigidos a humanizar las regiones estructurales y otras regiones no CDR, por ejemplo, de un anticuerpo.

[0074] Los procedimientos de humanización descritos anteriormente representan una contribución significativa a las técnicas de humanización de anticuerpos debido a que no puede emplearse otro procedimiento de humanización para sustituir sólo aquellas posiciones de un anticuerpo que se sabe que son tolerantes a sustituciones.

[0075] Además, como los presentes procedimientos emplean eficazmente las secuencias de aminoácidos de anticuerpos variantes que se han seleccionado como que tienen fuerte actividad de unión por el sistema inmunitario del animal inmunizado (por maduración por afinidad), el sustituir un aminoácido en una posición sustituible de un anticuerpo identificado por los procedimientos anteriores conduce frecuentemente a un aumento en la afinidad de unión. Esto es particularmente cierto de anticuerpos que han sido sometidos a sustituciones directas como se ha descrito anteriormente. Por consiguiente, en general, los presentes procedimientos de humanización pueden emplearse para humanizar un anticuerpo parental para producir un anticuerpo humanizado que tiene una mayor afinidad de unión por un antígeno que el anticuerpo parental.

PROCEDIMIENTOS PARA MEJORAR LA ACTIVIDAD DE ANTICUERPOS

[0076] En una realización de particular interés, los presentes procedimientos de sustitución pueden emplearse para mejorar una actividad de unión de un anticuerpo parental. Como se observa anteriormente, las posiciones sustituibles identificadas por los procedimientos objeto son sitios que se emplean para mejorar la actividad de unión de un anticuerpo progenitor durante la maduración por afinidad. Se seleccionaron aquellas posiciones, y los aminoácidos presentes en aquellas posiciones en el grupo de anticuerpos relacionados, ya que aumentaron la afinidad de un anticuerpo por un antígeno particular. Combinando los cambios individuales hechos a

un anticuerpo durante la maduración por afinidad puede producirse un anticuerpo que tiene un aumento de la afinidad por un antígeno. Por tanto, en ciertas realizaciones puede hacerse una pluralidad de sustituciones dirigidas en un anticuerpo parental para aumentar la afinidad de ese anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo parental puede modificarse para contener la mayoría de las sustituciones comunes en cada una de las posiciones sustituibles de un grupo de anticuerpos relacionados.

[0077] En un procedimiento relacionado, si se secuencia un número suficiente de anticuerpos (por ejemplo, más de 20 y hasta aproximadamente 50 o más), las actividades de anticuerpos particulares (por ejemplo, afinidad de unión del anticuerpo, avidéz de unión del anticuerpo, especificidad de unión del anticuerpo, etc.) de aquellos anticuerpos pueden guardar relación con cambios de aminoácidos particulares. Este conocimiento permite diseñar y preparar un anticuerpo que tiene una combinación de actividades de unión seleccionada.

[0078] Además, y como se ha mencionado anteriormente, la identificación de posiciones sustituibles de un anticuerpo facilita la producción de bibliotecas de anticuerpos candidatos que van a cribarse para identificar un anticuerpo que tiene una actividad de unión deseada. En un ejemplo, este procedimiento implica hacer cada combinación posible de sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, cualquier combinación de, por ejemplo, sustituciones dirigidas, al azar y/o conservativas) en posiciones sustituibles de un anticuerpo para producir una biblioteca de anticuerpos que puede cribarse para identificar un anticuerpo que tenga propiedades mejoradas.

[0079] Los procedimientos adecuados para cribar anticuerpos son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan, a los siguientes:

Ensayos de unión

[0080] En estos ensayos, cada anticuerpo de una biblioteca objeto se prueba para su capacidad para unirse específicamente a un sustrato. El término "específicamente" en el contexto de la unión de anticuerpos se refiere a alta avidéz y/o alta unión por afinidad de un anticuerpo a un antígeno específico que es un polipéptido o epítipo. En muchas realizaciones, el antígeno específico es un antígeno (o un fragmento o subfracción de un antígeno) usado para inmunizar el animal huésped a partir del cual se aislaron las células productoras de anticuerpos. El anticuerpo que se une específicamente a un antígeno es más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a otros antígenos. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido pueden unirse a otros polipéptidos a un nivel débil, todavía detectable (por ejemplo, el 10% o menos de la unión mostrada al polipéptido de interés). Tal unión débil, o unión de fondo, es fácilmente perceptible a partir del anticuerpo específico que se une a un polipéptido objeto, por ejemplo, usando controles apropiados. En general, los anticuerpos específicos se unen a un antígeno con una afinidad de unión con una K_D de 10^{-7} M o menos, por ejemplo, 10^{-8} M o menos (por ejemplo, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} o menos, 10^{-11} o menos 10^{-12} o menos, o 10^{-13} menos, etc.). En general, un anticuerpo con una afinidad de unión K_D de 10^{-7} M o mayor no es útil porque no se unirá a un antígeno a un nivel detectable usando metodología convencional actualmente usada.

[0081] Normalmente, en la realización de un ensayo de cribado, las muestras de anticuerpos producidas por una biblioteca de células huésped productoras de anticuerpos se depositan sobre un soporte sólido de forma que cada anticuerpo pueda identificarse, por ejemplo, con un número de placa y posición sobre la placa, u otro identificador que permitirá la identificación del cultivo de células huésped que produjo el anticuerpo.

[0082] Los anticuerpos de la invención pueden cribarse para inmunounión específica mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación por complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A, por nombrar algunos. Tales ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, que se incorpora por referencia en este documento en su totalidad). Inmunoensayos a modo de ejemplo se describen brevemente a continuación (pero no están previstos a modo de limitación).

[0083] Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente implican lisar una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (NP-40 o Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0,1%, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, Trasylol al 1%) complementado con inhibidores de proteína fosfatasa y/o

- proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4°C, añadir perlas de proteína A y/o proteína G Sepharose al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4°C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en SDS/tampón de muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para
- 5 inmunoprecipitar un antígeno particular puede evaluarse, por ejemplo, por análisis de transferencia Western. Un experto en la materia estaría informado sobre qué parámetros pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el ruido (por ejemplo, aclarando previamente el lisado celular con perlas Sepharose).
- 10 **[0084]** Los análisis de transferencia Western generalmente implican la preparación de muestras de proteínas, seguido de electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, 8%-20% de SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno) y la transferencia de las muestras de proteínas separadas del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon. Tras la transferencia, la membrana se bloquea en disolución de bloqueo (por ejemplo, PBS con 3% de BSA o leche desnatada), se lava en tampón de
- 15 lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20) y se incuba con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo. Después de esta incubación, la membrana se lava en tampón de lavado, se incuba con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o molécula radiactiva (por ejemplo, ^{32}P o ^{125}I) y después de otro lavado puede detectarse la presencia del antígeno. Un experto en la materia
- 20 estaría informado sobre qué parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo.
- [0085]** Los ELISA implican preparar antígeno, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato
- 25 enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En ELISA, el anticuerpo de interés no tiene que conjugarse con un compuesto detectable; en su lugar, un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable puede añadirse al pocillo. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo puede recubrir el pocillo. En este caso, un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable
- 30 puede añadirse tras la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la materia estaría informado sobre qué parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada, además de otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica.
- [0086]** La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión
- 35 competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno sin marcar y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés por un antígeno particular y las constante de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos por análisis de representaciones de
- 40 Scatchard. La competición con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno se incuba con el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo sin marcar.
- [0087]** Los anticuerpos de la invención pueden cribarse usando procedimientos de inmunocitoquímica en
- 45 células (por ejemplo, células de mamífero tales como células CHO) transfectadas con un vector que permite la expresión de un antígeno o con vector solo usando técnicas comúnmente conocidas en la técnica. Los anticuerpos que se unen a células transfectadas con antígeno, pero no células transfectadas sólo con vector, son específicas de antígeno.
- 50 **[0088]** Sin embargo, en ciertas realizaciones, el ensayo es un ensayo de captura de antígeno y para este fin puede emplearse una matriz o micromatriz de anticuerpos. Los procedimientos para preparar y usar micromatrices de polipéptidos se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.372.483, 6.352.842, 6.346.416 y 6.242.266).
- 55 *Ensayos de inhibidor*
- [0089]** En ciertas realizaciones, el ensayo mide la inhibición específica de un anticuerpo por una interacción entre un primer compuesto y un segundo compuesto (por ejemplo, dos compuestos biopoliméricos) o inhibe específicamente una reacción (por ejemplo, una reacción enzimática). En el ensayo de inhibición de la interacción,

un sustrato de interacción, normalmente un compuesto biopolimérico tal como una proteína, por ejemplo, un receptor, puede unirse a un soporte sólido en un recipiente de reacción. El anticuerpo se añade al recipiente de reacción seguido de un componente de unión detectable para el sustrato, normalmente un compuesto biopolimérico tal como una proteína, por ejemplo, un ligando radiomarcado para el receptor. Después de lavar el recipiente, la inhibición de la interacción puede medirse determinando la cantidad de componente de unión detectable presente en el recipiente. La inhibición de la interacción se produce cuando la unión del componente de unión se reduce más de aproximadamente el 20%, más de aproximadamente el 50%, más de aproximadamente el 70%, más de aproximadamente el 80%, o más de aproximadamente el 90% o el 95% o más, con respecto a un ensayo de control que no contiene anticuerpo.

10

[0090] En el ensayo de inhibición de la reacción, una enzima puede unirse a un soporte sólido en un recipiente de reacción. El anticuerpo se añade normalmente al recipiente de reacción seguido de un sustrato para la enzima. En muchas realizaciones, los productos de la reacción entre la enzima y el sustrato son detectables y, después de un cierto tiempo, la reacción se detiene normalmente. Después de detenerse la reacción, la inhibición de la reacción puede medirse determinando el nivel de producto de reacción detectable presente en el recipiente. La inhibición de la reacción se produce cuando la velocidad de la reacción se reduce más de aproximadamente el 20%, más de aproximadamente el 50%, más de aproximadamente el 70%, más de aproximadamente el 80%, o más de aproximadamente el 90% o el 95% o más, con respecto a un ensayo de control que no contiene anticuerpo.

15

20 *Ensayos in vivo*

[0091] En ciertas realizaciones, los anticuerpos se prueban *in vivo*. En general, el procedimiento implica administrar un anticuerpo monoclonal objeto a un modelo animal para una enfermedad o afección y determinar el efecto del anticuerpo monoclonal sobre la enfermedad o afección del modelo animal. Los ensayos *in vivo* de la invención incluyen controles, en los que controles adecuados incluyen una muestra en ausencia del anticuerpo monoclonal. Generalmente, una pluralidad de mezclas de ensayo se ejecutan en paralelo con diferentes concentraciones de anticuerpo para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Normalmente, una de estas concentraciones sirve de control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

25

30 **ANTICUERPOS SUSTITUIDOS**

[0092] La presente solicitud describe anticuerpos sustituidos que se sustituyen mediante el procedimiento expuesto anteriormente.

35

[0093] En general, un anticuerpo sustituido retiene la especificidad por un antígeno con respecto a un anticuerpo parental, tiene afinidad sustancial (por ejemplo, al menos $10^7 M^{-1}$, al menos $10^8 M^{-1}$, o al menos $10^9 M^{-1}$ a $10^{10} M^{-1}$ o más) por ese antígeno y, si es humanizado, es normalmente menos inmunogénico en un huésped humano, con respecto a un anticuerpo parental.

40

[0094] El nivel de inmunogenicidad de un anticuerpo humanizado con respecto a un anticuerpo de conejo parental en un huésped humano puede determinarse por distintos medios que incluyen administrar a un huésped humano individual una formulación que contiene cantidades equimolares de los dos anticuerpos aislados y medir la respuesta inmunitaria del huésped humano con respecto a cada uno de los anticuerpos. Alternativamente, los anticuerpos parentales y modificados se administran por separado a diferentes huéspedes humanos y se mide la respuesta inmunitaria de los huéspedes. Un procedimiento adecuado para medir la respuesta inmunitaria del huésped con respecto a cada uno de los anticuerpos es por ELISA (descrito en Ausubel, y col., Short Protocols in Molecular Biology, 3^a ed., Wiley & Sons, 1995, UNIT 11-4), en el que una cantidad igual adecuada de cada anticuerpo se aplica en puntos en los pocillos de una placa de microtitulación, y el ensayo se realiza en antisuero policlonal del huésped humano. En la mayoría de las realizaciones, un anticuerpo humanizado objeto es aproximadamente 10% menos inmunogénico, aproximadamente 20% menos inmunogénico, aproximadamente 30% menos inmunogénico, aproximadamente 40% menos inmunogénico, aproximadamente 50% menos inmunogénico, aproximadamente 60% menos inmunogénico, aproximadamente 80% menos inmunogénico, aproximadamente 90% menos inmunogénico o incluso aproximadamente 95% menos inmunogénico que un anticuerpo parental sin

50

55 modificar.

