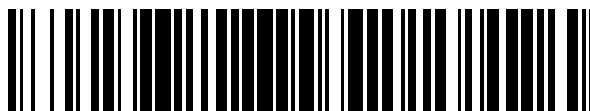


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 979**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05810856 .4**  
96 Fecha de presentación: **02.09.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1784426**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2007**

54 Título: **Antagonistas anti-beta7 humanizados y utilidades para los mismos**

30 Prioridad:  
**03.09.2004 US 607377 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.04.2012**

73 Titular/es:  
**GENENTECH, INC.**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:  
**DENNIS, Mark, S. y**  
**FONG, Sherman**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 377 979 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

Antagonistas anti-beta7 humanizados y utilidades para los mismos

## 5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular y la regulación del factor de crecimiento. Más específicamente, la presente invención se refiere a moduladores de la actividad biológica de integrinas que contienen la subunidad beta7 y las utilidades de dichos moduladores.

10

## ANTECEDENTES

[0002] Las integrinas son receptores  $\alpha/\beta$  de la superficie celular heterodiméricos implicados en numerosos procesos celulares, desde la adhesión celular hasta la regulación génica. Hynes, R.O., *Cell*, 69:11-25 (1992); y Hemler, M.E., *Annu. Rev. Immunol.*, 8:365-368 (1990). Varias integrinas han sido implicadas en procesos patológicos, y han generado un amplio interés como dianas potenciales para el descubrimiento de fármacos. (Sharar, S.R. *et al.*, *Springer Semin. Immunopathol.*, 16:359-378 (1995)). En el sistema inmune, las integrinas están implicadas en el tráfico, adhesión e infiltración de los leucocitos durante los procesos inflamatorios (Nakajima, H. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 179:1145-1154 (1994)). La expresión diferencial de las integrinas regula las propiedades adhesivas de las células, y diferentes integrinas están implicadas en diferentes respuestas inflamatorias. Butcher, E.C. *et al.*, *Science*, 272:60-66 (1996). Las integrinas beta7 (es decir, alfa4beta7 ( $\alpha4\beta7$ ) y alfaEbeta7 ( $\alpha E\beta7$ )) se expresan principalmente en monocitos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y macrófagos, pero no en neutrófilos. Elices, M.J. *et al.*, *Cell*, 60:577-584 (1990). Los ligandos principales para la integrina  $\alpha4\beta7$  son las proteínas de superficie endotelial: molécula de adhesión celular adreína de la mucosa (MAdCAM) y molécula de adhesión celular vascular (VCAM) (Makarem, R. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:4005-4011 (1994). La unión de la  $\alpha4\beta7$  a la MAdCAM y/o VCAM expresada en vénulas de endotelio alto (HEV) en sitios con inflamación da lugar a una firme adhesión del leucocito al endotelio, seguida por la extravasación hacia el tejido inflamado (Chuluyan, H.E. *et al.*, *Springer Semin. Immunopathol.*, 16:391-404 (1995)). Un ligando principal para la integrina  $\alpha E\beta7$  es la proteína de la superficie de linfocitos intraepiteliales (IEL), E-cadherina, que facilita la adherencia de la célula que transporta  $\alpha E\beta7$  a los linfocitos epiteliales. Se ha observado que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la  $\alpha4\beta7$ , MAdCAM o VCAM son moduladores eficaces en modelos animales de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como el asma (Labege, S. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 151:822-829 (1995)), la artritis reumatoide (RA; Barbadillo, C. *et al.*, *Springer Semin. Immunopathol.*, 16:375-379 (1995)), la colitis (Viney *et al.*, *J. Immunol.*, 157:2488-2497 (1996)) y las enfermedades inflamatorias del intestino (IBD; Podalski, D.K., *N. Eng. J. Med.*, 325:928-937 (1991); Powrie, F. *et al.*, *Ther. Immunol.*, 2:115-123 (1995)). Se ha observado que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la subunidad beta7 se unen a la subunidad de la integrina (Tidswell, M. *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:1497-1505) pero como anticuerpos no humanos o no humanizados, carecen de utilidad clínica. Los anticuerpos monoclonales humanizados o fragmentos de unión de antígeno que inhiben la adhesión de leucocitos que expresan una integrina que contiene la cadena  $\beta7$  han sido propuestos por Wo96/24673.

40

[0003] Existe la necesidad de compuestos altamente específicos, tales como anticuerpos humanizados o fragmentos de unión de los mismos que inhiben la interacción entre la integrina alfa4beta7 y sus ligandos MAdCAM y/o VCAM, así como la interacción entre la integrina alfaEbeta7 y su ligando E-cadherina. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, tales como asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes, complicaciones del trasplante de órganos, y trastornos relacionados con aloinjertos.

45

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0004] La invención es tal como se define en las reivindicaciones y, en parte, se basa en la identificación de una variedad de antagonistas de mecanismos biológicos que implican integrinas que contienen beta7, que son procesos generalmente biológicos/celulares que se presenta como una diana terapéutica importante y ventajosa. Dichos mecanismos biológicos incluyen, sin limitación, la inflamación, particularmente los trastornos de inflamación crónica, tales como asma, alergia, IBD, diabetes, trasplantes y trastornos de injertos frente a huésped. La invención proporciona composiciones y métodos basados en la interferencia con la adhesión y/o reclutamiento celular mediado por integrina, incluyendo, pero sin limitación, la interferencia con la unión de MAdCAM y VCAM-1 a la parte extracelular de la integrina alfa4beta7 y la interacción de E-cadherina con la interacción de la integrina alfaEbeta7. Los antagonistas de la invención, tal como se describe aquí, proporcionan agentes terapéuticos y de diagnóstico importantes para utilizar en el reconocimiento de condiciones patológicas asociadas con la señalización anormal o no deseada a través de una integrina beta7. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos, y composiciones, relacionadas con la modulación de mecanismos mediados por la integrina beta7, incluyendo la modulación de la unión MAdCAM-alfa4beta7 y el reclutamiento de leucocitos al epitelio gastrointestinal, la unión y la alergia, asma, IBD (tales como la enfermedad de Crohn y al colitis ulcerosa), diabetes, inflamación asociada con el trasplante, trastorno de injerto frente a huésped y/o trastornos de aloinjertos y otras actividades biológicas/fisiológicas mediadas por integrina beta7.

65

[0005] En un aspecto, la presente invención proporciona agentes terapéuticos anti-beta7 adecuados para el uso

5 terapéutico y son capaces de realizar grados variantes de alteración de un mecanismo mediado por la integrina beta7. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-beta7 humanizado, donde el anticuerpo como fragmento Fab tiene sustancialmente la misma afinidad de unión a la beta7 humana que un fragmento Fab murino que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada tal como se describe en las figuras 1A y 1B o figuras 9A y 9B. También se describen aquí que no son parte de la invención reivindicada, un anticuerpo anti-beta7 humanizado en el que el anticuerpo como fragmento Fab tiene una afinidad de unión a beta7 humana inferior, por ejemplo, por lo menos 3, por lo menos 5, por lo menos 7 o por lo menos 10 veces inferior, que la de un fragmento Fab murino o de rata que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada tal como se describe en las figuras 1A y 1B o las secuencias de dominio variable en las figuras 9A y 9B. Una realización de la invención, un anticuerpo anti-beta7 humanizado, o fragmento de unión a beta7 del mismo, de la invención muestra una afinidad monovalente a beta7 humana, cuya afinidad es sustancialmente la misma o superior a la afinidad monovalente a beta7 humana de un anticuerpo que comprende secuencias variables de cadena ligera y cadena pesada representadas en las figuras 1A (SEC ID NO:10) y/o la Figura 1B (SEC ID NO:11), o la figura 9A (SEC ID NO:12) y/o la figura 9B (SEC ID NO:13). El anticuerpo o fragmento de unión del mismo que tiene una gran afinidad a beta7 humana muestra una afinidad que es por lo menos 2 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 100 veces, por lo menos 500 veces, por lo menos 1000 veces, por lo menos 5000 veces o por lo menos 10.000 veces mayor que un anticuerpo que comprende las secuencias de cadena ligera y cadena pesada representadas en la figura 1A (SEC ID NO:10) y/o figura 1B (SEC ID NO:11), o la figura 9A (SEC ID NO:12) y/o la figura 9B (SEC ID NO:13).

25 **[0006]** En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo humanizado anti-beta7, en el que el anticuerpo como fragmento Fab tiene una afinidad de unión a beta7 humana que es superior, por ejemplo, por lo menos 3, por lo menos 5, por lo menos 7, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, o por lo menos 100 veces mayor que la de un fragmento Fab de roedor (tal como rata o murino) que comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada representada en la figura 1A y la figura 1B, respectivamente. En una realización, dicho fragmento Fab de roedor tiene la afinidad de unión de un fragmento de Fab que comprende secuencias de dominio variable de un anticuerpo de rata designado como FIB504.64 producido por la línea de células de hibridoma depositada bajo el Número de Acceso de la American Type Culture Collection ATCC HB-293. En una realización adicional, un fragmento de Fab humanizado de la invención tiene la afinidad de unión de un fragmento de Fab que comprende secuencias del dominio variable de un anticuerpo producido por cualquiera de los anticuerpos anti-beta7 humanizado de la invención. Tal como se establece en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor se puede determinar utilizando cualquiera de un conjunto de ensayos y se expresa en términos de un conjunto de valores cuantitativos. Por consiguiente, en una realización, la afinidad de unión se expresa como los valores Kd y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidéz minimizados). En general y preferiblemente, la afinidad de unión se mide in vitro, ya sea en una disposición libre de células o asociado a células. Tal como se describe con más detalle aquí, la diferencia en veces en la afinidad de unión se puede cuantificar en términos de la proporción del valor de la afinidad de unión de un anticuerpo humanizado en forma de Fab y el valor de afinidad de unión de un anticuerpo Fab de referencia/comparador (por ejemplo, un anticuerpo murino que tiene secuencias de la región hipervariable dadora), donde los valores de la afinidad de unión se determinan bajo condiciones de ensayo similares. De este modo, en una realización, la diferencia en veces en la afinidad de unión se determina como la proporción de los valores de Kd del anticuerpo humanizado en forma de Fab y dicho anticuerpo de Fab de referencia/comparador. Se puede utilizar cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en este documento, para obtener mediciones de afinidad de unión, incluyendo, por ejemplo, Biacore® (Biacore International Ab, Uppsala, Sweden) y ELISA.

50 **[0007]** También se describe aquí, pero no forma parte de la invención reivindicada, un anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-beta7 o fragmento de unión a beta7 del mismo, que comprende:

- (a) por lo menos una, dos, tres, cuatro o cinco de secuencias de la región hipervariable (HVR) seleccionadas del grupo que consiste en:
- (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, en la que A1-A11 es RASESVDTYLH (SEC ID NO:1)
  - (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B8, en la que B1-B8 es KYASQSSIS (SEC ID NO:2)
  - 55 (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la que C1-C9 es QQGNSLPNT (SEC ID NO:3)
  - (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la que DL-D10 es GFFTTNNYWG (SEC ID NO:4)
  - (v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E17, en la que E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEC ID NO:5); y
  - (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F2-F11, en la que F2-F11 es MTGSSGYFDF (SEC ID NO:6).

60 **[0008]** También se describe aquí un polipéptido o anticuerpo que comprende por lo menos una variante de HVR, en la que la secuencia de la variante de HVR comprende la modificación de por lo menos un residuo de por lo menos una de las secuencias representadas en SEC ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9. También se describe aquí un anticuerpo anti-beta7 o fragmento de unión a beta7 del mismo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVR) seleccionadas del grupo que consiste en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en las que:

65 (i) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos RASESVDTYLH (SEC ID NO:1); RASESVDLLH (SEC ID

NO:7), RASESVDTLLH (SEC ID NO:8), o RASESVDDLLH (SEC ID NO:9);  
 (ii) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos KYASQSIG (SEC ID NO:2), RYASQSIG (SEC ID NO:67, o XYASQSIG (SEC ID NO:68, donde X representa cualquier aminoácido),  
 (iii) HVR-L3 comprende QGNSLPNT (SEC ID NO:3),  
 (iv) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos GFFITNNYWG (SEC ID NO:4),  
 (v) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos GYISYSGSTSYNPSLKS (SEC ID NO:5), y  
 (vi) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos MTGSSGYFDF (SEC ID NO:6) o RTGSSGYFDF (SEC ID NO:66) para las posiciones relativas F2-F11; o comprende la secuencia de aminoácidos F1-F11, en la que F1-F11 es AMTGSSGYFDF (SEC ID NO:63), ARTGSSGYFDF (SEC ID NO:64), o AQTGSSGYFDF (SEC ID NO:65).

**[0009]** También se describe aquí un anticuerpo anti-beta7 o fragmento de unión a beta7 del mismo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVRs) seleccionadas del grupo que consiste en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en las que:

(i) HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos A1-A11, en la que A1-A11 es RASESVDTYLH (SEC ID NO:1); RASEVDSLH (SEC ID NO:7), RASESVDTLLH (SEC ID NO:8), o RASESVDDLLH (SEC ID NO:9) o una variante de las SEC ID NOs:1, 7, 8 o 9 en la que el aminoácido A2 se selecciona del grupo que consiste en A, G, S, T, y V y/o el aminoácido A3 se selecciona del grupo que consiste en S, G, I, K, N, P, Q, R, y T, y/o A4 se selecciona del grupo que consiste en E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N, y R, y/o el aminoácido A5 se selecciona del grupo que consiste en S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, y V, y/o el aminoácido A6 se selecciona del grupo que consiste en V, R, I, A, G, K, L, M, y Q, y/o el aminoácido A7 se selecciona del grupo que consiste en D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, y T, y/o el aminoácido A8 se selecciona del grupo que consiste en D, G, N, E, T, P y S, y/o el aminoácido A9 se selecciona del grupo que consiste en L, Y, I y M, y/o el aminoácido A10 se selecciona del grupo que consiste en L, A, I, M, y V y/o el aminoácido A11 se selecciona del grupo que consiste en H, Y, F, y S;

(ii) HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos B1-B8, en la que B1-B8 es KYASQSIG (SEC ID NO:2), RYASQSIG (SEC ID NO:67, o XYASQSIG (SEC ID NO:68, donde X representa cualquier aminoácido) o una variante de SEC ID NOs:2, 67 o 68 en la que el aminoácido B1 se selecciona del grupo que consiste en K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y y X (donde X representa cualquier aminoácido), y/o el aminoácido B4 se selecciona del grupo que consiste en S and D, y/o el aminoácido B5 se selecciona del grupo que consiste en Q y S, y/o el aminoácido B6 se selecciona del grupo que consiste en S, D, L, y R, y/o el aminoácido B7 se selecciona del grupo que consiste en I, V, E, y K;

(iii) HVR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos C1-C9, en la que C1-C9 es QGNSLPNT (SEC ID NO:3) o una variante de SEC ID NO:3 en la que el aminoácido C8 se selecciona del grupo que consiste en N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M, y Y;

(iv) HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos D1-D10 en la que D1-D10 es GFFITNNYWG (SEC ID NO:4),

(v) HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos E1-E17 en la que E1-E17 es GYISYSGSTSYNPSLKS (SEC ID NO:5), o una variante de SEC ID NO:5 en la que el aminoácido E2 se selecciona del grupo que consiste en Y, F, V, y D, y/o el aminoácido E6 se selecciona del grupo que consiste en S y G, y/o el aminoácido E10 se selecciona del grupo que consiste en S y Y, y/o el aminoácido E12 se selecciona del grupo que consiste en N, T, A, y D, y/o el aminoácido 13 se selecciona del grupo que consiste en P, H, D, y A, y/o el aminoácido E15 se selecciona del grupo que consiste en L y V, y/o el aminoácido E17 se selecciona del grupo que consiste en S y G, y

(vi) HVR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos F2-F11 en la que F2 -F11 es MTGSSGYFDF (SEC ID NO:6) o RTGSSGYFDF (SEC ID NO:66); o comprende la secuencia de aminoácidos F1-F11, en la que F1-F11 es AMTGSSGYFDF (SEC ID NO:63), ARTGSSGYFDF (SEC ID NO:64), o AQTGSSGYFDF (SEC ID NO:65), o una variante de SEC ID NOs: 6, 63, 64, 65, o 66 en la que el aminoácido F2 es R, M, A, E, G, Q, S, y/o el aminoácido F11 se selecciona del grupo que consiste en F y Y.

**[0010]** El aminoácido en la posición 71 del armazón de la cadena pesada (según el sistema de numeración Kabat) se puede seleccionar del grupo que consiste en R, A, y T, y/o el aminoácido en la posición 73 del armazón de la cadena pesada (sistema de numeración Kabat) se puede seleccionar del grupo que consiste en N y T, y/o el aminoácido en la posición 78 del armazón de cadena pesada (sistema numeración de Kabat) se puede seleccionar del grupo que consiste en F, A, y L.

**[0011]** En ciertas realizaciones descritas aquí, la HVR-L1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEC ID NO:1. En una realización, HVR-L2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEC ID NO:2. En una realización, HVR-L3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEC ID NO:3. En una realización, HVR-H1 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEC ID NO:4. En una realización, HVR-H2 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEC ID NO:5. En una realización, HVR-H3 de un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de SEC ID NOs:6 ó 66 para las posiciones relativas F2-F11 o SEC ID NOs:63 ó 64, para las posiciones relativas F1-F11. En una realización, HVR-L1 comprende RASEVDSLH (SEC ID NO: 7). En una realización, HVR-L1 comprende RASESVDTLLH (SEC ID NO: 8). En una realización, HVR-L1 comprende RASESVDDLLH (SEC ID NO:9). Los anticuerpos de la invención que comprenden estas secuencias (en combinaciones descritas aquí) son humanizados.

**[0012]** En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs, en las que cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y en la que las SEC ID NO: 7, 8 ó 9 corresponden a una

HVR-L1, la SEC ID NO:2 corresponde a una HVR-L2, la SEC ID NO:3 corresponde a una HVR-L3, la SEC ID NO:4 corresponde a una HVR-H1, la SEC ID NO:5 corresponde a una HVR-H2, y la SEC ID NO:6 corresponde a una HVR-H3. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende las SEC ID NO:7, 2, 3, 4, 5 y 6. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende las SEC ID NO:8, 2, 3, 4, 5 y 6. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende las SEC ID NO:9, 2, 3, 4, 5 y 6. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en la que cada una en orden, comprende las SEC ID NO:9, 2, 3, 4, 5 y 66, o las SEC ID NO:9,2, 3,4, 5, 63 o SEC ID NO:9,2,3,4, 5, 64. Se describen aquí anticuerpos en los que hay una modificación de HVR y/o armazón incluyendo en la que A8 en una variante de HVR-L1 es S, D o T.

[0013] En ciertas realizaciones, según la invención, por lo menos una parte de la secuencia del armazón es una secuencia de armazón consenso humana.

[0014] Se describen aquí, pero no son parte de la invención tal como se reivindica, un anticuerpo en el que : una variante de HVR-L1 comprende 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: A2 (G, S, T, o V); A3 (G, I, K, N, P, Q, R, o T), A4 (A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, o V), A5 (A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, o Y), A6 (A, G, I, K, L, M, Q, o R), A7 (A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T, o V), A8 (S, D, E, G, P, o N) y A9 (L, I, o M), A10 (A, I, M, o V), y A11 (F, S, o Y); o una variante de HVR-L2 comprende 1-4 (1, 2, 3, ó 4) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: B1 (N), B5 (S), B6 (R o L), y B7 (T, E, K, o V); o una variante de HVR-L3 comprende por lo menos una sustitución en la posición C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T, o V); o una variante de HVR-H2 comprende 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E2 (V, D, ó F), E6 (G), E10 (Y), E12 (A, D, o T), E13 (D, A, o H), E15 (V), E17 (G); o una variante de HVR-H3 comprende 1 ó 2 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: F2 (A, E, G, Q, R, o S), y F11 (Y).

[0015] La presente invención proporciona un anticuerpo que comprende: una HVR-L1 que tiene la secuencia de SEC ID NO:7; y una HVR-L1 que tiene la secuencia de SEC ID NO:8; o una HVR-L1 que tiene la secuencia de SEC ID NO:9. Ciertos anticuerpos, según la invención, comprenden una secuencia de armazón consenso de cadena pesada de subgrupo III humano de cade pesada que comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78.

[0016] La sustitución puede ser R71A, N73T y/o N78A.

[0017] Ciertos anticuerpos según la invención comprenden una HVR-L3 que tiene la secuencia de SEC ID NO:3.

[0018] En algunos anticuerpos, según la invención, A8 en HVR-L1 es S.

[0019] En otros, A8 en HVR-L1 es D.

[0020] En algunos anticuerpos, según la invención, A9 en HVR-L1 es L.

[0021] Aquí se describe son anticuerpos en los que una secuencia armazón entre la secuencia E1-E17 y F1-F11 es HFR3-1-HFR3-31 y donde HFR3-6 es A o R, HFR3-8 es N o T, y HFR3-13 es L o A o F.

[0022] Ciertos anticuerpos anti-beta7 humanizados según la invención presentan afinidad monovalente del anticuerpo a beta7 humana que es sustancialmente la misma que la afinidad monovalente de un anticuerpo de rata que comprende una secuencia variable de cadena ligera y cadena pesada representada en la figura 9.

[0023] Ciertos anticuerpos anti-beta7 humanizados según la invención presentan afinidad monovalente del anticuerpo a beta7 humana que es por lo menos 3 veces superior a la afinidad monovalente de un anticuerpo de rata que comprende una secuencia variable de cadena ligera y cadena pesada representada en la figura 9.

[0024] El anticuerpo de rata se puede producir mediante una línea celular de hibridoma depositada según el número de acceso de la American Type Culture Collection ATCC con la designación HB-293.

[0025] La afinidad de union se puede expresar como un valor de Kd.

[0026] La afinidad de union se puede medir mediante Biacore™ o radioinmunoensayo.

[0027] El anticuerpo de la invención puede comprende una secuencia de armazón consenso de cadena ligera del subgrupo κ 1 humano.

[0028] El anticuerpo de la invención puede comprende una secuencia armazón consenso de cadena pesada del subgrupo III humano de cadena pesada.

**[0029]** El anticuerpo de la invención puede comprender una secuencia armazón que comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78.

5 **[0030]** La sustitución puede ser R71A, N73T y/o N78A o en la que el aminoácido sustituido en la posición 71 es R o A, y/o la sustitución de aminoácidos en la posición 78 es N o T, y/o la sustitución de aminoácido en la posición 78 es L o A o F.

**[0031]** La sustitución puede ser L78F o A78F o A78L o L78A.

10 **[0032]** La invención también proporciona un método de inhibición de la interacción de una subunidad de integrina beta7 humana con una segunda subunidad de integrina y/o un ligando in vitro mediante el contacto del anticuerpo reivindicado con la segunda subunidad de integrina y/o el ligando.

15 **[0033]** La segunda subunidad de integrina puede ser la subunidad de integrina alfa4, y el ligando puede ser MAdCAM, VCAM o fibronectina.

**[0034]** La subunidad de integrina alfa4 puede ser humana.

20 **[0035]** El ligando puede ser humano.

**[0036]** La segunda subunidad de integrina puede ser la subunidad de integrina alfaE y el ligando E-cadherina.

**[0037]** La subunidad de integrina alfaE puede ser humana.

25 **[0038]** El ligando puede ser humano.

**[0039]** Ciertos anticuerpos para utilizar según la invención reducen o alivian síntomas de un trastorno seleccionado entre la inflamación, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes, inflamación resultante del trasplante de órganos, trastorno de injerto frente a huésped, e inflamación asociada con trastorno de aloinjertos.

30 **[0040]** La HVR-L1 es la SEC ID NO: 7, 8, ó 9. También se describe aquí una variante de HVR-L1 de la SEC ID NO:1, 7, 8, ó 9 que comprende 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10) sustituciones en las posiciones relativas A1-A11, en cualquier combinación de las siguientes posiciones: A2 (A, G, S, T, o V); A3 (S, G, I, K, N, P, Q, R, o T), A4 (E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, o V), A5 (S, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, o Y), A6 (V, A, G, I, K, L, M, Q, o R), A7 (D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T, o V), A8 (T, S, D, E, G, P, o N) y A9 (Y, L, I, o M), A10 (L, A, I, M, o V), y A11 (H, F, S, o Y). Una HVR-L2 puede ser la SEC ID NO:2, 67, ó 68 o una variante de HVR-L2 de la SEC ID NO:2, 67, ó 68 cuya variante de HVR-L2 comprende 1-4 (1, 2, 3, 4, 4 ó 5) sustituciones en las posiciones relativas B1-B8, en cualquier combinación de las siguientes posiciones: B1 (K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y o X (donde X representa cualquier aminoácido)), B4 (S), B5 (Q o S), B6 (S, R o L), y B7 (I, T, E, K, o V). Una HVR-L3 es la SEC ID NO:3 o una variante de HVR-L3 de la SEC ID NO:3 que comprende por lo menos una sustitución en las posiciones relativas C1-C8, tal como en la posición C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T, o V). La HVR-H1 puede ser la SEC ID NO:4. En una realización, una HVR-H2 es la SEC ID NO:5. También se describe aquí una variante de HVR-H2 de la SEC ID NO:5 cuya variante de HVR-H2 comprende 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7) sustituciones en las posiciones relativas E1-E17 en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E2 (Y, V, D, o F), E6 (S o G), E10 (S o Y), E12 (N, A, D, o T), E13 (P, D, A, o H), E15 (L o V), E17 (S o G). En una realización, una HVR-H3 es la SEC ID NOs:6, 63, 64 ó 66. También se describe aquí una variante de HVR-H3 de la SEC ID NOs:6, 63, 64, 65, ó 66 que comprende en las posiciones relativas F1-F11 para las SEC ID NOs:63, 64, y 65 o en las posiciones relativas F2-F11 para las SEC ID NOs:6 y 66, 1 ó 2 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: F2 (M, A, E, G, Q, P, o S), y F11 (F o Y). La letra o letras en paréntesis después de cada posición indica un aminoácido de sustitución ilustrativo (es decir, reemplazo) para un aminoácido consenso u otro aminoácido tal como sería evidente para un experto en la materia, la adecuación de otros aminoácidos como aminoácidos de sustitución en el contexto descrito aquí se puede valorar de manera rutinaria utilizando técnicas conocidas en el sector y/o descritas aquí.

55 **[0041]** También se describe aquí una HVR-L1 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 1. A8 en una variante de HVR-L1 puede ser D o S. A9 en una variante de HVR-L1 puede ser L. En algunos casos, A8 en una variante de HVR-L1 es D y A9 en una variante de HVR-L1 es L. En otros casos, A8 en una variante de HVR-L1 es S y A9 en una variante de HVR-L1 es L. Un anticuerpo puede comprender estas variaciones en la HVR-L1 y la HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 comprende o consiste en o consiste esencialmente en, en orden, SEC ID NO:2, 3, 4, 5, y 6. La HVR-H3 puede comprender o consistir en o consistir esencialmente en SEC ID NO:6 ó 66 (para las posiciones relativas F2-F11) o SEC ID NO:63 ó 64 ó 65 (para las posiciones relativas F1-F11).

60 **[0042]** En algunos anticuerpos descritos aquí, A8 en una variante de HVR-L1 es I y A9 en una variante de HVR-L1 es L, cuya variante comprende además la HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO:2, 3, 4, 5, y 6.

- [0043] En otros, A8, A9, y A10 en una variante de HVR-L1 son D, L, y V, respectivamente, cuya variante comprende además la HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO:2, 3, 4, 5, y 6.
- 5 [0044] En otros, A8 y A9 en una variante de HVR-L1 son N y L, respectivamente, cuya variante comprende además la HVRL2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO:2, 3, 4, 5, y 6.
- 10 [0045] En otros, A8 y A9 en una variante de HVR-L1 son P y L, respectivamente, y B6 y B7 en una variante de HVR-L2 son R y T, respectivamente, cuya variante comprende además la HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO: 3, 4, 5, y 6.
- 15 [0046] A2, A4, A8, A9, y A10 en una variante de HVR-L1 pueden ser S, D, S, L, y V, respectivamente, cuya variante comprende además la HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO:2, 3, 4, 5, y 6.
- 20 [0047] En otros, A5 y A9 en una variante de HVR-L1 son D y T, respectivamente, cuya variante comprende además la HVRL2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO:2, 3, 4, 5, y 6.
- 25 [0048] En otros, A5 y A9 en una variante de HVR-L1 son N y L, respectivamente, cuya variante comprende además la HVRL2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO:2, 3, 4, 5, y 6.
- 30 [0049] En otros, A9 en una variante de HVR-L1 es L, cuya variante comprende además la HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVRH2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO:2, 3, 4, 5, y 6.
- 35 [0050] Ciertos anticuerpos o polipéptidos de unión anti-beta7 de la invención comprenden una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, cada HVR comprendiendo, consistiendo en, o consistiendo esencialmente en, en orden, SEC ID NO: 9, 2, 3, 4, 5, y 64. En otra realización, cada HVR comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, en orden, SEC ID NO:9, 67, 3, 4, 5, y 64. En otra realización, cada HVR comprende, consiste en, consiste esencialmente en, en orden, SEC ID NO:9, 68, 3, 4, 5, y 64. En otra realización, cada HVR comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, en orden, SEC ID NO:9, 2 ó 67 ó 68, 3, 4, 5, y 66.
- 40 [0051] También se describen aquí variantes de anticuerpos de variante de HVR-L1 que comprenden además HVR-L2, HVR-L3, HVRL3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en las que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEC ID NOs:2 3, 4, 5, y 6. Cuando la variante de anticuerpo comprende HVR-L1 A8(P) y A9(L) y HVR-L2 B6(R) y B7(T), dicha variante de HVR-L1, HVR-L2 comprende además HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3, en la que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEC ID NOs:3, 4, 5, y 6.
- 45 [0052] En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden además una secuencia consenso de armazón de la cadena pesada de subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de armazón comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso del armazón de cadena ligera kl humana.
- 50 [0053] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-L3 que comprende SEC ID NO:3. Se describe aquí una variante de HVR-L3 en la que C8 es L. Una variante de anticuerpo puede comprender además HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVRH2 y HVR-H3, en las que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en SEC ID NOs:1, 2, 4, 5 y 6. También se describe aquí una variante de HVR-L3 en la que C8 es W. Una variante de anticuerpo puede comprender además HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVRH2 y HVR-H3, en las que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEC ID NOs:1, 2, 4, 5 y 6. HVR-L1 comprende SEC ID NO:7, 8, ó 9. En algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de armazón comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera kl humana.
- 55 [0054] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H3 que comprende SEC ID NO:6. También se describe aquí una variante de HVR-H3 en la que F1 es Q.
- 60 [0055] Una variante de anticuerpo puede comprender además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H2, en la que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEC ID NOs:1, 2, 3, 4, y 5. También se describe aquí una variante de HVR-H3, en la que F1 es R. Una variante de anticuerpo puede comprender además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H2, en las que cada una comprende, en orden, la secuencia
- 65

representada en las SEC ID NOs:1, 2, 3, 4, y 5. HVR-L1 comprende las SEC ID NO: 7, 8, ó 9. En algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso del armazón comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de la cadena ligera kl humana.