[0095] Dependiendo de las regiones constantes y otras regiones usadas, pueden prepararse varios tipos de anticuerpos que se conocen en la técnica. Además de anticuerpos de longitud completa, los fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos pueden prepararse por los procedimientos objeto. Estos fragmentos incluyen, pero no se

limitan a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs monocatenario (scFv), inmunoglobulinas de una sola cadena (por ejemplo, en las que una cadena pesada, o porción de la misma, y una cadena ligera, o porción de la misma, están fusionadas), Fvs (sdFv) ligados por disulfuro, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos scFv, minicuerpos Fab y scFv diméricos y cualquier otro fragmento que comprenda un dominio V_L y V_H en una conformación de forma que se forme una región de unión a antígeno específica. Los fragmentos de anticuerpos, que incluyen anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la(s) región (regiones) variable(s) sola(s) o en combinación con todo o parte de lo siguiente: un dominio constante de las cadenas pesadas, o porción del mismo, por ejemplo, un dominio transmembrana, y/o citoplásmico CH1, CH2, CH3, en la cadena pesada, y un dominio constante de las cadenas ligeras, por ejemplo, un dominio C_{kappa} o Q_{lambda}, o porción del mismo en la cadena ligera. En la invención también están incluidas cualquier combinación de región (regiones) variable(s) y dominios CH1, CH2, CH3, C_{kappa}, C_{lambda}, transmembrana y citoplásmicos. Por el término "anticuerpo" se indica cualquier tipo de anticuerpo, que incluye aquellos enumerados anteriormente, en el que las cadenas pesadas y ligeras se han apareado naturalmente, como se ha explicado anteriormente, es decir, excluyendo los llamados anticuerpos de "expresión en fago".

15 ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN ANTICUERPOS SUSTITUIDOS

[0096] La solicitud describe además ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo modificado objeto, además de porciones del mismo, que incluye una cadena ligera o pesada, un dominio variable de las cadenas ligeras o pesadas, o una región estructural de un dominio variable de las cadenas ligeras o pesadas. Los ácidos nucleicos objeto se producen por un procedimiento objeto. En muchas realizaciones, el ácido nucleico también comprende una secuencia codificante para un dominio constante tal como un dominio constante de cualquier anticuerpo humano. Los ácidos nucleicos que codifican un péptido conductor de inmunoglobulina humana (por ejemplo MEFGLSWVFLVAILKGVQC, SEQ ID NO:53) pueden manipularse por ingeniería para permitir la secreción de cadenas de anticuerpo.

[0097] Como el código genético y las técnicas recombinantes para manipular ácido nucleico son conocidas, y las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos objeto pueden obtenerse usando el procedimiento descrito anteriormente, el diseño y la producción de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo sustituido está dentro de la habilidad de un experto. En ciertas realizaciones se usan procedimientos convencionales de tecnología de ADN recombinante (Ausubel, y col., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Por ejemplo, las secuencias codificantes de anticuerpos pueden aislarse de células productoras de anticuerpos usando uno cualquiera o una combinación de una variedad de procedimientos recombinantes que no necesitan describirse en este documento. La posterior sustitución, deleción y/o adición de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína también puede hacerse usando técnicas convencionales de ADN recombinante.

[0098] Por ejemplo, la mutagénesis dirigida a sitio y la subclonación pueden usarse para introducir/deleccionar/sustituir residuos de ácido nucleico en un polinucleótido que codifica un anticuerpo. En otras realizaciones puede usarse PCR. Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de interés también pueden prepararse por síntesis química completamente a partir de oligonucleótidos (por ejemplo, Cello y col., Science (2002) 297:1016-8).

[0099] En ciertas realizaciones, los codones de los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de interés están optimizados para la expresión en células de una especie particular, particularmente un mamífero, por ejemplo, la especie humana.

[0100] La solicitud describe además vectores (también denominados en lo sucesivo "constructos") que comprenden un ácido nucleico objeto. En muchas realizaciones de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos objeto se expresarán en un huésped después de que las secuencias se hayan ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión, que incluye, por ejemplo un promotor. Los ácidos nucleicos objeto también están normalmente colocados en un vector de expresión que puede replicar en una célula huésped tanto como un episoma como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.704.362, que se incorpora en este documento por referencia). Los vectores, que incluyen casete individual y dual de vectores de expresión, son muy conocidos en la técnica (Ausubel, y col., Short Protocol in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Vectores adecuados incluyen vectores víricos, plásmidos; cósmidos, cromosomas artificiales (cromosomas artificiales humanos, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, etc.),

minicromosomas y similares. Pueden usarse vectores retrovéricos, adenovéricos y adeno-asociados.

[0101] Está disponible una variedad de vectores de expresión para aquellos expertos en la materia para los fines de producir un polipéptido de interés en una célula. Un vector adecuado es el pCMV, que se usa en ciertas realizaciones. Este vector se depositó en la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) el 13 de octubre de 1998 (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU.) según lo estipulado por el Tratado de Budapest para el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con el fin del procedimiento de patente. El ADN se probó por la ATCC y se determinó que era viable. La ATCC ha asignado el siguiente número de depósito al pCMV: ATCC nº 203351.

10

[0102] Los ácidos nucleicos objeto normalmente comprenden un único marco de lectura abierto que codifica un anticuerpo objeto; sin embargo, en ciertas realizaciones, como la célula huésped para la expresión del polipéptido de interés puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana, el marco de lectura abierto puede estar interrumpido por intrones. El ácido nucleico objeto es normalmente parte de una unidad de transcripción que puede contener, además del ácido nucleico, las regiones sin traducir de 3' y 5' (UTR) que pueden dirigir la estabilidad del ARN, la eficiencia de la traducción, etc. El ácido nucleico objeto también puede ser parte de un casete de expresión que contiene, además del ácido nucleico objeto, un promotor que dirige la transcripción y la expresión de un polipéptido de interés, y un terminador de la transcripción.

15

[0103] Los promotores eucariotas pueden ser cualquier promotor que sea funcional en una célula eucariota, o cualquier otra célula huésped, que incluyen promotores víricos y promotores derivados de genes eucariotas o procariotas. Promotores eucariotas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: el promotor de la secuencia del gen de metalotioneína I de ratón (Hamer y col., J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288, 1982); el promotor TK del virus del herpes (McKnight, Cell 31:355-365, 1982); el promotor temprano del SV40 (Benoit y col., Nature (London) 290:304-310, 1981); el promotor de la secuencia del gen gall de levadura (Johnston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975, 1982); Silver y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:5951-5955, 1984), el promotor del CMV, el promotor de EF-1, el (los) promotor(es) sensible(s) a ecdisoma, promotor sensible a tetraciclina y similares. Los promotores víricos pueden ser de particular interés, ya que son generalmente promotores particularmente fuertes. En ciertas realizaciones se usa un promotor que es un promotor del patógeno diana. Los promotores para uso en la presente invención se seleccionan de forma que sean funcionales en el tipo de célula (y/o animal) en el que están siendo introducidos. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor del CMV.

20

[0104] En ciertas realizaciones, un vector objeto también puede proporcionar la expresión de un marcador de selección. Los vectores y marcadores de selección adecuados son muy conocidos en la técnica y se tratan en Ausubel, y col., (Short Protocol in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995) y Sambrook, y col., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, (2001) Cold Spring Harbor, N.Y.). Se ha empleado una variedad de diferentes genes como marcadores de selección, y el gen particular empleado en los vectores objeto como marcador de selección se elige principalmente como una cuestión de conveniencia. Los genes de marcadores de selección conocidos incluyen: el gen timidina-cinasa, el gen dihidrofolato-reductasa, el gen xantina-guanina-fosforibosil-transferasa, CAD, el gen adenosina-desaminasa, el gen asparagina-sintetasa, los genes de resistencia a antibióticos, por ejemplo, tetr, ampr, Cm^r o cat, kan^r o neor (genes aminoglucósido-fosfotransferasa), el gen higromicina B-fosfotransferasa, y similares.