**[0056]** En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-L2 que comprende la SEC ID NO:2. También se describe aquí una variante de HVR-L2 en la que B1 es N, B5 es S, B6 es L, B7 es V, y/o B7 es E o K. Una variante de anticuerpo puede comprender además HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en las que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEC ID NOs:1, 3, 4, 5, y 6. HVR-L1 comprende las SEC ID NO:7, 8, ó 9. En algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de armazón comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera kl humana.

**[0057]** En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-L3 que comprende la SEC ID NO:3. Aquí se describe una variante de HVR-L3 en la que C8 es W, Y, R, o S. Una variante de anticuerpo puede comprender además HVR-L1, HVR-L2, HVRH1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que cada una, comprende, en orden, la secuencia representada en las SEC ID NOs:1, 2, 4, 5, y 6. HVR-L1 comprende las SEC ID NO:7, 8, ó 9. En algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de armazón comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera kl humana.

**[0058]** En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H2 que comprende la SEC ID NO:5. Se describe aquí una variante de HVR-H2 en la que E2 es F o en la que E2 es V o D. También se describe aquí una variante de HVR-H2 en la que E6 es G, E10 es Y, E12 es A, D, o T, E13 es D, A, o N, E15 es V, y/o E17 es G. Una variante de anticuerpo puede comprender además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H3, en las que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEC ID NOs:1, 2, 3, 4, y 6. HVR-L1 comprende las SEC ID NO:7, 8, ó 9. En algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso del armazón comprende una sustitución en una posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera kl humana.

**[0059]** En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H3 que comprende la SEC ID NO:6. Se describe aquí una variante de HVR-H3 en la que F11 es Y. Una variante de anticuerpo puede comprender además HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVRH1 y HVR-H3, en la que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEC ID NOs:1, 2, 3, 4, y 6. HVR-L1 comprende las SEC ID NO:7, 8, o 9. En algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de armazón comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera kl humana.

**[0060]** En algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de armazón comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera kl humana.

**[0061]** Un agente terapéutico para utilizar en un sujeto huésped produce preferiblemente una respuesta inmunogénica pequeña o nula frente al agente en dicho sujeto. En una realización, la invención proporciona dicho agente. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que produce y/o se espera que produzca una respuesta de anticuerpo humano anti-roedor (tal como una respuesta anti-ratón o anti-rata) o una respuesta anti-humana de humano en un nivel sustancialmente reducido en comparación con un anticuerpo que comprende la secuencia que comprende las SEC ID NOs: 10 y/o 11 (Figuras 1A y 1B) o SEC ID NOs: 12 y/o 13 (Figuras. 9A y 9B que representan las secuencias de aminoácidos Fib504 de rata anti-ratón) en un sujeto huésped. En otro ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que no produce y/o no se espera que produzca una respuesta de anticuerpo anti-roedor humano (tal como anti-ratón humano (HAMA) o anti-ratón humano) o anti-humano humano (HAHA).

**[0062]** Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o más secuencias de la región no



hipervariable (por ejemplo, armazón) humanas y/o consenso humanas en su dominio variable de cadena pesada y/o ligera. En algunas realizaciones, están presentes una o más modificaciones adicionales en las secuencias de región no hipervariable humana y/o consenso humana. En una realización, el dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de armazón consenso humana, que en una realización es la secuencia de armazón consenso de subgrupo III. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de la secuencia de armazón consenso de subgrupo III modificada en por lo menos una posición de aminoácido. Por ejemplo, en una realización, una variante de la secuencia de armazón consenso de subgrupo III puede comprender una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73, 78 y/o 94. En una realización, dicha sustitución es R71A, N73T, L78A, y/o R94M, en cualquier combinación de las mismas.

**[0063]** Tal como se conoce en la técnica, y se describe con mayor detalle a continuación, la posición/límite de aminoácido que define una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica (tal como se describe a continuación). Algunas posiciones en un dominio variable se pueden observar como posiciones hiperavriables híbridas en que estas posiciones se pueden encontrar en regiones hiperavriables ampliadas (tal como se define a continuación). La invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. En una realización, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más de las posiciones 26-30, 33-35B, 47-49, 49, 57-65, 93, 94 y 102 en un dominio variable de cadena pesada. En una realización, estas posiciones hipervariables híbridas incluyen una o más de las posiciones 24-29, 35-36, 46-49, 49, 56 y 97 en un dominio variable de cadena ligera. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de secuencia consenso de armazón de subgrupo humano modificada en una o más posiciones hipervariables híbridas. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una variante de secuencia consenso de armazón de subgrupo III humano modificada en una o más de las posiciones 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 y 102. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución T28F, F29I, S30T, S31N, Y32N, A33Y, M34W, y S35G. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución S49G. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución V50F o V50D o V50Y. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución G53Y. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución G54S. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Y58S. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución A60N o A60D o A60T. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución D61P o D61A o D61H. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución V63L. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución G65S. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución R94M. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución R94A o R94E o R94G o R94Q o R94S. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución G95T. En una realización, el anticuerpo comprende una o más de las sustituciones en las posiciones 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 y 102 y comprende además una o más de las sustituciones en las posiciones R71A o N73T o L78A o L78F. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Y102F. Se puede observar por referencia a la figura 1B que estas sustituciones están en las HVR-H1, HVR-H2, y/o HVR-H3 de la cadena pesada.

**[0064]** En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una variante de secuencia consenso de armazón del subgrupo I humana modificada en una o más de las posiciones 27, 29-31, 33, 34, 49, 50, 53-55, 91 y 96. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Q27E. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución I29V. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución S30D. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución N31T o N31S o N31D. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Y32L. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución A34H. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Y49K. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución A50Y. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución S53Q. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución L54S. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución E55I o E55V. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Y91G. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución W96N o W96L. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución A25S. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución A25 a G, S, T, o V. En una realización, el anticuerpo comprende una modificación seleccionada entre una o más de los siguientes grupos de sustituciones. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo comprende una sustitución S26 a G, I, K, N, P, Q, o T. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Q27 a E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R, o V. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución S28 a A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V, o Y. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución I29 a V, A, G, K, L, M, Q o R. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución S30 a D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T o V. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución N31 a D, T, E, o G. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Y32 a L, I o M. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución L33 a A, I, M o V. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución A34 a H, F, Y o S. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Y49 a K o N. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución A50Y. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución S53Q. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución L54S. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución E55 a V, I o K. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución Y91G. En una realización, el anticuerpo comprende una sustitución W96 a N, L, W, Y, R, S, A, F, H, I, M, N, R, S, T, V o Y. Se puede observar por referencia a la figura 1A que estas sustituciones están en las HVR-L1, HVR-L2, y/o

HVR-L3 de la cadena ligera.

5 **[0065]** Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquier secuencia de armazón de cadena ligera de consenso humana o humana, siempre que el anticuerpo muestre las características biológicas deseadas (por ejemplo, una afinidad de unión deseada). En una realización, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una parte (o toda) la secuencia de armazón de la cadena ligera  $\kappa$  humana. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una parte (o toda) la secuencia de armazón consenso del sugrupo I  $\kappa$  humana.

10 **[0066]** En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que comprende las secuencias de armazón representadas en las SEC ID NOS:34-41 y en las Figuras 1, 7 y 8, siempre que las posiciones 49 de la cadena ligera y 94 de la cadena pesada estén incluidas en las HVR ampliadas, y siempre que dicha posición 49 sea K y dicha posición 94 sea preferiblemente, pero no necesariamente, M y pueda ser R.

15 **[0067]** Los antagonistas de la invención se pueden utilizar para modular uno o más aspectos de los efectos asociados con beta7, incluyendo, pero sin limitación, la asociación con la subunidad de integrina alfa4, la asociación la subunidad de integrina alfaE, la unión de la integrina alfa4beta7 a MAdCAM, VCAM-1 o fibronectina y la unión de la integrina alfaEbeta7 a E-cadherina. Estos efectos se pueden modular mediante cualquier mecanismo biológicamente relevante, incluyendo la alteración de la unión del ligando a subunidad beta7 o a la integrina dimérica alfa4beta7 o alfaEbeta y/o mediante la alteración de la asociación entre las subunidades de integrina alfa y beta, de manera que se inhibe la formación de la integrina dimérica. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo antagonista de beta7 que inhibe la unión de alfa4 a beta7. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención altera la unión de alfa4beta7 a MAdCAM. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención altera la unión de alfa4beta7 a VCAM-1. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención altera la unión de alfa4beta7 a fibronectina. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención altera la unión de beta7 a alfaE. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención altera la unión de la integrina alfaEbeta7 a E-cadherina. La interferencia puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista de beta7 se puede unir a beta7 en una secuencia de la región de dimerización de alfa4beta7 o alfaEbeta7, y de este modo, inhibe la interacción de las subunidades de integrina y la formación de un dímero de integrina. En un ejemplo adicional, un anticuerpo antagonista de beta7 se puede unir a una secuencia en el dominio de unión a ligando de la subunidad beta7 y, de este modo, inhibe la interacción de dicho dominio unido con su compañero de unión (tal como fibronectina, VCAM, y/o MAdCAM para la integrina alfa4beta7; o E-cadherina para la integrina alfaEbeta7). En otro ejemplo, un anticuerpo antagonista de beta7 se puede unir a una secuencia que no está en el dominio de dimerización de la subunidad de integrina o un dominio de unión a ligando, pero donde dicha unión del anticuerpo de antagonista beta7 da lugar a la alteración de la capacidad del dominio de beta7 de interactuar con su compañero de unión (tal como una subunidad de integrina alfa4 o alfaE y/o un ligando, tal como fibronectina, VCAM, MAdCAM, o E-cadherina). En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención se une a beta7 (por ejemplo, el dominio extracelular), de manera que se altera la dimerización de beta7 con la subunidad alfa4 o alfaE. En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención se une a beta7, de manera que se altera la capacidad de beta7 y/o una integrina y/o alfa4beta7 y/o alfaEbeta7 de unirse a su respectivo ligando o ligandos. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo antagonista que después de la unión a una molécula beta7 inhibe la dimerización de dicha molécula. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión a ligando de beta7. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión a ligando de beta7, de manera que se altera la unión del ligando (es decir, fibronectina, VCAM, y/o MAdCAM) a la integrina alfa4beta7. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión a ligando de beta7, de manera que se altera la unión del ligando (es decir, E-cadherina) a la integrina alfaEbeta7.

50 **[0068]** En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención altera la dimerización de beta7 que comprende la heterodimerización (es decir, la dimerización de beta7 con una molécula de subunidad de integrina alfa4 o alfaE).

55 **[0069]** En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención se une a un epítipo en la subunidad de integrina beta7 que se localiza en los aminoácidos 176-237. En otra realización, un anticuerpo antagonista de la invención se une al mismo epítipo en la integrina beta7 que es sustancialmente el mismo epítipo que Fib504.64 (ATCC HB-293). La determinación de la unión a epítipo se realiza mediante técnicas estándar incluyendo, sin limitación, el análisis de unión de competición.

60 **[0070]** En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una combinación de uno, dos, tres, cuatro, cinco o todas las secuencias de HVR representadas en la tabla de sustituciones de aminoácidos de la figura 13.

65 **[0071]** Un agente terapéutico para utilizar en un sujeto huésped produce preferiblemente una respuesta inmunogénica pequeña a nula contra el agente en dicho sujeto. En una realización, la invención proporciona dicho agente. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que produce y/o se espera que produzca una respuesta de anticuerpo anti-rata humano o anti-ratón humano o anti-humano humano en

un nivel sustancialmente reducido en comparación con un anticuerpo que comprende la secuencia de SEC ID NOS: 10, 11, 12 y/o SEC ID NO: 13 (Fib504 anti-ratón de rata (ATCC HB-293), Figuras 1 y 9) en un sujeto huésped. En otro ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que no produce y/o no se espera que produzca una respuesta de anticuerpo anti-ratón humano, anti-rata humano o anti-humano humano.

5 [0072] Un anticuerpo humanizado de la invención puede comprender una o más secuencias de la región no hipervariable (por ejemplo, armazón) humanas y/o consenso humanas en su dominio variable de cadena pesada y/o ligera. En algunas realizaciones, están presentes una o más modificaciones adicionales en las secuencias de región no hipervariable humana y/o consenso humana. En una realización, el dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo de la invención comprende una secuencia de armazón consenso humana, que en una realización es la secuencia de armazón consenso de subgrupo III. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una variante de la secuencia de armazón consenso de subgrupo III modificada en por lo menos una posición de aminoácido. Por ejemplo, en una realización, una variante de la secuencia de armazón consenso de subgrupo III puede comprender una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73, 78 y/o 94, aunque la posición 94 es parte de una región H3 hipervariable de cadena pesada ampliada de la presente invención. En una realización, dicha sustitución es R71A, N73T, L78A, y/o R94M, en cualquier combinación de las mismas.

20 [0073] Un anticuerpo de la invención puede comprender cualquier secuencia de armazón de cadena ligera de consenso humana o humana, siempre que el anticuerpo muestre las características biológicas deseadas (por ejemplo, una afinidad de unión deseada). En una realización, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una parte (o toda) la secuencia de armazón de la cadena ligera  $\kappa$  humana. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende por lo menos una parte (o toda) la secuencia de armazón consenso del sugrupo I  $\kappa$  humana.

25 [0074] Los antagonistas de la invención se pueden utilizar para modular uno o más aspectos de los efectos asociados a beta7. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista de beta7 se puede unir a beta7 en una secuencia de la región de dimerización de alfa4beta7 o alfaEbeta7, e inhibir de este modo la interacción de las subunidades de integrina y la formación de un dímero de integrina. En un ejemplo adicional, un anticuerpo antagonista de beta7 se puede unir a una secuencia en el dominio de unión a ligando de la subunidad beta7 e inhibir, de este modo, la interacción de dicho dominio unido con su compañero de unión (tal como fibronectina, VCAM, y/o MAdCAM para la integrina alfa4beta7; o E-cadherina para la integrina alfaEbeta7). En otro ejemplo, un anticuerpo antagonista de beta7 se puede unir a una secuencia que no está en el dominio de dimerización de la subunidad de integrina o un dominio de unión a ligando, pero donde la unión de dicho anticuerpo antagonista de beta7 da lugar a la alteración de la capacidad del dominio beta7 de interactuar con su compañero de unión (tal como una subunidad de integrina alfa4 o alfaE y/o un ligando, tal como fibronectina, VCAM, MAdCAM, o Ecadherina). En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención se une a beta7 (por ejemplo, el dominio extracelular), de manera que se altera la dimerización de beta7 con la subunidad alfa4 o alfaE. En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención se une a beta7, de manera que se altera la capacidad de beta 7 y/o una integrina alfa4beta7 y/o alfaEbeta7 de unirse a su respectivo ligando o ligandos. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo antagonista que después de la unión a una molécula beta7 inhibe la dimerización de dicha molécula. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión a ligando de beta7. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión a ligando de beta7, de manera que se altera la unión del ligando (es decir, fibronectina, VCAM, y/o MAdCAM) a la integrina alfa4beta7. En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención se une específicamente a una secuencia en el dominio de unión a ligando de beta7, de manera que se altera la unión de ligando (es decir, E-cadherina) a la integrina alfaEbeta7.

[0075] En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención altera la dimerización de beta7 que comprende la heterodimerización (es decir, la dimerización de beta7 con una molécula de subunidad de integrina alfa4 o alfaE).

50 [0076] En algunos casos, puede ser ventajoso tener un anticuerpo antagonista de beta7 que no interfiere con la unión de un ligando (tal como fibronectina, VCAM, MAdCAM, o alfaE) a la subunidad beta7 como parte de una integrina o a una integrina alfa4beta7 o una integrina alfaEbeta7 como dímero. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que no se une al sitio de unión a fibronectina, VCAM, MAdCAM, o E-cadherina en beta7 sino que, en cambio, inhibe la interacción entre la subunidad de beta7 y una subunidad alfa (tal como subunidad de integrina alfa4 o alfaE), de manera que se evita la formación de una integrina biológicamente activa. En un ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo antagonista de la invención conjuntamente con uno o más de otros antagonistas, donde los antagonistas están dirigidos a diferentes procesos y/o funciones en el eje de la integrina de beta7. De este modo, en una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención se une a un epítipo en beta7 diferente de un epítipo unido por otro antagonista de beta7 o integrina alfa/beta (tal como un anticuerpo alfa4beta7, incluyendo anticuerpo monoclonal o un anticuerpo, tal como un anticuerpo humanizado o anticuerpo monoclonal derivado de y/o que tiene las mismas o efectivamente las mismas características de unión o especificidad que un anticuerpo derivado de un anticuerpo murino.

65 [0077] En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista de beta7 que altera la multimerización de beta7-alfa4 o beta7-alfaE en la respectiva integrina, así como la unión a ligando. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista de la invención que inhibe la dimerización de beta7 con la subunidad de integrina alfa4 o

alfaE puede comprender además la capacidad de competir con el ligando por la unión a beta7 o el dímero de integrina (por ejemplo, puede interferir con la unión de fibronectina, VCAM, y/o MAdCAM a beta7 y/o alfa4beta7; o puede interferir con la unión de E-cadherina a beta7 o alfaEbeta7.)

5 **[0078]** En una realización de un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención, la unión del antagonista a beta7 inhibe la adhesión celular activada por la unión a ligando. En otra realización de un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención, la unión del antagonista a beta7 en una célula inhibe el reclutamiento de la célula a las células y/o tejido en que se expresa la integrina que contiene beta7.

10 **[0079]** En una realización, un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención se une específicamente por lo menos a una parte de los aminoácidos 176-250 (opcionalmente los aminoácidos 176-237) del dominio extracelular beta7 (véase Tidswell, M. et al. (1997) J. Immunol. 159:1497-1505) o una variante del mismo, y reduce o bloquea la unión de ligandos MAdCAM, VCAM-1, fibronectina, y/o E-cadherina. En una realización, dicho bloqueo de unión a ligando altera, reduce y/o evita la adhesión de una célula que expresa el ligando a una célula que expresa el ligando que  
15 contiene beta7. En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención se une específicamente a una secuencia de aminoácidos de beta7 que comprende los residuos 176-237. En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención se une específicamente a un epítipo conformacional formado por parte o todo de por lo menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los residuos 176-237 de beta7. En una  
20 realización, un antagonista de la invención se une específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98%, por lo menos un 99% de identidad o similitud en la secuencia con la secuencia de aminoácidos de los residuos 176-237 o los residuos 176-250 de beta7 humana. En una realización, el anticuerpo anti-beta7 antagonista de la invención se une al mismo epítipo que el anticuerpo Fib504 anti-beta7 producido por el hibridoma ATCC HB-293.

25 **[0080]** En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos antagonistas de la invención y un portador. En una realización, el portador es farmacéuticamente aceptable.

30 **[0081]** Aquí se describen ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención.

**[0082]** También se describen aquí vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención y células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante, tal como un vector de expresión. Se puede utilizar cualquier célula huésped. En una  
35 realización, una célula huésped es una célula procarionota, por ejemplo, E. coli. En una realización, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO).

**[0083]** También se describen aquí métodos para fabricar un antagonista de la invención. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método de fabricación de un anticuerpo antagonista de beta7 (que, tal como se define aquí incluye anticuerpo de longitud completa y fragmentos del mismo), comprendiendo dicho método expresar en una  
40 célula huésped adecuada un vector recombinante de la invención que codifica dicho anticuerpo (o fragmento del mismo), y recuperar dicho anticuerpo.

**[0084]** Se describe aquí un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida en el recipiente, en el que la composición comprende uno o más anticuerpos antagonistas de beta7 de la invención. En una realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo antagonista comprende además un portador, que, en algunas realizaciones, es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación de la invención comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo antagonista) a un sujeto.  
50

**[0085]** Se describe aquí un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos antagonistas de beta7 de la invención; y un segundo recipiente que comprende un tampón. En una realización, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo antagonista comprende además un portador, que, en algunas realizaciones, es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un kit comprende además instrucciones para administrar la  
55 composición (por ejemplo, el anticuerpo antagonista) a un sujeto.

**[0086]** Las integrinas beta7 y sus ligandos se expresan de forma diversa en estados patológicos. [La expresión de MAdCAM-I en el endotelio del intestino se incrementa en sitios de inflamación de la mucosa en pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria (UC y CD) y la lámina propia colónica de pacientes con UC y CD también presentó un incremento de células CD3+ y a4b7+ en comparación con los controles de IBS (véase Souza H., et al., Gut 45:856 (1999)). Se observó que la expresión de MAdCAM-1 estaba asociada con la inflamación del tracto portal en enfermedades hepáticas y puede ser importante en el reclutamiento de linfocitos alfa4beta7+ al hígado durante la inflamación. (Hillan, K., et al., Liver. 19(6):509-18 (1999)) La MAdCAM-1 en vasos hepáticos apoya la adhesión de linfocitos a4b7+ de pacientes con IBD y colangitis esclerosante primaria. La adhesión se inhibió por anticuerpos anti-MAdCAM-1, anti-alfa4beta7, o anti-alfa4. (Grant AJ. et al., Hepatology. 33(5):1065-72 (2001)). MAdCAM-1, VCAM-1  
60  
65

y E-cadherina se expresan en células endoteliales del cerebro y/o en microvasos en el sistema nervioso central inflamado. Las integrinas beta7 contribuyen a la enfermedad desmielinizante del SNC (Kanwar et al., J. Neuroimmunology 103, 146 (2000)). La expresión de alfa4beta7 fue significativamente superior en LPL de CD que en controles y pacientes con UC (Oshitani, N. et al International Journal of Molecule Medicine 12, 715-719 (2003)). Los IEL de pacientes con CD se pueden estimular crónicamente y reclutar de la periferia (Meresse, B., et al., Human Immunology, 62, 694-700 (2001)). En la enfermedad hepática humana, las células T alfaEbeta7 (CD4+ y CD8+) se acumulan preferentemente en hígados humanos donde la E-cadherina se expresa en hepatocitos y el epitelio del conducto biliar (Shimizu, Y., et al., Journal of Hepatology 39, 918-924 (2003)). En la pancreatitis crónica, las células T CD8+CD103+, análogas a los linfocitos intraepiteliales intestinales, se infiltran en el páncreas en la pancreatitis crónica (Matthias, P., et al., Am J Gastroenterol 93:2141-2147 (1998)). Se halla una sobrerregulación de alfaEbeta7 en pacientes con lupus eritematoso sistémico con una implicación epitelial específica (Pang et al., Arthritis & Rheumatism 41: 1456-1463 (1993)). En el síndrome de Sjogren, las células T CD8+ alfaEbeta7+ se adhieren y eliminan las células epiteliales acinares mediante la inducción de apoptosis (Kroneld et al., Scand J Rheumatol 27:215-218, 1998). Las integrinas alfa4beta7 y alfaEbeta7 juegan un papel en el epidermotropismo de células T durante la inflamación de piel y contribuyen al rechazo de aloinjertos de piel (Sun et al., Transplantation 74, 1202, 2002). Teraki y Shiohara mostraron una expresión diferencial de integrina aEb7 en células T CD8+ en epidermis psoriática (Teraki y Shiohara, Br. J. Dermatology 147, 1118, 2002). Los linfocitos T de esputo son IEL activados (CD69+ CD 103+) en sujetos con asma, COPD y normales (Leckie et. al., Thorax 58, 23, 2003). Los CTL CD103+ (aEb7+) se acumulan con el epitelio del injerto durante el rechazo del aloinjerto renal clínico (Hadley et al., Transplantation 72, 1548, 2001)]. De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona la utilización de un anticuerpo antagonista de beta7 de la invención para inhibir la interacción integrina beta7-ligando para reducir o aliviar la enfermedad, tal como uno o más de los estados patológicos descritos anteriormente. En una realización, el anticuerpo de la invención se utiliza en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como una enfermedad inflamatoria, incluyendo, sin limitación, la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), enfermedad inflamatoria del hígado, inflamación del SNC, pancreatitis crónica, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, psoriasis e inflamación de la piel, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad pulmonar intersticial, alergia, enfermedad autoinmune, rechazo de transplante, rechazo de injerto renal, enfermedad de injerto frente a huésped, diabetes y cáncer.

**[0087]** Se describe aquí la utilización de un ácido nucleico en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como autoinmune o inflamatorio) incluyendo, sin limitación, la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) y reacción alérgica (tal como trastornos del sistema respiratorio, piel, articulaciones, asma alérgica y otros órganos afectados por reacción alérgica mediada por una integrina que contiene beta7).

**[0088]** También se describe la utilización de un vector de expresión en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como autoinmune o inflamatorio) incluyendo, sin limitación, la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) y reacción alérgica (tal como trastornos del sistema respiratorio, piel, articulaciones, y otros órganos afectados por reacción alérgica mediada por una integrina que contiene beta7).

**[0089]** También se describe la utilización de una célula huésped en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como autoinmune o inflamatorio) incluyendo, sin limitación, la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) y reacción alérgica (tal como trastornos del sistema respiratorio, piel, articulaciones, y otros órganos afectados por reacción alérgica mediada por una integrina que contiene beta7).

**[0090]** También se describe la utilización de un artículo de fabricación en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como autoinmune o inflamatorio) incluyendo, sin limitación, la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) y reacción alérgica (tal como trastornos del sistema respiratorio, piel, articulaciones, y otros órganos afectados por reacción alérgica mediada por una integrina que contiene beta7).

**[0091]** También se describe la utilización de un kit en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un trastorno inmune (tal como autoinmune o inflamatorio) incluyendo, sin limitación, la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) y reacción alérgica (tal como trastornos del sistema respiratorio, piel, articulaciones, y otros órganos afectados por reacción alérgica mediada por una integrina que contiene beta7).

**[0092]** La presente invención proporciona anticuerpos, fragmentos de unión y composiciones útiles para la modulación de estados patológicos asociados con el desarreglo del proceso de interacción célula-célula mediada por la integrina beta7. Las integrinas beta7 están implicadas en múltiples funciones biológicas y fisiológicas, incluyendo, por ejemplo, trastorno inflamatorio y reacciones alérgicas. De este modo, el método comprende administrar a un sujeto un anticuerpo de la invención.

**[0093]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión para utilizar en un método de inhibición de la inflamación mediada por la integrina beta7, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula o tejido con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención, mediante lo cual se inhibe la interacción de linfocitos o células B y la unión a una célula que expresa la integrina beta7.

**[0094]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión para utilizar en un método de tratamiento de una condición patológica asociada con el desarreglo de la unión de integrina beta7 en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención, mediante lo cual se trata dicha condición.

**[0095]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión para utilizar en un método de inhibición de la unión de un linfocito que expresa un ligando de integrina beta7 (tal como una célula que expresa MAdCAM, VCAM, E-cadherina o fibronectina) a una célula que expresa la integrina beta7 (tal como las integrinas alfa4beta7 o alfaEbeta7), comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un anticuerpo de la invención, inhibiendo o evitando de este modo la adhesión de las células y provocando la reducción de la reacción inflamatoria.

**[0096]** En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión para utilizar en un método para el tratamiento o la prevención de un trastorno inflamatorio asociado con una mayor expresión o actividad de la integrina beta7 o mayor interacción entre una integrina beta7 en una célula y un receptor de integrina beta7 en otra célula, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención, tratando o evitando de este modo de manera efectiva dicho trastorno inflamatorio. En una realización, dicho trastorno inflamatorio es la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). En otra realización, dicho trastorno inflamatorio es una reacción alérgica.

**[0097]** Los anticuerpos o fragmentos de unión de la invención se pueden utilizar para afectar a cualquier estado patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados con el desarreglo del mecanismo de unión de la integrina beta7. Las integrinas beta7 se expresan principalmente en leucocitos (Tidswell, M. et al. (1997) supra). En una realización, se reconoce un leucocito en un método de la invención y se evita que se una a una célula que expresa un ligando de la integrina beta7. Por ejemplo, se evita que un linfocito intraepitelial que expresa E-cadherina, según la invención, se una a una célula que expresa alfaEbeta7 por un anticuerpo antagonista anti-beta7. Se evita que células que expresan MAdCAM, VCAM-1 o fibronectina se unan a un leucocito que expresa alfa4beta7 por un anticuerpo antagonista anti-beta7.

**[0098]** Los métodos de la invención pueden comprender además etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una realización, un método comprende además una etapa en la que una célula y/o tejido reconocido (por ejemplo, una célula endotelial del recubrimiento intestinal) se expone a un anticuerpo anti-TNF o un agente terapéutico de molécula pequeña incluyendo, sin limitación, compuestos 5-ASA.