25

[0105] Los ácidos nucleicos objeto también pueden contener sitios de restricción, sitios de clonación múltiple, sitios de unión a cebador, extremos ligables, sitios de recombinación, etc., normalmente con el fin de facilitar la construcción de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de conejo humanizado.

30

[0106] En general, en la técnica se conocen varios procedimientos para producir ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que incluyen aquellos encontrados en las patentes de EE.UU. 6.180.370, 5.693.762, 4.816.397, 5.693.761 y 5.530.101. Un procedimiento de PCR utiliza "PCR de extensión por solapamiento" (Hayashi y col., Biotechniques. 1994: 312, 314-5) para crear casetes de expresión para los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras. En este procedimiento, múltiples reacciones de PCR por solapamiento usando el producto de ADNc obtenido a partir de la célula productora de anticuerpos y otros ácidos nucleicos apropiados como moldes generan un casete de expresión.

35

40

PROCEDIMIENTOS PARA PRODUCIR ANTICUERPOS

[0107] En muchas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo monoclonal objeto se introducen directamente en una célula huésped, y la célula se incuba en condiciones suficientes para inducir la

expresión del anticuerpo codificado.

[0108] Cualquier célula adecuada para la expresión de casetes de expresión puede usarse como una célula huésped. Por ejemplo, células de levadura, insectos, plantas, etc. En muchas realizaciones se usa una línea de células huésped de mamífero que no produce generalmente anticuerpos, ejemplos de las cuales son las siguientes: células de riñón de mono (células COS), células CVI de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 165 1); células renales embrionarias humanas (HEK-293, Graham y col. J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216, (1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CVI ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma del cuello del útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL 51); células TRI (Mather y col., Annals N. Y. Acad. Sci 383:44-68 (1982)); células NIH/3T3 (ATCC CRL-1658); y células L de ratón (ATCC CCL-1). Líneas celulares adicionales serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Una amplia variedad de líneas celulares está disponible de la Colección americana de cultivos tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209.

[0109] Los procedimientos de introducción de ácidos nucleicos en células son muy conocidos en la técnica. Los procedimientos adecuados incluyen electroporación, tecnología de pistola de partículas, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa y similares. La elección del procedimiento depende generalmente del tipo de célula que se transforma y las circunstancias bajo las cuales está teniendo lugar la transformación (es decir, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). Una discusión general de estos procedimientos puede encontrarse en Ausubel, y col., Short Protocol in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995. En algunas realizaciones se usa lipofectamina y tecnologías de transferencia de genes mediada por calcio.

[0110] Después de que los ácidos nucleicos objeto se hayan introducido en una célula, la célula se incuba normalmente, normalmente a 37°C, algunas veces bajo selección, durante un periodo de aproximadamente 1-24 horas con el fin de permitir la expresión del anticuerpo. En la mayoría de las realizaciones, el anticuerpo es normalmente secretado en el sobrenadante de los medios en los que está creciendo la célula.

[0111] En células huésped de mamífero pueden utilizarse varios sistemas de expresión víricamente basados para expresar un anticuerpo objeto. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpos de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y que puede que exprese la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, véase, Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)). La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner y col., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

[0112] Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de anticuerpos recombinantes puede usarse la expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse por ingeniería líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, las células huésped pueden transformarse con casetes de expresión de inmunoglobulina y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN extraño, puede permitirse que las células manipuladas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en un cromosoma y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Tales líneas celulares manipuladas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

[0113] Una vez se ha producido una molécula de anticuerpo, puede purificarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la Proteína A, y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. En muchas realizaciones, los anticuerpos son secretados por la célula en medio de cultivo y se recogen del medio de cultivo.

DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE UNIÓN DE UN ANTICUERPO

[0114] Una vez se produce un anticuerpo modificado puede probarse para la afinidad usando cualquier procedimiento conocido tal como: 1) análisis de unión competitiva usando un anticuerpo parental marcado (radiomarcado o marcado fluorescente), un anticuerpo modificado y un antígeno reconocido por el anticuerpo parental; 2) resonancia de plasmones superficiales usando, por ejemplo, instrumentación BIACore para proporcionar las características de unión de un anticuerpo. Usando este procedimiento, los antígenos se inmovilizan sobre pastillas de fase sólida y la unión de anticuerpos en fase líquida se mide en un modo en tiempo real; y 3) citometría de flujo, por ejemplo, usando análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) para estudiar la unión de anticuerpos a antígenos de la superficie de la célula; 4) ELISA; 5) diálisis de equilibrio, o FACS. En este procedimiento de FACS, tanto las células transfectadas como las células nativas que expresan el antígeno pueden usarse para estudiar la unión de anticuerpos. Los procedimientos para medir la afinidad de unión se describen generalmente en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, primera edición (1988) Cold spring Harbor, N.Y.; Ausubel, y col., *Short Protocol in Molecular Biology*, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995).

[0115] Si el análisis de afinidad revela una disminución en la unión del anticuerpo para el anticuerpo modificado con respecto a su anticuerpo parental, puede realizarse un “ajuste fino” para aumentar la afinidad. Un procedimiento para hacer esto es cambiar de nuevo sistemáticamente cada residuo modificado por mutagénesis dirigida a sitio. Mediante la expresión y el análisis de estos anticuerpos retromutados se predecirían los residuos clave que no pueden modificarse al menos sin disminuir la afinidad.

UTILIDAD

[0116] Un anticuerpo producido por los presentes procedimientos se usa en diagnóstico, en la obtención de imágenes de anticuerpos y en el tratamiento de enfermedades tratables por terapia basada en anticuerpos monoclonales. En particular, un anticuerpo humanizado por los presentes procedimientos puede usarse para la inmunización pasiva o la eliminación de células o antígenos no deseados tales como por lisis mediada por complemento o citotoxicidad mediada por anticuerpo (ADCC), todos sin reacciones inmunitarias sustanciales (por ejemplo, choque anafiláctico) asociadas a muchos anticuerpos anteriores. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse como un tratamiento para una enfermedad en la que la superficie de una célula no deseada expresa específicamente una proteína reconocida por el anticuerpo (por ejemplo, HER2, o cualquier otro marcador específico de cáncer) o los anticuerpos pueden usarse para neutralizar una toxina no deseable, irritante o patógena. Los anticuerpos humanizados son particularmente útiles para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, etc., en los que los cánceres están asociados a la expresión de un marcador celular particular. Como la mayoría de las células y los patógenos relacionados con la enfermedad, si no todos, tienen marcadores moleculares que son posibles dianas para los anticuerpos, muchas enfermedades son posibles indicaciones para anticuerpos humanizados. Éstas incluyen enfermedades autoinmunitarias en las que un tipo de células inmunitarias particular ataca autoantígenos tales como diabetes mellitus dependiente de insulina, lupus eritematoso sistémico, anemia perniciosa, alergia y artritis reumatoide; activación inmunitaria relacionada con trasplante tal como rechazo de injerto y enfermedad de injerto frente a huésped; otras enfermedades del sistema inmunitario tales como choque séptico; enfermedades infecciosas tales como infección vírica o infección por bacterias; enfermedades cardiovasculares tales como trombosis y enfermedades neurológicas tales como enfermedad de Alzheimer.

[0117] Un anticuerpo de particular interés es uno que modula, es decir, reduce o aumenta un síntoma de la enfermedad o afección del modelo animal al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, o más, cuando se comparó con un control en ausencia del anticuerpo. En general, un anticuerpo monoclonal de interés hará que un animal objeto sea más similar a un animal equivalente que no padece la enfermedad o afección. Anticuerpos monoclonales que tienen valor terapéutico que se han identificado usando los procedimientos y las composiciones de la invención se llaman anticuerpos “terapéuticos”.

KITS

[0118] Por la presente invención también se describen kits para poner en práctica los procedimientos objeto,

como se ha descrito anteriormente. Los kits objeto incluyen al menos uno o más de: un anticuerpo sustituido hecho según los procedimientos anteriores, un ácido nucleico que codifica al mismo, o una célula que contiene el mismo. El anticuerpo sustituido puede humanizarse. Otros componentes opcionales del kit incluyen: enzimas de restricción, cebadores y plásmidos de control; tampones; etc. Los ácidos nucleicos del kit pueden también tener sitios de restricción, sitios de clonación múltiple, sitios de cebador, etc., para facilitar su ligación a ácidos nucleicos que codifican CDR de anticuerpo de no conejo. Los diversos componentes del kit pueden presentarse en recipientes separados o pueden precombinarse ciertos componentes compatibles en un único recipiente, según se desee.

[0119] Además de los componentes anteriormente mencionados, los kits objeto incluyen normalmente adicionalmente instrucciones para usar los componentes del kit para poner en práctica los procedimientos objeto. Las instrucciones para poner en práctica los procedimientos objeto se registran generalmente en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden imprimirse sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Como tales, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto, en el etiquetado del recipiente del kit o componentes del mismo (es decir, asociado al embalaje o subembalaje), etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, por ejemplo, CD-ROM, disquete, etc. En todavía otra realización, las presentes instrucciones no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, mediante internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección web en la que pueden visualizarse las instrucciones y/o de la que pueden descargarse las instrucciones. Al igual que las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones se registra en un sustrato adecuado.

[0120] También se describen kits que incluyen al menos un medio legible por ordenador que incluye programar como se ha tratado anteriormente e instrucciones. Las instrucciones pueden incluir direcciones de instalación o de establecimiento. Las instrucciones pueden incluir direcciones para uso de la invención con opciones o combinaciones de opciones como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, las instrucciones incluyen ambos tipos de información.

[0121] El proporcionar el software y las instrucciones como un kit puede servir a varios fines. La combinación puede embalarse y comprarse como un medio para producir anticuerpos de conejo que son menos inmunogénicos en un huésped de no conejo que un anticuerpo parental, o secuencias de nucleótidos del mismo.

[0122] Las instrucciones se registran generalmente sobre un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden imprimirse sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Como tales, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto, en el etiquetado del recipiente del kit o componentes del mismo (es decir, asociado al embalaje o subembalaje), etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, por ejemplo, CD-ROM, disquete, etc., que incluye el mismo medio en el que se presenta el programa.

40 **EJEMPLOS**

[0123] Los siguientes ejemplos se exponen de manera que se proporcione a aquellos expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretende representar que los experimentos de más adelante son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos por garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero debe contarse con algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique de otro modo, partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio en peso, temperatura es en grados centígrados, y la presión es a o próxima a la atmosférica.

50 **Ejemplo 1**

Identificación de aminoácidos tolerantes a una variación en un anticuerpo monoclonal de conejo anti-TNF α

[0124] Un conejo se inmunizó con TNF α , el bazo de ese conejo se usó para preparar células de hibridoma y las células de hibridoma que expresan anticuerpos monoclonales anti-TNF α se aislaron, los ADNc que codificaban las cadenas pesadas y ligeras de aquellos anticuerpos monoclonales se aislaron de las células aisladas, y se secuenciaron. Los polipéptidos codificados por los ADNc se alinearon según sus características estructurales, y este alineamiento se muestra en la Fig. 4. La Fig. 4 muestra que se obtuvieron dos grupos de Abs monoclonales de

conejo anti-TNF α relacionados. Los anticuerpos 52, 63, y 115 pertenecen a un grupo. Los anticuerpos 1 y 204 pertenecen a un grupo diferente. Las posiciones indicadas por un asterisco (*) son posiciones no variantes, siendo las posiciones indicadas por un punto (.) o dos puntos (:) posiciones tolerantes a variantes. Muchas posiciones tolerantes a variantes están dentro de las CDR.

5

[0125] La Fig. 2 es un alineamiento múltiple de secuencias de la región H3 de diez secuencias de anticuerpos de conejo extraídas de la base de datos Kabat para ilustrar la variación esperada en anticuerpos sin relacionar.

Ejemplo 2

10

Humanización de un anticuerpo monoclonal de conejo anti-TNF α

[0126] La secuencia de un anticuerpo monoclonal A52 de conejo anti-TNF α está alineada con el anticuerpo de la línea germinal humano más similar, L20, y las posiciones tolerantes a una variación del anticuerpo monoclonal de conejo anti-TNF α están sustituidas con aminoácidos en las posiciones correspondientes del anticuerpo L20 para producir un anticuerpo de conejo humanizado (HZD). Los aminoácidos sustituidos están marcados por asteriscos. Según la Fig. 4, la posición 31 (dentro de una CDR) es una posición tolerante a una variación porque es N o S. N se eligió ya que en el anticuerpo de la línea germinal humana se encuentra en esa posición. Según la Fig. 4, la posición 48 (justo fuera de una CDR) es una posición tolerante a una variación debido a que es M o I. I se eligió ya que se encuentra en el anticuerpo de la línea germinal humana en esa posición. Según la Fig. 4, la posición 50 (dentro de una CDR) es una posición tolerante a una variación debido a que es L o V. Esta posición se sustituyó con A ya que A es el aminoácido encontrado en el anticuerpo de la línea germinal humana en esa posición. Según la Fig. 4, la posición 70 (dentro de una región estructural) es una posición tolerante a una variación debido a que es E o Q. Esta posición se sustituyó con D debido a que D se encuentra en el anticuerpo de la línea germinal humana en esta posición. Según la Fig. 4, la posición 95B (dentro de una CDR) es una posición tolerante a una variación debido a que es D o N. Esta posición se sustituyó con N ya que N es menos polar que N y, por tanto, probablemente sera menos inmunogénica.