**[0099]** Tal como se describe aquí, las integrinas beta7 median en importantes procesos biológicos, el desarreglo de los cuales conduce a numerosas condiciones patológicas. Por consiguiente, en una realización de métodos de la invención, una célula que es reconocida (por ejemplo, una célula endotelial) es aquella en cuya adhesión de una célula que expresa un ligando de integrina beta7 de una integrina beta7 (donde la célula puede ser, sin limitación, un linfocito, y el ligando puede ser MAdCAM, VCAM o E-cadherina) es alterada, inhibida o evitada en comparación con las células en ausencia del anticuerpo antagonista anti-beta7 de la invención. En una realización, un método de la invención inhibe la quimiotaxis de leucocitos, inhibiendo de este modo la inflamación en el sitio de la expresión de la integrina beta7. Por ejemplo, el contacto con un antagonista de la invención puede dar lugar a la incapacidad de la célula de adherirse a una célula que expresa un ligando de una integrina beta7.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### **[0100]**

Las figuras 1A y 1B representan la alineación de secuencias de las cadenas variables ligera y pesada para las siguientes: secuencia consenso del subgrupo kappa I humano de cadena ligera (Figura 1A, SEC ID NO:23), secuencia consenso del subgrupo III humano de cadena pesada (Figura 1B, SEC ID NO:24), cadena ligera variable de anticuerpo anti-beta7 de ratón de rata (Fib504) (Figura 1A, SEC ID NO: 10), cadena pesada variable de anticuerpo anti-beta7 de ratón de rata (Fib504) (Figura 1B, SEC ID NO:11), y variantes de anticuerpos humanizados: cadena ligera variable de injerto hu504K humanizado (Figura 1A, SEC ID NO:25), cadena pesada variable de injerto hu504K humanizado (Figura 1B, SEC ID NO:26), variante hu504.5 (variaciones de aminoácidos del injerto hu504K humanizado se indican en la figura 1A (cadena ligera) y la Figura 1B (cadena pesada) para variantes hu504.5, hu504.16, y hu504.32. Las sustituciones de aminoácidos adicionales en las HVR-H1 y HVR-H2 del injerto hu504K que dieron lugar a los anticuerpos de unión a beta7 se indican en la figura 1C.

Las figuras 2A y 2B representan la secuencia de longitud completa de la cadena ligera de secuencia consenso del subgrupo III humana (Figura 2A, SEC ID NO:27) y cadena pesada de de secuencia consenso del subgrupo III

humana (Figura 2B, SEC ID NO:28). Las HVRs están subrayadas.

Las figuras 3A y 3B representan la secuencia de longitud completa del injerto 504 humanizado que contiene regiones hipervariables de Fib504 de rata (tal como se describe aquí) injertadas en la cadena ligera de la secuencia consenso de kappa I humana (Figura 3A, SEC ID NO: 29) y en la cadena pesada de la secuencia consenso del subgrupo III humana (Figura 3B, SEC ID NO:30). Las HVRs están subrayadas.

Las figuras 4A y 4B representan la secuencia de longitud completa del injerto 504K humanizado en la que la posición 49 de la cadena ligera del injerto hu504 es una sustitución Y49K. La cadena ligera del injerto hu504K se representa mediante la SEC ID NO:31 y la cadena pesada del injerto hu504K se representa mediante la SEC ID NO:30. Las HVRs están subrayadas.

Las figuras 5A y 5B representan la secuencia de longitud completa del injerto hu504K-RF en la que las posiciones 71 y 78 de la cadena pesada del injerto hu504 son una sustitución A71R y una sustitución A78F de la secuencia del injerto hu504K. La cadena ligera del injerto hu504K-RF se representa mediante la SEC ID NO:31 y la cadena pesada del injerto hu504K-RF se representa mediante la SEC ID NO:32. Las HVRs están subrayadas.

Las figuras 6A y 6B representan la secuencia de longitud completa de la variante hu504.32 que comprende la cadena pesada del injerto hu504KRF (SEC ID NO:32) y las sustituciones T31D y Y32L en la cadena ligera del injerto hu504K (SEC ID NO:33). Las HVRs están subrayadas.

Las figuras 7A-7B y figuras 8A-8B representan secuencias consenso de armazón humana aceptoras de ejemplo para utilizar en la realización de la presente invención con los identificadores de secuencia siguientes:

Armazones consenso de cadena ligera variable (VL) (FIGURAS 7A,B)

**[0101]**

Armazón consenso del subgrupo I kappa de VL humano (SEC ID NO:14)

Armazón consenso del subgrupo I kappa de VL humano menos HVR-L2 ampliada (SEC ID NO: 15)

Armazón consenso del subgrupo II kappa de VL humano (SEC ID NO:16)

Armazón consenso del subgrupo III kappa de VL humano (SEC ID NO:17)

Armazón consenso del subgrupo IV kappa de VL humano (SEC ID NO:18)

Las regiones sombreadas representan las HVR de cadena ligera (indicadas como L1, L2, y L3).

Armazones consenso de cadena pesada variable (VH) (FIGURAS 8A,B)

**[0102]**

Armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos CDR de Kabat (SEC ID NO:19)

Armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID NOs:20-22)

Armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos CDR de Kabat (SEC ID NO:48)

Armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID NOs:49-51)

Armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos CDR de Kabat (SEC ID NO:52)

Armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID NOs:53-55)

Armazón aceptor de HV humano menos CDR de Kabat (SEC ID NO:56)

Armazón aceptor de HV humano menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID NOs:57-58)

Armazón aceptor 2 de HV humano menos CDR de Kabat (SEC ID NO:59)

Armazón aceptor 2 de HV humano menos regiones hipervariables ampliadas (SEC ID NOs:60-62)

**[0103]** Las figuras 9A y 9B representan una secuencia de aminoácidos de las cadenas variables del anticuerpo Fib504 anti-integrina beta7 de ratón de rata producido por el hibridoma ATCC HB-293. Las HVR están subrayadas. La cadena ligera variable se representa en la Figura 9A (SEC ID NO:12) y la cadena pesada variable se representa en la figura 9B (SEC ID NO:13).

**[0104]** La figura 10A representa posiciones de aminoácidos en la cadena pesada de varias secuencias consenso (subgrupos III hu). La secuencia consenso utilizada para el desarrollo del anticuerpo anti-HER2 Herceptin®, Fib504 de rata, y los armazones de hu504-RL y hu504-RF se describen en los ejemplos del presente documento. La figura 10B es un gráfico de barras que muestra la unión relativa de alfa4beta7 al anticuerpo con el injerto hu504 y el anticuerpo con el injerto hu504K en función de las modificaciones del armazón "RL" o "RF" tal como se describe en el ejemplo 1.

**[0105]** Figuras 11A-11C. La figura 11A tabula los cambios en HVR resultantes de la maduración para afinidad realizada aportando un rango limitado de sustituciones de aminoácidos en la variante hu504.16. Los resultados son de librerías con HVR modificadas individualmente en la variante hu504.16 tal como se describe en el ejemplo 2 en el presente documento. Las abreviaturas de aminoácidos encuadrados son aminoácidos hallados más frecuentemente en los anticuerpos de unión a beta7 (anticuerpos seleccionados de fagos). Las figuras 11B y 11C son gráficos de barras de los resultados en la figura 11A que indican el número y tipo de sustitución de aminoácido en la variante

hu504.16t (cadena ligera, Figura 11B; cadena pesada, Figura 11C) detectable mediante los métodos de mutagénesis y selección del ejemplo 2.

5 [0106] La figura 12 tabula los resultados de la maduración para afinidad realizada aportando un rango amplio de posibles sustituciones de aminoácidos en las HVR de la variante hu504.32 tal como se describe en el ejemplo 2. Los cuadros sombreados indican el aminoácido que se detectó más frecuentemente en anticuerpos detectados como anticuerpos de unión a beta7 mediante los métodos de mutagénesis y selección del ejemplo 2.

10 [0107] La figura 13 representa secuencias de HVR de Fib504 anti-ratón de rata (ATCC-293), y las sedecuencias consenso humana (columnas de la izquierda). Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos observadas para cada posición de HVR (no significa que sea limitante) por lo ensayos descritos en los ejemplos (sustituciones de aminoácidos observadas mediante la aleatorización suave de aminoácidos, amplio rastreo de sustituciones de aminoácidos, y rastreo limitado de sustituciones de aminoácidos) se muestran a la derecha, (un método útil de modificación de HVR para la humanización, aplicable a variantes de la presente invención, se halla en la Solicitud de Estados Unidos No. De Serie 60/545,840, presentada el 19 de febrero de 2004).

15 [0108] La figura 14 es una representación gráfica de ejemplo de Fib504 y una variante de anticuerpo que se une a MAdCAM en función de la concentración de anticuerpo tal como se describe en el ejemplo 3. Se determinaron los valores  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  para los anticuerpos.

20 [0109] La figura 15 representa las secuencias de aminoácidos de HVR de cadena ligera y pesada para el anticuerpo anti-beta 7 504.32R con respecto a la posición según el sistema de numeración de Kabat y un sistema de numeración relativo (A-F) para las seis HVR del anticuerpo. También se representan los aminoácidos en las posiciones 71, 73, y 78 de la región FR3 de cadena pesada. También se indican las sustituciones de aminoácidos útiles para muchas de las posiciones en las HVR o la región FR3 de cadena pesada.

25 [0110] La figura 16 muestra gráficos de barras de la capacidad relativa de los anticuerpos 504.32M y 504.32R para bloquear la quimiotaxia de células T marcadas radioactivamente al colon de ratones que experimentan enfermedad inflamatoria intestinal.

## 30 MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

### Técnicas generales

35 [0111] La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que se encuentra en el sector. Dichas técnicas se explican en detalle en la literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

### Definiciones

45 [0112] Por "subunidad beta7" o "subunidad  $\beta 7$ " se entiende la subunidad de la integrina  $\beta 7$  humana (Erle et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:11009-11016). La subunidad beta7 se asocia con la subunidad de integrina alfa4, tal como la subunidad  $\alpha 4$  humana (Kilger y Holzmann (1995) J. Mol. Biol. 73:347-354). La integrina alfa4beta7 se expresa en la mayoría de linfocitos maduros, así como una pequeña población de timocitos, célula de la médula ósea y mastocitos. (Kilshaw y Murant (1991) Eur. J. Immunol. 21:2591-2597; Gurish et al., (1992) 149: 1964-1972; y Shaw, S.K. y Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7:335). La subunidad beta7 también se asocia con la subunidad alfaE, tal como la subunidad de integrina alfaE humana (Cepek, K.L, et al. (1993) J. Immunol. 150:3459). La integrina alfaEbeta7 se expresa en linfocitos epiteliales intraintraestinales (iIELs) (Cepek, K.L. (1993) supra). La subunidad beta7 que se une al anticuerpo anti-beta7 humanizado de la invención puede ser natural y puede ser soluble o estar localizado en la superficie de una célula.

50 [0113] Por "subunidad alfaE" o "subunidad de integrina alfaE" o "subunidad  $\alpha E$ " o "subunidad de integrina  $\alpha E$ " o "CD103" se entiende una subunidad de integrina que se encuentra que está asociada con la integrina beta7 en linfocitos intraepiteliales, cuya integrina alfaEbeta7 media la unión de los iEL al epitelio intestinal que expresa E-cadherina (Cepek, K.L. et al. (1993) J. Immunol. 150: 3459; Shaw, S.K. and Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7:335).

60 [0114] "MAdCAM" o "MAdCAM-1" se utilizan indistintamente en el contexto de la presente invención y se refieren a la molécula-1 de adhesión celular adhesina mucosal proteica, que es un polipéptido de cadena sencilla que comprende una cola citoplasmática corta, una región transmembrana y una secuencia extracelular compuesta de tres dominios similares a inmunoglobulina. Se han clonado ADNc para MAdCAM-1 murino, humano y de macaco



(Briskin, et al, (1993) Nature, 363:461-464; Shyjan et al., (1996) J. Immunol. 156:2851-2857).

**[0115]** "VCAM-1" o "molécula 1 de adhesión celular vascular" o "CD106" se refieren a un ligando de alfa4beta7 y alfa4betal, expresado en endotelio activado e importante en las interacciones endoteliales-leucocito, tales como la unión y trans migración de leucocitos durante la inflamación.

**[0116]** "E-cadherina" se refiere a un miembro de la familia de cadherinas, donde la E-cadherin se expresa en células epiteliales. La E-cadherina es un ligando de la integrina alfaEbeta7 y media en la unión de la alfaEbeta7 expresada en iEL al epitelio intestinal, aunque su función en la quimiotaxia de linfocitos no está clara. La expresión de la E-cadherina está regulado por aumento por TGF-beta1.

**[0117]** "Fibronectina" se refiere a fibronectina implicada en la reparación de tejidos, embriogénesis, coagulación sanguínea y migración/adhesión celular. Sirve como enlazador en la ECM (matriz extracelular) y como dímero en el plasma (fibronectina de plasma). La forma en el plasma es sintetizada por los hepatocitos, mientras que la forma en ECM está formada por fibroblastos, condorcitos, células endoteliales, macrófagos, así como ciertas células epiteliales. En este contexto, interacciona con la integrina alfa4beta7 para mediar aspectos de la quimiotaxia o adhesión de linfocitos. La forma en ECM de la fibronectina actúa como una molécula de adhesión celular general mediante el anclaje de células a sustrato de colágeno o proteoglicano. La fibronectina también puede servir para organizar la interacción celular con la ECM mediante la unión a diferentes componentes de la matriz extracelular y a receptores de fibronectina unidos a membrana en las superficies celulares. Finalmente, la fibronectina es importante en los casos de migración celular durante la embriogénesis.

**[0118]** "Trastornos inflamatorios gastrointestinales" son un grupo de trastornos crónicos que causan la inflamación y/o ulceración en la membrana mucosa. Estos trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada y colitis infecciosa), mucositis (por ejemplo, mucositis oral, mucositis gastroitnestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrotizante y esofaguitis.

**[0119]** "Enfermedad Intestinal Inflamatoria" o "IBD" se utiliza indistintamente en la presente invención para referirse a enfermedades del intestino que provocan la inflamación y/o ulceración e incluyen, sin limitación, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

**[0120]** La "enfermedad de Crohn (CD)" o "colitis ulcerosa (UC)" son enfermedades inflamatorias intestinales crónicas de etiología desconocida. La enfermedad de Crohn, a diferencia de la colitis ulcerosa, puede afectar a cualquier parte del intestino. La característica más prominente de la enfermedad de Crohn es el engrosamiento edematoso granular rojizo-violeta de la pared intestinal. Con el desarrollo de la inflamación, estos granulomas pierden a menudo sus bordes limitantes y se integran con el tejido circundante. La diarrea y la obstrucción intestinal son las características clínicas predominantes. Como con la colitis ulcerosa, la evolución de la enfermedad de Crohn puede ser continua o reincidente, leve o severa, pero a diferencia de la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn no es curable por resección del segmento implicado del intestino. La mayoría de pacientes con la enfermedad de Crohn requieren cirugía en algún punto, pero la reincidencia posterior es habitual y es normal el tratamiento médico continuo.

**[0121]** La enfermedad de Crohn puede implicar cualquier parte del tracto alimentario desde la boca al ano, aunque habitualmente aparece en las regiones ileocólicas, del intestino delgado o colónicas-anorectales. Histopatológicamente, la enfermedad se manifiesta mediante granulomatomas discontinuos, abscesos de cripta, fisuras y úlceras aftosas. El infiltrado inflamatorio se mezcla, consistiendo en linfocitos (tanto células T como B), células de plasma, macrófagos y neutrófilos. Existe un incremento desproporcionado en células plasmáticas que secretan IgM e IgG, macrófagos y neutrófilos.