[0127] Es evidente de los resultados anteriores y la discusión que la invención objeto proporciona un importante medio nuevo para hacer cambios de aminoácidos a un anticuerpo. Como tales, los procedimientos objeto y los sistemas se usan en una variedad de aplicaciones diferentes que incluyen aplicaciones en investigación, agrícolas y terapéuticas y otras aplicaciones. En particular, la invención proporciona un medio para humanizar la región de unión a antígeno (por ejemplo, las regiones CDR) de un anticuerpo no humano. Por consiguiente, la presente invención representa una significativa contribución a la materia.

35

LISTA DE SECUENCIAS

[0128]

<110> COUTO, FERNANDO JOSE REBELO DO
 40 HENDRICKS, KRISTIN B.
 WALLACE, S. ELLEN
 YU, GUO-LIANG
 <120> PROCEDIMIENTOS PARA LA INGENIERÍA DE ANTICUERPOS
 <130> EPIT-013WO
 45 <140> Sin asignar
 <141> 11-02-2005
 <150> 10/984.473
 <151> 11-08-2004
 <160> 48
 50 <170> FastSEQ for Windows versión 4.0
 <210> 1
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 1

Arg Thr Ala Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Gln Ile Thr
 20 25

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 2

Arg Thr Ala Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Asn Ile Thr
 20 25

10 <210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido sintético

<400> 3

Arg Thr Gly Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser His Ser His Thr Val Gln Ile Thr
 20 25

<210> 4

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 4

Arg Thr Ala Ala Thr Val Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Gln Ile Thr
 20 25

25

<210> 5

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 5

Arg Thr Cys Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Gln Ile Thr
 20 25

<210> 6

35 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético
<400> 6

```

Arg Thr Ala Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Tyr Trp Thr Val Thr
 1           5           10           15
Ala Pro Ser Gln Ser His Thr Val Gln Ile Thr
           20           25
    
```

<210> 7

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 7

```

Arg Thr Glu Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Thr
 1           5           10           15
                               2
    
```

```

Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Gln Ile Thr
           20           25
    
```

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 8

```

Arg Thr Ala Ala Thr Ile Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Thr
 1           5           10           15
Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Gln Ile Thr
           20           25
    
```

20 <210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido sintético

<400> 9

```

Arg Thr Ala Ala Thr Val Cys Leu Phe Gln Arg Trp Trp Thr Val Thr
 1           5           10           15
Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Tyr Ile Thr
           20           25
    
```

<210> 10

<211> 27

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 10

```

Arg Thr Thr Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Thr
1      5      10      15
Ala Pro Ser Trp Ser His Thr Val Gln Ile Thr
      20      25

```

<210> 11
 <211> 27
 <212> PRT

- 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> 3, 6, 12, 16, 20, 25
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <400> 11

```

Arg Thr Xaa Ala Thr Xaa Cys Leu Phe Gln Arg Xaa Trp Thr Val Xaa
1      5      10      15
Ala Pro Ser Xaa Ser His Thr Val Xaa Ile Thr
      20      25

```

<210> 12
 15 <211> 27
 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 12

```

Arg Thr Ala Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Thr
1      5      10      15
Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Gln Ile Thr
      20      25

```

- 20 <210> 13
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> H. sapiens
 <400> 13

```

Arg Thr Thr Ala Ser Gly Ala Leu Ala Gln Arg Phe Trp Ala Cys Phe
1      5      10      15
Ala Pro Ala Ala His Gln Thr Val Tyr Thr Thr
      20      25

```

- 25 <210> 14
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 14

```

Arg Thr Thr Ala Thr Gly Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Phe
1      5      10      15
Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Tyr Ile Thr
      20      25

```

- <210> 15
 35 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 15

```

Arg Thr Thr Ala Thr Met Cys Leu Phe Gln Arg Phe Trp Thr Val Thr
 1      5      10      15
Ala Pro Ser Ala Ser His Thr Val Tyr Ile Thr
                20      25
    
```

5 <211> 115

<212> PRT

<213> conejo

<400> 16

```

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

10 <210> 17

<211> 115

<212> PRT

<213> conejo

<400> 17

```

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

15

<210> 18

<211> 115

<212> PRT

<213> conejo

20 <400> 18

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

65 70 75 80
 Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
 85 90 95
 Val Tyr Asn Ser Gly Leu Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 119
 <212> PRT
 5 <213> conejo
 <400> 19

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

<210> 20
 <211> 119
 10 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 20

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

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> conejo
 <400> 21

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

<210> 22
 <211> 112
 10 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 22

```

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

```

<210> 23
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> conejo
 <400> 23

```

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

```

<210> 24
 <211> 110
 10 <212> PRT
 <213> conejo
 <400> 24

```

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

```

<210> 25
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> conejo
 5 <400> 25

```

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

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> H. sapiens
 <400> 26

```

Cys Ala Arg Asp Ile Asn Ser Tyr Gly Tyr Ala Tyr Ala Thr Asp Ile
 1          5          10          15
Trp
    
```

<210> 27
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> H. sapiens
 <400> 27

```

Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Ala Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu Trp
 1          5          10          15
    
```

<210> 28
 20 <211> 15
 <212> PRT
 <213> H. sapiens
 <400> 28

```

Cys Ala Arg Ser Asp Tyr Ser Tyr Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Trp
 1          5          10          15
    
```

25 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> H. sapiens
 <400> 29