**[0122]** Los fármacos antiinflamatorios sulfasalazina y ácido 5-aminosalísílico (5-ASA) son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Crohn colónica ligeramente activa y se prescriben normalmente para mantener la remisión de la enfermedad. El metroidazol y la ciprofloxacina son similares en eficacia a la sulfasalazina y parecen ser particularmente útiles para el tratamiento de la enfermedad perianal. En casos más severos, los corticosteroides son eficaces en el tratamiento de exacerbaciones activas y pueden incluso mantener la remisión. La azatioprina y la 6-mercaptopurina también se han mostrado satisfactorias en pacientes que requieren la administración crónica de corticoestereoides. También se posible que estos fármacos puedan jugar un papel en la profilaxis a largo plazo. Desgraciadamente, puede haber un retraso largo (hasta 6 meses) antes de la aparición de la acción en algunos pacientes.

**[0123]** Los fármacos antidiarreicos también pueden proporcionar un alivio sintomático en algunos pacientes. La terapia nutricional o la dieta elemental también pueden mejorar el estado nutricional de los pacientes e inducir la mejor sintomática de la enfermedad aguda, pero no inducen remisiones clínicas prolongadas. Se utilizan antibióticos en el tratamiento del sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado secundario y en el tratamiento de complicaciones biogénicas.

**[0124]** La "colitis ulcerosa (UC)" afecta al intestina grueso. La evolución de la enfermedad puede ser continua o

recurrente, leve o severa. La lesión inicial es una infiltración inflamatoria con formación de absceso en la base de las criptas de Lieberkühn. La coalescencia de estas criptas dilatadas y rotas tiende a separar la mucosa suprayacente del suministro sanguíneo, conduciendo a la ulceración. Los síntomas de la enfermedad incluyen calambres, dolor en la parte baja del abdomen, sangrado rectal y frecuentes descargas sueltas que consisten principalmente en sangre, pus y moco con partículas fecales escasas. Puede ser necesaria una colectomía total para una colitis ulcerosa aguda, severa o crónica, no remitente.

[0125] Las características clínicas de UC son muy variables, y la aparición puede ser insidiosa o abrupta, y pueden incluir diarrea, tenesmos y sangrado rectal recurrente. Con una implicación fulminante de todo el colon, puede tener lugar un megacolon tóxico, una emergencia mortal. Las manifestaciones extraintestinales incluyen artritis, Hipoderma gangrenoso, uveítis, y eritema nodoso.

[0126] El tratamiento para UC incluye sulfasalazina y fármacos que contienen salicilato relacionados para casos leves y fármacos corticosteroides en casos graves. La administración tópica de salicilatos o corticosteroides a veces es eficaz, particularmente cuando la enfermedad se limita al intestino distal y está asociada con menores efectos secundarios en comparación con la utilización sistémica. Algunas veces se indican medidas de apoyo, tales como la administración de hierro y agentes antidiarreicos. Algunas veces también se prescriben azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato para utilizar en casos refractarios dependientes de corticosteroides

[0127] Una "modificación" de residuo/posición de aminoácido, tal como se utiliza aquí, se refiere a un cambio de una secuencia primaria de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos inicial, donde el cambio resulta de una alteración en la secuencia que implica dichos residuos/posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones típicas incluyen la sustitución del residuo (o en dicha posición) por otro aminoácido (por ejemplo, una sustitución conservativa o no conservativa), la inserción de uno o más aminoácidos (generalmente menos de 5 ó 3) adyacentes a dicho residuo/posición y la delección de dicho residuo/posición. Una "sustitución de aminoácido", o variación de la misma, se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada (inicial) por un residuo de aminoácido diferente. En general y preferiblemente, la modificación da lugar a la alteración en por lo menos una actividad físicoquímica del polipéptido variante en comparación con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos inicial (o "tipo salvaje"). Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, la actividad físicoquímica que se altera puede ser la afinidad de unión, la capacidad de unión y/o el efecto de unión en una molécula diana.

[0128] El término "aminoácido" en el alcance de la presente invención se utiliza en su sentido más amplio y pretende incluir los L  $\alpha$ -aminoácidos o residuos. Las abreviaturas utilizadas habitualmente de una y tres letras para los aminoácidos naturales son las que se utilizan aquí (Lehninger, A.L., Biochemistry, 2d ed., pág. 71-92, (Worth Publishers, New York, New York, 1975). El término incluye D-aminoácidos, así como aminoácidos modificados químicamente, tales como análogos de aminoácidos, aminoácidos naturales que no se incorporan normalmente en proteínas, tales como norleucina y compuestos químicamente sintetizados que tienen propiedades conocidas en la técnica por ser características de un aminoácido. Por ejemplo, los análogos o miméticos de fenilalanina o prolina, que permiten la misma restricción conformacional de los compuestos peptídicos que Phe o Pro naturales, están incluidos en la definición de aminoácido. Dichos análogos y miméticos se refieren aquí como "equivalentes funcionales" de un aminoácido. Otros ejemplos de aminoácidos se indican por Roberts y Vellaccio, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Gross and Meiehofer, Eds., Vol. 5, p. 341 (Academic Press, Inc., New York, New York, 1983), que se incorpora en la presente por referencia. Cuando se utiliza una sola letra para designar uno de los aminoácidos naturales, las designaciones son como se encuentran habitualmente en la literatura relevante (véase, por ejemplo Alberts, B. et al. Molecular Biology of the Cell, 3rd ed., Garland Publishing, Inc. 1994, page 57).

[0129] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) en más de un 95% en peso de anticuerpo, determinado por el método de Lowry, y más preferiblemente en más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0130] El término "residuo de dominio variable que se enumera como en Kabat" o "posición de aminoácido que se enumera como en Kabat", y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondiente a un recorte o una inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de

un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de residuos Kabat se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia enumerada Kabat "estándar".

**[0131]** La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente el mismo/la misma", tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la presente invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una significancia biológica y/o estadística escasa o nula en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente inferior a aproximadamente el 50%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 40%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 30%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 20%, preferiblemente aproximadamente inferior a aproximadamente el 10% en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparación.

**[0132]** "Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de la pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad de puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos aquí. Los anticuerpos de baja afinidad se unen en general a antígenos lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que anticuerpos de afinidad elevada se unen en general a antígenos más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos de medición de la afinidad de unión y cualquiera se puede utilizar para los objetivos de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

**[0133]** En una realización, "Kd" o "el valor Kd" según la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con una versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fabs por el antígeno mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (<sup>125</sup>I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, a continuación se captura el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dy nex) se recubren toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM de [<sup>125</sup>I]-antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistentes con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incubaba a continuación durante toda la noche; aunque sin embargo la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Cuando se han secado las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard), y se recuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que produce menos o igual a un 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. Según otra realización, Kd o el valor de Kd se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (kon) y velocidades de disociación (koff) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad "on" supera 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup> mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cuveta de agitación.

Una "velocidad on" o "velocidad de asociación o "kon" según la presente invención también se puede determinar con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (kon) y velocidades de disociación (koff) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. sin embargo, si la velocidad "on" supera  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cuveta de agitación. "Kd" o "el valor Kd" según la presente invención se mide en una realización mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab del anticuerpo y la molécula de antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fabs por el antígeno mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado ( $^{125}\text{I}$ ) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, a continuación se captura el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dy nex) se recubren toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM de  $^{125}\text{I}$ -antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (consistentes con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incuba a continuación durante toda la noche; aunque sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Cuando se han secado las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard), y se recuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que producen menos o igual a un 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. Según otra realización, Kd o el valor de Kd se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (kon) y velocidades de disociación (koff) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad "on" supera  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cuveta de agitación.

**[0134]** En una realización, una "velocidad on" o "velocidad de asociación o "kon" según la presente invención también se determina con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10

mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (kon) y velocidades de disociación (koff) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la proporción koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Sin embargo, si la velocidad "on" supera  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación

[0135] La frase "sustancialmente reducido/a" o "sustancialmente diferente", tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo de la presente invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de significancia estadística en el contexto de la característica biológica medida mediante dichos valores (por ejemplo, valores de Kd, respuesta HAMA). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente superior a aproximadamente un 10%, preferiblemente superior a aproximadamente un 20%, preferiblemente superior a aproximadamente un 30%, preferiblemente superior a aproximadamente un 40%, preferiblemente superior a aproximadamente un 50% en función del valor del anticuerpo de referencia/comparación.

[0136] El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" con respecto a la secuencia de un péptido o polipéptido se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de péptido o polipéptido, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se obtienen utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla A siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla A siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la figura 8. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0137] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A.

[0138] A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores en % de la identidad de las secuencias de aminoácidos utilizadas en la presente invención se obtienen tal como se ha descrito en el párrafo anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

Tabla A

```

5      /*
      *
      * C-C increased from 12 to 15
      * Z is average of EQ
10     * B is average of ND
      * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
      */
15     #define _M      -8      /* value of a match with a stop */

      int      _day[26][26] = {
20     /*      A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
      /* A */   { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
      /* B */   { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
25     /* C */   {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
      /* D */   { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
      /* E */   { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
30     /* F */   {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
      /* G */   { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
35
40
45
50
55
60
65

```

```

5  /* H */ {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
10 /* L */ {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */ { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
15 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */ { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
20 /* R */ {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */ { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
25 /* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */ {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
30 /* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */ { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
35 };

/*
40 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

45
#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
50 #define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

55 #define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
60 #define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
65

```

```

#define PINS1      4      /* penalty per residue */

5
struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
10
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
15
    int           score;      /* score at last jmp */
    long          offset;     /* offset of prev block */
    short         ijmp;       /* current jmp index */
20
    struct jmp    jp;         /* list of jmps */
};

25
struct path {
    int           spc;        /* number of leading spaces */
    short         n[JMPS];    /* size of jmp (gap) */
30
    int           x[JMPS];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

35
char            *ofile;      /* output file name */
char            *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char            *prog;       /* prog name for err msgs */
40
char            *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int             dmax;        /* best diag: nw() */
int             dmax0;       /* final diag */
45
int             dna;         /* set if dna: main() */
int             endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
50
int             len0, len1;   /* seq lens */
int             ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int             smax;        /* max score: nw() */
55
int             *xbm;        /* bitmap for matching */
long            offset;     /* current offset in jmp file */
struct diag     *dx;        /* holds diagonals */
60
struct path     pp[2];      /* holds path for seqs */

65

```



```

char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_calloc();

5

10

15  /* Needleman-Wunsch alignment program
   *
   * usage: progs file1 file2
   * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
20  * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
   * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
   * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
25  * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
   * Output is in the file "align.out"
   *
30  * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
   * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
   */
35  #include "nw.h"
   #include "day.h"

40  static _dbval[26] = {
       1, 14, 2, 13, 0, 0, 4, 11, 0, 0, 12, 0, 3, 15, 0, 0, 0, 5, 6, 8, 8, 7, 9, 0, 10, 0
   };

45  static _pbval[26] = {
       1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
50  128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
       1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
       1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
55  };

main(ac, av)                                main
60      int    ac;
       char  *av[];

```

65

```

{
5   prog = av[0];
   if (ac != 3) {
       fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
       fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
10  fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
       fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
       fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
15  exit(1);
   }
   namex[0] = av[1];
20  namex[1] = av[2];
   seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
   seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
25  xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

   endgaps = 0;           /* 1 to penalize endgaps */
30  ofile = "align.out";  /* output file */

   nw();                 /* fill in the matrix, get the possible jmps */
35  readjmps();          /* get the actual jmps */
   print();              /* print stats, alignment */

40  cleanup(0);          /* unlink any tmp files */
}

45

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
50 * pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
55 * to a gap in seq y.
*/
nw()                                                              nw
60 {

65

```

```

char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
int       *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
5 int       ndelx, delx;    /* keep track of delx */
int       *tmp;            /* for swapping row0, row1 */
int       mis;            /* score for each type */
10 int       ins0, ins1;    /* insertion penalties */
register   id;             /* diagonal index */
register   ij;            /* jmp index */
15 register   *col0, *col1; /* score for curr, last row */
register   xx, yy;        /* index into seqs */

20 dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
25 dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
30 ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

smax = -10000;
35 if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
40         ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
45 }
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
50         dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
60 for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
65

```

```

if (endgaps) {
    if (xx == 1)
        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
    else
        col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
    ndelx = xx;
}
else {
    col1[0] = 0;
    delx = -ins0;
    ndelx = 0;
}

...NW
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        }
    }
}

```

```

        ndely[yy] = 1;
    } else
5         ndely[yy]++;
    }

10     /* update penalty for del in y seq;
    * favor new del over ongong del
    */
15     if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (coll[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
20             ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
25             ndelx++;
        }
    } else {
30         if (coll[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
35         } else
            ndelx++;
    }

40     /* pick the maximum score; we're favoring
    * mis over any del and delx over dely
    */
45

50
    ...NW

55     id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        coll[yy] = mis;
    else if (delx >= dely[yy]) {
60         coll[yy] = delx;
    }

```

65

```

    . . . . .
    ij = dx[id].ijmp;
5   if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
10        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
15            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
20    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
25 }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
30    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
35        dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
40                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
45        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
50    }
    if (xx == len0 && yy < len1) {
55        /* last col
        */
        if (endgaps)
60            col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    }
65

```

```

5           if (col1[yy] > smax) {
                smax = col1[yy];
                dmax = id;
            }
10        }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
        col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
15    if (col1[yy-1] > smax) {
        smax = col1[yy-1];
        dmax = id;
20    }
    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
25 (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
30    (void) free((char *)col1);    }

/*
35  *
    * print() -- only routine visible outside this module
    *
40  * static:
    * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
    * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
    * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
45  * nums() -- put out a number line: dumpblock()
    * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
    * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
50  * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
    */

55 #include "nw.h"

#define SPC 3
60 #define P_LINE 256 /* maximum output line */

```

65

```

5      #define P_SPC 3      /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen;      /* set output line length */
10 FILE *fx;      /* output file */

print() print
{
15     int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
20         fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }

25     fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
30     lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
35     if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
40     else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
45     }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
50         lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
55         lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
60     getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);

```

65



```

    pr_align();
}
5
10
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
15
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
20
    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;     /* leading trailing overlap */
{
25
    int        nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char        outx[32];
    double      pct;
    register    n0, n1;
30
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
    */
35
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
40
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

45
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
50
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
55
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
60
65

```

```

        n0++;
        siz1--;
5      }
      else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
10          nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
15          if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
20          p1++;
      }
    }
25
    /* pct homology:
    * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
    * else, knock off overhangs and take shorter core
30    */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
35    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
40    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
45
    i
    ;

50
    fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
    if (gapx) {
55        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
        fprintf(fx,"%s", outx);
60
65

```

...getmat

```

fprintf(fx, " gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
5         (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
           ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
           fprintf(fx, "%s", outx);
10        }
        if (dna)
            fprintf(fx,
15            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
            fprintf(fx,
20            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
25            fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
30            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
            fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
35    }

    static nm;          /* matches in core -- for checking */
    static lmax;        /* lengths of stripped file names */
40    static ij[2];      /* jmp index for a path */
    static nc[2];       /* number at start of current line */
    static ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
45    static siz[2];
    static char *ps[2]; /* ptr to current element */
    static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
50    static char out[2][P_LINE]; /* output line */
    static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

55    /*
    * print alignment of described in struct path pp[]
    */
60
65

```

```

static
pr_align()                                pr_align
5   {
    int      nn; /* char count */
    int      more;
10   register      i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
15   if (nn > lmax)
            lmax = nn;

20   nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
25   ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];    }

30   for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {                                ...pr_align
        for (i = more = 0; i < 2; i++) {
            /*
35   * do we have more of this sequence?
            */
            if (!*ps[i])
40   continue;

            more++;

45   if (pp[i].spc) { /* leading space */
                *po[i]++ = ' ';
                pp[i].spc--;
50   }
            else if (siz[i]) { /* in a gap */
                *po[i]++ = '-';
55   siz[i]--;
            }

60

65

```

```

else {          /* we're putting a seq element
                */
5      *po[i] = *ps[i];
      if (islower(*ps[i]))
          *ps[i] = toupper(*ps[i]);
10     po[i]++;
      ps[i]++;

      /*
      * are we at next gap for this seq?
      */
20     if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
          /*
          * we need to merge all gaps
          * at this location
          */
          siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
          while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
30             siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
          }
          ni[i]++;
35     }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
40        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
45    }
}

}

50
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
55 */
static
dumpblock()                                dumpblock
60
65

```

```

5      {
        register      i;

        for (i = 0; i < 2; i++)
            *po[i]-- = '\0';

10

15      (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
            if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
20                if (i == 0)
                    nums(i);
                if (i == 0 && *out[1])
25                    stars();
                putline(i);
                if (i == 0 && *out[1])
30                    fprintf(fx, star);
                if (i == 1)
                    nums(i);
35            }
        }
    }

40    /*
        * put out a number line: dumpblock()
        */
45    static
    nums(ix)                                nums
    {
        int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
50        {
            char      nline[P_LINE];
            register      i, j;
55            register char *pn, *px, *py;

            for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
60                *pn = ' ';
65

```

```

5      for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == '' || *py == '-')
            *pn = '-';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
10                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
15                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
20                *pn = '-';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
30    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
35 }

/*
40  * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
   */
   static
45  putline(ix)                                     putline
        int    ix;                                {

50
                                                ...putline

        int    i;

55        register char    *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
60            (void) putc(*px, fx);

```

65

```

5      for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
10    * nc[] is number at start of current line
 */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
15        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

20

/*
25    * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
30 stars()                                stars
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

35
    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
40        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
45        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
50        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
55                    cx = '*';
                    nm++;
                }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
60
65

```



```

5
        cx = ':';
        else
        cx = '.';
    }
10    else
        cx = '.';
        *px++ = cx;
15    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
20 }

25

30 /*
    * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
    */
35 static
stripname(pn)                                stripname
    char *pn; /* file name (may be path) */
40 {
    register char *px, *py;

    py = 0;
45    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
50    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
55 }

60

65

```

```

/*
5  * cleanup() -- cleanup any tmp file
   * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
   * g_alloc() -- calloc() with error checkin
   * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
10  * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
   */
#include "nw.h"
15 #include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
20 FILE *fj;

int cleanup();                            /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
30  * remove any tmp file if we blow
   */
cleanup(i)                                cleanup
    int i;
35 {
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
40 }

/*
45  * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
   * skip lines starting with ';', '<', or '>'
   * seq in upper or lower case
50  */
char *
55 getseq(file, len)                        getseq
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
60 {
65

```

```

char      line[1024], *pseq;
5  register char *px, *py;
int       natgc, tlen;
FILE      *fp;

10
if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
15    exit(1);
}
tlen = natgc = 0;
20 while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++)
25        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++;
}
30 if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
    exit(1);
35 }
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

40
                                                                    ...getseq

45 py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

50 while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
55    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
60        else if (islower(*px))

```

65

```

        *py++ = toupper(*px);
5         if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++;
    }
}
10  *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
15  dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

20
char *
g_alloc(msg, nx, sz)                                g_alloc
25     char *msg;          /* program, calling routine */
    int  nx, sz;         /* number and size of elements */
{
30     char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
35         if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
            sz);
            exit(1);
40         }
    }
    return(px);
45 }

/*
50  * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
    */
readjmps()                                          readjmps
55  {
    int      fd = -1;
    int      siz, i0, i1;
60     register i, j, xx;

65

```

```

if (fj) {
    (void) fclose(fj);
5     if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
        cleanup(1);
10    }
}
for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
15     while (1) {
        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
            ;

20
                                                    ...readjmps

        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
25            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
30        }
        else
            break;
35    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
40        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
45        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
50        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
            */
55            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
60
65

```

```

        gapy++;
        ngapy -= siz;
5      /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
10     }
        else if (siz > 0) {      /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
15     pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
20     /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
25     }
        }
        else
30     break;
    }

    /* reverse the order of jmps
    */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
40     i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
45     i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
50     if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
55     (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
60     }
    }

```

65

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
5  writejumps(ix)                                writejumps
    int    ix;
10  {
    char  *mktemp();