```

Cys Ala Arg Arg Val Asp Ser Thr Gly Thr Asp Ile Trp
 1          5          10
    
```

30 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT

<213> H. sapiens
<400> 30

Cys Gly Ser Gly Tyr Tyr Ile Asn Ile Trp
1 5 10

<210> 31
5 <211> 17
<212> PRT
<213> H. sapiens
<400> 31

Cys Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Ser Gly Tyr Thr Tyr Phe Asn Ile
1 5 10 15
Trp

10 <210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> H. sapiens
<400> 32

Cys Ala Arg Gly Cys Pro Gly Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Trp
1 5 10

15 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> H. sapiens
20 <400> 33

Cys Ala Arg Gly Tyr Trp Ser Leu Asp Ile Trp
1 5 10

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
25 <213> H. sapiens
<400> 34

Cys Val Arg Asp Ser Thr Gly Ile Ser Ala Leu Phe Asn Val Trp
1 5 10 15

<210> 35
<211> 16
30 <212> PRT
<213> H. sapiens
<400> 35

Cys Ala Arg Arg Gly Ala Thr Ala Ser His Arg Trp Phe Thr Ile Trp
1 5 10 15

<210> 36
35 <211> 16
<212> PRT
<213> H. sapiens
<400> 36

Cys Gly Ser Gly Ala Asn Ile Glu Asn Glu Phe Phe Asn Ala Ile Trp
1 5 10 15

40 <210> 37
<211> 16
<212> PRT

<213> H. sapiens
<400> 37

Cys Ala Arg Gly Asp Arg Ser His Asp Tyr Asp Tyr Phe Lys Ile Trp
1 5 10 15

<210> 38

5 <211> 18

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 38

Cys Ala Arg Ser Gln Asp Ser Gly Ser His Asp Asp Phe Pro Phe Asn
1 5 10 15
Ile Trp

10 <210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 39

Cys Ala Arg Ser Pro Gly Gly Ile Gly Asp Ala Phe Asp Pro Trp
1 5 10 15

15

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> H. sapiens

20 <400> 40

Cys Ala Arg Gly Trp Val Gly Leu Asn Ile Trp
1 5 10

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

25 <213> H. sapiens

<400> 41

Cys Ala Arg Arg Ala Asp Ser Tyr Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile Trp
1 5 10 15

<210> 42

<211> 14

30 <212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 42

Cys Ala Arg Tyr Gly Ala Ser Val Thr Tyr Phe Asn Ile Trp
1 5 10

<210> 43

35 <211> 17

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 43

Cys Ala Arg Phe Arg Ile Leu Val Ile Val Leu Val Pro Leu Asp Leu
1 5 10 15
Trp

40 <210> 44

<211> 17
 <212> PRT
 <213> H. sapiens
 <400> 44

Cys Ala Arg Gly Ala Thr Met Thr Met Val Arg Gly Trp Leu Asp Leu
 1 5 10 15
 Trp

5 <210> 45
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> H. sapiens
 10 <400> 45

Cys Ala Arg Leu Gly Leu Val Val Val Ile Asn Ile Trp
 1 5 10

<210> 46
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> conejo
 <400> 46

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

<210> 47
 <211> 101
 20 <212> PRT
 <213> H. sapiens
 <400> 47

```

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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
Glu Asp Val Ala Thr Val Tyr Cys Gln Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 85           90           95
Lys Val Glu Ile Lys
           100

```

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 48

```

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

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

```

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diseñar un anticuerpo que comprende:
 5 identificar una posición tolerante a una variación en un anticuerpo parental:
- i) comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental con las secuencias de aminoácidos de una pluralidad de anticuerpos relacionados, en el que dichos anticuerpos relacionados se unen específicamente al mismo antígeno que dicho anticuerpo parental, y en el que dichos anticuerpos relacionados y dicho anticuerpo parental se obtienen de células de un animal no humano individual inmunizado con dicho antígeno; e
- 10 ii) identificando una posición tolerante a una variación como una posición en la que la identidad del aminoácido varía entre los anticuerpos individuales;
 en el que dicho procedimiento comprende además sustituir el aminoácido presente en dicha posición tolerante a una variación para producir un anticuerpo que se une a dicho antígeno con una afinidad de al menos el 10% de la afinidad de unión del anticuerpo parental, y que tiene una secuencia de aminoácidos que es diferente a la de dichos anticuerpos relacionados monoclonales.
- 15
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende
 comparar la secuencia de aminoácidos de una CDR de dicho anticuerpo parental con las CDR de dichos anticuerpos relacionados parentales y
 20 sustituir el aminoácido en dicha CDR.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende
 comparar la secuencia de aminoácidos de una región estructural de dicho anticuerpo parental con la misma región estructural de dichos anticuerpos relacionados parentales y
 25 sustituir el aminoácido en dicha región estructural.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho animal individual es un conejo, ratón o pollo individual.
- 30 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el aminoácido de dicha posición tolerante a una variación está sustituido por un aminoácido presente en una posición correspondiente en uno de dichos anticuerpos relacionados.
6. El procedimiento de cualquier de las reivindicaciones 1-4, en el que el aminoácido en la posición
 35 tolerante a una variación está sustituido por un aminoácido presente en una posición correspondiente en un anticuerpo humano similar.
7. Un procedimiento de humanizar un anticuerpo monoclonal que comprende:
 40 identificar una posición tolerante a una variación de un anticuerpo monoclonal:
- i) comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal con las secuencias de aminoácidos de una pluralidad de anticuerpos relacionados monoclonales, en el que dichos anticuerpos relacionados se unen específicamente al mismo antígeno que dicho anticuerpo parental, y en el que dichos anticuerpos relacionados y dicho anticuerpo parental se obtienen de células de un animal no humano individual inmunizado con dicho antígeno; e
- 45 ii) identificando una posición tolerante a una variación como una posición en la que la identidad del aminoácido varía entre los anticuerpos individuales;
 en el que el procedimiento comprende además sustituir un aminoácido en dicha posición tolerante a una variación por un aminoácido diferente presente en una posición correspondiente de un anticuerpo humano similar para producir un anticuerpo humanizado que se une a dicho antígeno con una afinidad de al menos el 10% de la afinidad de unión del anticuerpo parental.
- 50
8. Un procedimiento de cribado de un anticuerpo monoclonal que tiene actividad mejorada que comprende:
 55 identificar una posición tolerante a una variación de un anticuerpo monoclonal
- i) comparando su secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de una pluralidad de anticuerpos relacionados monoclonales, en el que dichos anticuerpos relacionados se unen específicamente al mismo antígeno que dicho anticuerpo parental, y en el que dichos anticuerpos relacionados y dicho anticuerpo parental se obtienen de células de un animal no humano individual inmunizado con dicho antígeno;

- ii) identificando una posición tolerante a una variación como una posición en la que la identidad del aminoácido varía entre los anticuerpos individuales;
en el que el procedimiento comprende además sustituir un aminoácido en dicha posición tolerante a una variación con un aminoácido diferente para producir un anticuerpo de prueba; y
5 cribar dicho anticuerpo de prueba para actividad mejorada.
9. Un procedimiento de preparación de una secuencia consenso para anticuerpos que se unen a un antígeno particular que comprende:
comparar las secuencias de aminoácidos de una pluralidad de anticuerpos relacionados monoclonales en el
10 que
a) dichos anticuerpos relacionados se unen específicamente al mismo antígeno que dicho anticuerpo parental; y
b) dichos anticuerpos relacionados y dicho anticuerpo parental se obtienen de células de un animal no humano individual inmunizado con dicho antígeno;
15 para identificar una secuencia consenso de aminoácidos para anticuerpos que se unen a dicho antígeno.

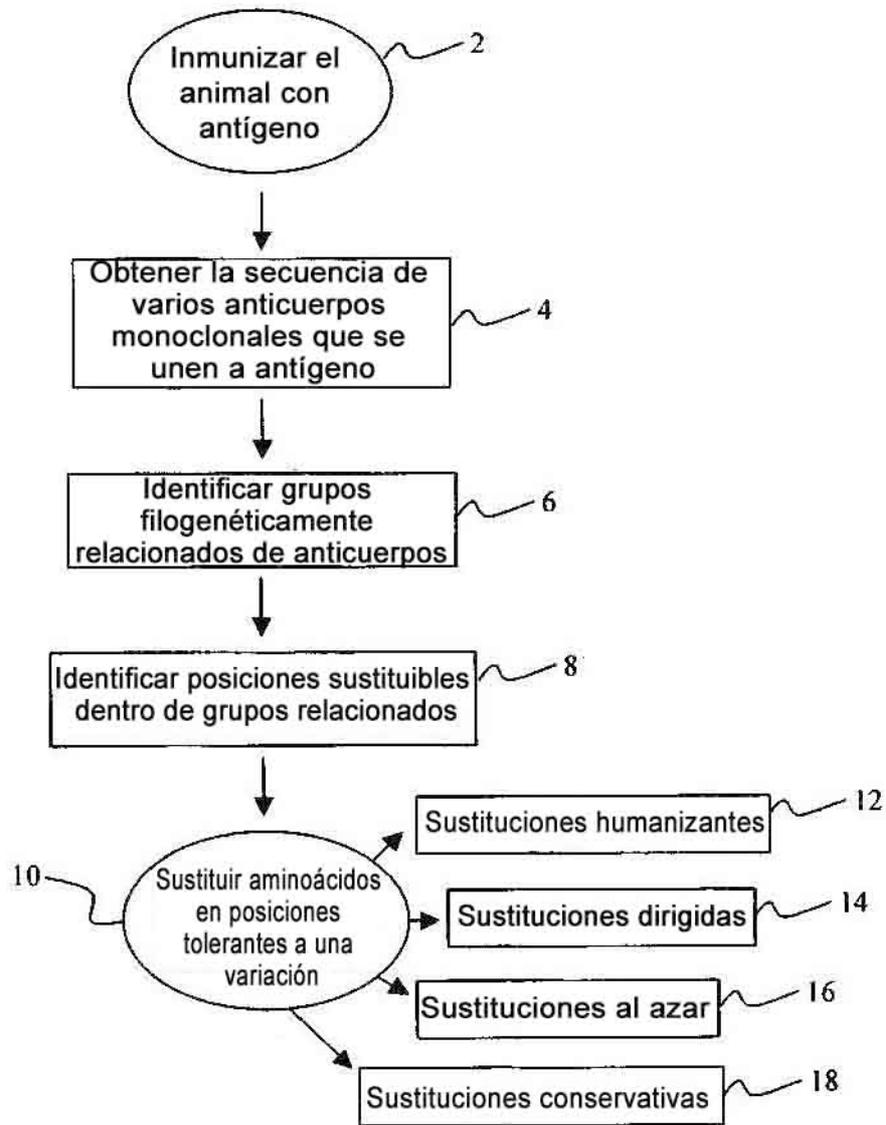


FIG. 1

	----CDR1--	FW1	-CDR2--	FW3	---CDR3---
Posición	abcdefghij		klmnopq		rstuvwxyz α
ANTICUERPO					
1	RTAATMCLEQ	- FW2 -	RFWTVTA	- FW3 -	PSASHTVQIT
2	RTAATMCLEQ	- FW2 -	RFWTV <u>S</u> A	- FW3 -	PSASHTV <u>N</u> IT
3	RT <u>G</u> ATMCLEQ	- FW2 -	RFWTVTA	- FW3 -	PS <u>H</u> SHTVQIT
4	RTAATV <u>C</u> LEQ	- FW2 -	RFWTV <u>S</u> A	- FW3 -	PSASHTVQIT
5	RT <u>C</u> ATMCLEQ	- FW2 -	RFWTVTA	- FW3 -	PSASHTVQIT
6	RTAATMCLEQ	- FW2 -	R <u>Y</u> WTVTA	- FW3 -	PS <u>Q</u> SHTVQIT
7	RTEATMCLEQ	- FW2 -	RFWTVTA	- FW3 -	PSASHTVQIT
8	RTAAT <u>I</u> CLEQ	- FW2 -	RFWTVTA	- FW3 -	PSASHTVQIT
9	RTAATV <u>C</u> LEQ	- FW2 -	R <u>W</u> WTVTA	- FW3 -	PSASHTV <u>Y</u> IT
10	RT <u>T</u> ATMCLEQ	- FW2 -	RFWTVTA	- FW3 -	PS <u>W</u> SHTVQIT
Posiciones VT	--X--X-----		-X--X-----		-X----X--
Consenso	RTXATXCLEQ	- FW1 -	RXWTVXA	- FW2 -	PSXSHTVXIT

FIG. 2

Posición	abcdefghijkl - FW2 -	klmnopq - FW3 -	rstuvwxyzα
ANTICUERPO			
1	RTAATMCLFQ - FW2 -	RFWTVTA - FW3 -	PSASHTVQIT
humano	RTTASGALAQ - FW2 -	RFWACFA - FW3 -	PAAHQTVYTT
Posiciones VT	--X--X-----	X--X-----	X----X-
hmAb	<u>RT</u> TAT <u>G</u> CLFQ - FW2 -	<u>R</u> FWTV <u>F</u> A - FW3 -	PSASHTV <u>Y</u> IT

Posición	abcdefghijkl - FW2 -	klmnopq - FW3 -	rstuvwxyzα
ANTICUERPO			
1	RTAATMCLFQ - FW2 -	RFWTVTA - FW3 -	PSASHTVQIT
humano	RTTASGALAQ - FW2 -	RFWACFA - FW3 -	PAAHQTVYTT
Posiciones VT	--X--X-----	X--X-----	X----X-
hmAb	<u>RT</u> TATMCLFQ - FW2 -	RFWTVTA - FW3 -	PSASHTV <u>Y</u> IT

T se encuentra en esta posición en el anticuerpo 10

Y se encuentra en esta posición en el anticuerpo 9

FIG. 3

FIG. 5

CARDINSYGYAY_____ ATDIW
 CARSGYAGSS_____ YYNLW
 CARSDYSYGG_____ AYDIW
 CARRVDSTG_____ TDIW
 CGSGYYINI_____ W
 CARGGAGISGYT_____ YFNIW
 CARGCPCYG_____ DNDIW
 CARGYWSLD_____ IW
 CVRDSTGISA_____ LFNWV
 CARRGATASHR_____ WFTIW
 CGSGANIENEF_____ FNAIW
 CARGDRSHDYD_____ YFKIW
 CARSQDSGSHDDF_____ PFNIW
 CARSPGGIGD_____ AFDPW
 CARGWVGLN_____ IW
 CARRADSYGY_____ AYDIW
 CARYGASVT_____ YFNIW
 CARFRILVIVLV_____ PLDLW
 CARGATMTMVRG_____ WLDLW
 CARLGLVVV_____ INIW