15  if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
20            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
25            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
30    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
35

```

[0139] El término “vector”, tal como se utiliza aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular al que se pueden unir segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden unir segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, de este modo, se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se refieren aquí como “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores recombinantes”). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, “plásmido” y “vector” se pueden utilizar indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más utilizada habitualmente.

[0140] “Polinucleótidos” o “ácido nucleico”, se utilizan indistintamente aquí, para referirse a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación en la estructura de nucleótidos se puede realizar antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la síntesis, tal como mediante la conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “caps”, sustitución de uno o más nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidos, tales como, por ejemplo, aquellas con uniones no cargadas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen grupos colgando, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, pli-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, se puede sustituir cualquier grupo hidroxilo

presente normalmente en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupos de bloqueo orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son conocidas generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como metil ribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativa. Estos grupos de unión alternativa incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR.sub.2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH.sub.2 ("formacetal"), en que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C.) que opcionalmente contienen una unión éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser idénticas. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos referidos aquí, incluyendo ARN y ADN.

[0141] "Oligonucleótido," tal como se utiliza aquí, se refiere en general a polipéptidos cortos generalmente sintéticos y generalmente de una cadena que generalmente, pero no necesariamente, tienen una longitud inferior a aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no se excluyen mutuamente. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

[0142] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (tal como se describe con más detalle aquí). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

[0143] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, donde la parte mantiene preferiblemente por lo menos una, preferiblemente la mayoría o todas, las funciones asociadas normalmente con la parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de este modo, mantiene la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, mantiene por lo menos una de las funciones biológicas asociadas normalmente con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la vida media del anticuerpo, la función ADCC y la unión a complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad in vivo al fragmento.

[0144] El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen habitualmente anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno.

[0145] Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

[0146] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las



regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y las referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

**[0147]** Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que se puede unir selectivamente un anticuerpo. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno diana es un polipéptido. Un "armazón humano aceptor" para los objetivos de la presente invención es un armazón que comprende la secuencia de aminoácidos de un armazón VL o VH derivado de un armazón de inmunoglobulina humana, o de un armazón consenso humano. Un armazón humano aceptor "derivado de" un armazón de inmunoglobulina humana o armazón consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. Cuando están presente cambios preexistentes de aminoácidos, preferiblemente están presentes no más de 5 y preferiblemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios de aminoácidos preexistentes. Cuando están presente cambios preexistentes de aminoácidos en HV, preferiblemente estos cambios son sólo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en estas posiciones pueden ser en 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el armazón aceptor humano de VL es idéntico en la secuencia a una secuencia del armazón de la inmunoglobulina de VL humana o la secuencia de armazón consenso humano.

**[0148]** Un "armazón consenso humano" es un armazón que representa el residuo de aminoácido más habitual en una selección de secuencias armazón VL o VH de inmunoglobulinas humanas. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulinas humanas es a partir de un subgrupo de secuencias de dominios variables. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al. En una realización, para VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat et al. En una realización, para VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al.

**[0149]** Un "armazón consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa de ligera variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácidos del armazón consenso del subgrupo I de VL comprende por lo menos una parte o toda de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO:34)-L1-WYQQKPGKAPKLLI (SEC ID NO:35)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO:36)-L3-FGQGTKVEIKR (SEC ID NO:37).

**[0150]** Un "armazón consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de pesada variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácidos del armazón consenso del subgrupo III de VH comprende por lo menos una parte o toda de cada una de las siguientes secuencias:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO:38)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEC ID NO:39)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEC ID NO:40)-H3-WGQGLTVTVSS (SEC ID NO:41).

**[0151]** Un "armazón humano no modificado" es un armazón humano que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el armazón humano aceptor, por ejemplo, que carece de sustituciones de aminoácidos humanos a no humanos en el armazón humano aceptor.

**[0152]** Una "región hipervariable alterada" para los objetivos de la presente invención es una región hipervariable que comprende una o más (por ejemplo, una a aproximadamente 16) sustituciones de aminoácidos en la misma.

**[0153]** Una "región hipervariable no modificada" para los objetivos de la presente invención es una región hipervariable que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano del que deriva, es decir, uno que carece de una o más sustituciones en la misma.

**[0154]** El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se utiliza aquí, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Se utiliza un conjunto de delineaciones de la región hipervariable y se comprenden en la presente invención. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más utilizadas habitualmente (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelaje del anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en el análisis de estructuras de cristales complejos disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Tabla 1

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 (Enumeración Kabat)	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1 (Enumeración Chothia)	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

- 5 [0155] Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" tal como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 49-56 ó 50-56 ó 52-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable se enumeran según Kabat et al., supra para cada una de estas definiciones.
- 10 [0156] Residuos de "Armazón" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen aquí.
- 15 [0157] Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se describe aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.
- 20 [0158] Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que da lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee estas alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante el desplazamiento de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o armazón es descrita por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).
- 25 [0159] Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.
- 30 [0160] Un "anticuerpo agonista", tal como se utiliza aquí, es un anticuerpo que mimetiza por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.
- 35 [0161] Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la presente invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas condiciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en la presente invención incluyen tumores malignos y benignos; tumores no leucémicos y linfoides; trastorno neuronal, glial, astrocital, hipotalámico y otros trastornos glandulares, de macrófagos epiteliales, estromales y blastocóclicos; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros trastornos relacionados con la angiogénesis.
- 40 [0162] El término "enfermedad relacionada con el sistema inmune" significa una enfermedad en que un componente del sistema inmune de un mamífero causa, media o en cualquier caso contribuye a una morbilidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en que la estimulación o intervención de la respuesta inmune presenta un efecto de mejora en la progresión de la enfermedad. Se incluyen en este término las enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune, las enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmune, enfermedades infecciosas, enfermedad inmunodeficientes, neoplasia, etc.
- 45 [0163] Entre los ejemplos enfermedades relacionadas con el sistema inmune y enfermedades inflamatorias, algunas de las cuales inmunes o mediadas por células T, que se pueden tratar según la invención, incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miasis inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria nocturna paroximal), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus,
- 50
- 55

enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nervioso central y periférico, tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares, tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune, incluyendo enfermedades de piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como pneumonias eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y pneumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante, incluyen rechazo de injerto o enfermedad de injerto frente a huésped. Las enfermedades infecciosas incluyen enfermedades virales, tales como SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B, C, D, y E, herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones por protozoos e infecciones por parásitos.

**[0164]** Un "trastorno autoinmune" o "enfermedad autoinmune" tal como se utilizan indistintamente aquí es una enfermedad o trastorno no maligno que surge y están dirigidos contra los tejidos del propio individuo. Las enfermedades autoinmunes descritas aquí excluyen específicamente enfermedad o condiciones malignas o cancerosas, particularmente excluyendo el linfoma de células B, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas y leucemia mieloblástica crónica. Ejemplo de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero sin limitación, respuestas inflamatorias, tales como enfermedades inflamatorias de la piel, incluyendo psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); escleroderma sistémica y esclerosis; respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de insuficiencia respiratoria (incluyendo síndrome de insuficiencia respiratoria adulta; ARDS); dermatitis, meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; condiciones alérgicas, tales como eczema y asma y otras patologías que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis, deficiencia de adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémica (SLE); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmune; encefalomiелitis alérgica, síndrome de Sjorgen; diabetes de aparición juvenil; y espuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T hallados normalmente en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de lesiones orgánicas múltiple: anemia hemolítica (incluyendo, pero sin limitación, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia gravis; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de la membrana basal anti-glomerular; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide bulloso; penfigoide; poliendocrinopatías autoinmunes; enfermedad de Reiter; síndrome del hombre rígido; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis compleja inmune; nefropatía de IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o trombocitopenia autoinmune etc.

**[0165]** El término "trastornos inflamatorios gastrointestinales" es un grupo de trastornos crónicos que causan inflamación y/o ulceración en la membrana mucosa. Por tanto, el término incluye enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada y colitis infecciosa), mucositis (por ejemplo, mucositis oral, mucositis gastrointestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrotizante y esofaguitis.

**[0166]** Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

**[0167]** "Tumor", tal como se utiliza aquí, se refiere al crecimiento y proliferación de todas las células neoplásicas, tanto malignas como benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular" y "tumor" no se excluyen mutuamente tal como se refieren aquí.

**[0168]** Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento/proliferación celular no regulada. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer Gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hematoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

**[0169]** La desregulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que se pueden tratar mediante composiciones y métodos de la presente invención. Estos trastornos incluyen condiciones tanto neoplásicas como no neoplásicas. Las neoplásicas incluyen, pero sin limitación, las descritas anteriormente. Entre los trastornos no

neoplásicos se incluyen, pero sin limitación, la hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (RA), psoriasis, placas psoriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatías diabéticas y otras retinopatías proliferativas incluyendo retinopatía de premadurez, fibroplasia retroental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización por injerto corneal, rechazo de injerto corneal, neovascularización retinal/coroidal, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, restenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otros tejidos, inflamación crónica, inflamación de pulmón, lesión pulmonar aguda/ARDS, sepsis, hipertensión pulmonar primario, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado con ictus agudo/lesión cerrada en la cabeza/trauma), inflamación sinovial, formación de pannus en RA, miositis osificante, formación hipertrópica de huesos, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovarios poliquísticos, endometriosis, tercer espacio de enfermedades de fluidos (pancreatitis, síndrome de compartimento, quemaduras, enfermedad del intestino), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica, tal como IBD (enfermedad Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad de intestino inflamatorio, síndrome nefrótico, crecimiento de masa de tejido no deseado o aberrante (no cáncer), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento de cabello, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, fibroplasias retroental, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como la asociada a pericarditis) y efusión pleural.

[0170] Tal como se utiliza aquí, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar la evolución natural del individuo o la célula en tratamiento, y se puede realizar por profilaxis o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o reaparición de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o cura parcial del estado patológico y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se utilizan los anticuerpos de la presente invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

[0171] Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

[0172] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la presente invención, agonista o antagonista puede variar según factores, tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista son sobrevaluados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, pero no necesariamente, dado que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente activa será inferior a la cantidad terapéuticamente activa.

[0173] El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina, u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos a continuación. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

[0174] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes tales como la tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; los alquilsulfonatos tales como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas tales como la benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; las etileniminas y metilamelaminas, incluyendo la altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentioposforamida y trimetilolomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lacona; lapacol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la briostatina; la calistatina; el CDC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofílico; teniposide; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; las mostazas nitrogenadas tales como el clorambucilo, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el hidrocloreto del óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida, la mostaza de uracilo; las nitrosureas tales como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina, y la ranimustina; los antibióticos

tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gammall y la caliqueamicina omegall (véase, por ejemplo, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo de la neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adriamicina®) (incluyendo la morfolino-doxorubicina, la cianomorfolino-doxorubicina, la 2-pirrolino-doxorubicina y la desoxidoxorubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarubicina, la marcelomicina, las mitomicinas tales como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiomicina, la puomicina, la quelamicina, la rodoxubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la zinostatina, la zorubicina; los anti-metabolitos tales como el metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico tales como la denopterina, el metotrexato, la pteropterina, el trimetrexato; los análogos de purina tales como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiampirina, la tioguanina; los análogos de pirimidina tales como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxilfluridina, la enocitabina, la floxuridina; los andrógenos tales como la calusterona, el propionato de mestanolona, el epitioestanol, la mepitioestana, la testolactona; los anti-adrenales tales como la aminoglucetimidina, el mitotano, el trilostano; los rellenos de ácido fólico tales como el ácido frolínico; la aceglatona; el glicósido de aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucilo; el bisantreno; el edatrazato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfomitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiurea; el lentinano; la lonidainina; los maitansinoides tales como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentostatina; el fenameto; la pirarubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidrazida; la procarbazona; el complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); la razoxana; la rizoxina; el sizofirano; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaziquona; la 2,2',2"-trichlorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINA®, FILDESINA®); la dacarbazina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromano; la gacitosina; el arabinósido ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), formulación en nanopartículas de paclitaxel diseñado en albúmina, libre de Cremóforos ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y el doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); el cloranbucilo; la gemcitabina (Gemzar®); la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los análogos de platino tales como el cisplatino y carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; la vinorelbina (Navelbine®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides tales como el ácido retinoico; la capecitabina (XELODA®); y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviación para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviación para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0175] También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden inducir el crecimiento del cáncer y, a menudo, en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser hormonas en sí. Entre los ejemplos se incluyen antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógeno selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), EVTSTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; anti-progesteronas; subreguladores del receptor de estrógeno (ERDs); agentes que actúan para suprimir o desactivar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), tales como LUPRON® y acetato de leuprolide ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglucetimidina, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID®, o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo del 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en mecanismos de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas con terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAPID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa dual de ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

[0176] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento depende de la activación de beta7 *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes de beta7 en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento

incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis en células.

**[0177]** "Doxorrubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexapiranosil) oxij]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

**[0178]** Los compuestos útiles en terapia de combinación con un anticuerpo antagonista anti-beta7 de la invención incluyen anticuerpos (incluyendo, sin limitación, otros anticuerpos antagonistas anti-beta7 (Fib 21, 22, 27, 30 (Tidswell, M. (1997) supra) o derivados humanizados de los mismos), anticuerpos anti-alfa4 (tales como ANTIGEN®), anti-TNF (REMICADE®)) o compuestos no proteicos incluyendo, sin limitación, compuestos 5-ASA ASACOL®, PENTASA™, ROWASA™, COLAZAL™, y otros compuestos, tales como Purinetol y esteroides, tales como prednisona. En una realización, la invención comprende un método de tratamiento de un paciente, tal como un paciente humano, con el anticuerpo antagonista anti-beta7 de la invención solo o en combinación con un segundo compuesto que también es útil en el tratamiento de la inflamación. En una realización, el segundo compuesto se selecciona del grupo que consiste en Fib 21, 22, 27, 30, o derivados humanizados de los mismos), anticuerpos anti-alfa4, ANTEGEN®, anti-TNF, REMICADE®, compuestos 5-ASA, ASACOL®, PENTASA™, ROWA-SA™, COLAZAL™, Purinetol, esteroides, y prednisona. En una realización de la invención, la administración del anticuerpo antagonista anti-beta7 de la invención reduce sustancialmente la dosis del segundo compuesto. En una realización, dicha reducción en la dosis del segundo compuesto es por lo menos del 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 80%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%. En una realización de la invención, la combinación del anticuerpo de la invención y la dosis reducida del segundo compuesto alivia los síntomas en el paciente hasta sustancialmente el mismo grado o mejor que la administración del segundo compuesto solo.

#### Generación de anticuerpos variantes que muestran una reducción o ausencia de respuesta HAMA

**[0179]** La reducción o eliminación de una respuesta de HAMA (anti-ratón humana (también aplicable a anti-rata humana o anti-humano humano) es un aspecto significativo de desarrollo clínico de agentes terapéuticos adecuados. Véase, por ejemplo, Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41: 572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. Tal como se describe aquí, la presente invención proporciona anticuerpos que están humanizados, de manera que la respuesta a HAMA se reduce o elimina. Las variantes de estos anticuerpos se pueden obtener además utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación.

**[0180]** Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo tal como se describe aquí puede actuar como secuencia de partida (parental) para la diversificación de la secuencia o secuencias del armazón y/o hipervariable. A la secuencia de armazón seleccionada a la que se une la secuencia hipervariable de partida se hace referencia aquí como un armazón humano aceptor. Aunque los armazones humanos aceptores pueden ser, o derivan de, una inmunoglobulina humana (las regiones VL y/o VH de la misma), preferiblemente los armazones humanos aceptores son de, o derivan de, un armazón consenso humano como tal, los armazones han demostrado tener una inmunogenicidad mínima o nula en pacientes humanos.

**[0181]** Cuando el aceptor deriva de una inmunoglobulina humana, se puede seleccionar opcionalmente una secuencia de armazón humana que se selecciona en base a su homología con la secuencia del armazón dadora mediante la alineación de la secuencia del armazón dadora con varias secuencias de armazón humanas en un conjunto de secuencias de armazón humanas y la selección de la secuencia de armazón más homóloga.

**[0182]** En una realización, los armazones consenso humanos de la presente invención son de, o derivan de, las secuencias de armazón consenso del subgrupo III de VH y/o el subgrupo I kappa de VL.

**[0183]** De este modo, el armazón humano aceptor de VH puede comprender una, dos, tres o todas las secuencias de armazón siguientes:

FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO:38),  
 FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEC ID NO:39),  
 FR3 que comprende RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRAEDTAVYYC (SEC ID NO:42), donde X1 es A o R, X2 es T  
 o N, y X3 es A o L,  
 FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID NO:41).

**[0184]** Entre los ejemplos de armazones consenso de VH se incluyen:

10 Armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos CDR Kabat (SEC ID NO:19);  
 armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOs:20-22);  
 armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos CDR Kabat (SEC ID NO:48);  
 armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos regiones hipervariables menos regiones hipervariables  
 extendidas (SEC ID NOs:49-51);  
 15 armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos CDR Kabat (SEC ID NO:52);  
 armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos regiones hipervariables menos regiones hipervariables  
 extendidas (SEC ID NOs:53-55);  
 armazón aceptor de VH humano menos CDR Kabat (SEC ID No. 56),  
 armazón aceptor de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEC Id Nos. 57-58);  
 20 armazón del aceptor 2 de VH humano menos CDR Kabat (SEC ID NO:59); o  
 armazón del aceptor 2 de VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOs:60-62).

**[0185]** En una realización, el armazón humano aceptor de VH comprende una, dos, tres o todas de las secuencias de armazón siguientes:

25 FR1 que comprende EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO:38),  
 FR2 que comprende WVRQAPGKGLEWV (SEC ID NO:39),  
 FR3 que comprende RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEC ID NO:43),  
 RFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEC ID NO:44),  
 30 RFTISRDTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCA (SEC ID NO:45),  
 RFTTSADTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCA (SEC ID NO:46),  
 FR4 que comprende WGQGTLVTVSS (SEC ID NO:41).

**[0186]** El armazón humano aceptor de VL puede comprender una, dos, tres o todas de las secuencias de armazón siguientes:

35 FR1 que comprende DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO:34),  
 FR2 que comprende WYQQKPGKAPKLLI (SEC ID NO:35),  
 FR3 que comprende GVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO:36),  
 40 FR4 que comprende FGQGTKVEIKR (SEC ID NO:37).

**[0187]** Entre los ejemplos de armazones consenso de VL se incluyen:

45 Armazón consenso del subgrupo I kappa de VL humano (SEC ID No. 14);  
 Armazón consenso del subgrupo I kappa de VL humano (HVR-L2 extendido) (SEC ID No. 15);  
 Armazón consenso del subgrupo II kappa de VL humano (SEC ID No. 16);  
 Armazón consenso del subgrupo III kappa de VL humano (SEC ID No. 17); o  
 Armazón consenso del subgrupo IV kappa de VL humano (SEC ID No. 18).

50 **[0188]** Aunque el aceptor puede ser idéntico en la secuencia a la secuencia de armazón humana seleccionada, tanto  
 si es de una inmunoglobulina humana o un armazón consenso humano, la presente invención contempla que la  
 secuencia aceptora pueda comprender sustituciones de aminoácido existentes en relación con la secuencia de  
 inmunoglobulina humana o la secuencia del armazón consenso humano. Estas sustituciones preexistentes son  
 preferiblemente mínimas; normalmente cuatro, tres, dos o una diferencia de aminoácidos sólo en relación con la  
 55 secuencia de inmunoglobulina humana o la secuencia del armazón consenso.

**[0189]** Los residuos de la región hipervariable del anticuerpo no humano se incorporan en los armazones humanos  
 aceptores de VL y/o VH. Por ejemplo, se pueden incorporar residuos correspondientes a los residuos CDR Kabat,  
 los residuos de bucle hipervariable Chothia, los residuos Abms, y/o residuos de contacto. Opcionalmente, se  
 60 incorporan los siguientes residuos de la región hipervariable extendida: 24-34 (L1), 49-56 (L2) y 89-97 (L3), 26-35  
 (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, ó 95-102 (H3).

**[0190]** Aunque aquí se describe la "incorporación" de residuos de la región hipervariable, se entenderá que esto se  
 puede conseguir de varias maneras, por ejemplo, se pueden generar ácidos nucleicos que codifican la secuencia de  
 65 aminoácidos deseada mediante la mutación de ácidos nucleicos que codifican la secuencia del dominio variable de  
 ratón, de manera que los residuos del armazón de la misma se cambian a residuos del armazón humano aceptor, o

mediante la mutación de ácidos nucleicos que codifican la secuencia del dominio variable humano, de manera que los residuos del dominio hipervariable se cambian a residuos no humanos, o mediante la síntesis de ácido nucleico que codifica la secuencia deseada, etc.

5 **[0191]** En los ejemplos de la presente invención, se generaron variantes injertadas en la región hipervariable mediante mutagénesis Kunkel de ácido nucleico que codifica las secuencias aceptoras humanas utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Se pueden introducir cambios apropiados en el armazón y/o la región hipervariable utilizando técnicas de rutina para corregir y reestablecer las interacciones región hipervariable-antígeno correctas.

10 **[0192]** La expresión en fagémidos (también referido aquí como expresión en fagos en algunos contextos) se puede utilizar como un método conveniente y rápido para generar y cribar muchos anticuerpos variantes potenciales diferentes en una biblioteca generada mediante obtención aleatoria de secuencias. Sin embargo, existen otros métodos para el experto en la materia para fabricar y cribar anticuerpos alterados.

15 **[0193]** La tecnología de expresión en fagémidos ha proporcionado una herramienta potente para generar y seleccionar proteínas nuevas que se unen a ligando, tales como antígeno. Utilizando las técnicas de expresión en fagémidos se permite la generación de bibliotecas grandes de variantes de proteínas que se pueden clasificar rápidamente para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con una afinidad elevada. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes se fusionan en general a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de envoltura viral, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de expresión en fagémicos monovalentes donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o polipéptido se fusiona a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una parte de la proteína del gen III. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). En un sistema de expresión en fagémicos monovalentes, la fusión génica se expresa a niveles bajos y también se expresan las proteínas del gen III de tipo salvaje, de manera que se mantiene la infectividad de las partículas. Los métodos de generación de bibliotecas de péptidos y el cribado de estas bibliotecas se han descrito en muchas patentes (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,723,286, Patente de Estados Unidos. 5,432, 018, Patente de Estados Unidos. 5,580,717, Patente de Estados Unidos No. 5,427,908 y Patente de Estados Unidos No. 5,498,530).

25 **[0194]** Las bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión a antígeno se han preparado de una serie de manera que incluyen la alteración de un único gen mediante la inserción de secuencias de ADN aleatorias o mediante la clonación de una familia de genes relacionados. Los métodos para expresar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno utilizando la expresión en fagémicos se han descrito en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717, y 5,658,727. La biblioteca se criba a continuación por la expresión de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno con las características deseadas.

35 **[0195]** Los métodos de sustitución de un aminoácido de elección en un ácido nucleico de molde están bien establecidos en la técnica, algunos de los cuales se describen aquí. Por ejemplo, los residuos de la región hipervariable se pueden sustituir utilizando el método Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

40 **[0196]** La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los grupos de codones designados para los residuos de región hipervariable a alterar. El grupo de codones es un grupo de secuencias de tres nucleótidos diferentes utilizado para codificar aminoácidos variantes deseados. Los grupos de codones se pueden representar utilizando símbolos para designar nucleótidos concretos o mezclas equimolares de nucleótidos tal como se muestra a continuación según el código IUB.

#### 50 CÓDIGOS IUB

**[0197]**  
 G Guanina  
 A Adenina  
 55 T Timina  
 C Citosina  
 R (A o G)  
 Y (C o T)  
 M (A o C)  
 60 K (G o T)  
 S (C o G)  
 W (A o T)  
 H (A o C o T)  
 B (C o G o T)  
 65 V (A o C o G)  
 D (A o G o T)H



N (A o C G o T)

[0198] Por ejemplo, en el codón DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este grupo de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, y Cys.

[0199] Los grupos de oligonucleótidos o sondas se pueden sintetizar utilizando métodos estándar. Se puede sintetizar un conjunto de oligonucleótidos, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el grupo de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótidos seleccionados en ciertas posiciones es conocida en la técnica. Dichos grupos de nucleótidos que tienen grupos de codones se pueden sintetizar utilizando sintetizados de ácidos nucleicos comerciales (disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un grupo de oligonucleótidos sintetizados que tienen un grupo de codones particulares incluirá habitualmente una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes, las diferencias establecidas por el grupo de codones en la secuencia general.

Los oligonucleótidos, tal como se utilizan en la presente invención, presentan secuencias que permiten la hibridación a un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden incluir sitios para enzimas de restricción para fines de clonación.

[0200] En un método, las secuencias de ácido nucleico que codifican los aminoácidos variantes se pueden crear mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido. Esta técnica es bien conocida en el sector tal como se describe en Zoller et al. *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504 (1987). Brevemente, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos variantes se crean mediante hibridación de un conjunto de oligonucleótidos que codifican los grupos de codones deseados a una ADN molde, donde el molde es la forma en cadena sencilla del plásmido que contiene una secuencia del ácido nucleico molde de la región variable. Después de la hibridación, se utiliza ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria entera del molde que incorporará de este modo el cebador de oligonucleótidos y contendrá los grupos de codones proporcionados por el grupo de oligonucleótidos.

[0201] En general, se utilizan oligonucleótidos de por lo menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios al molde en cualquier cara del nucleótidos o nucleótidos que codifican para la mutación o mutaciones. Esto asegura que el oligonucleótido se hibridará correctamente a la molécula del ADN molde de cadena única. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente utilizando técnicas conocidas en el sector, tales como las descritas por Crea et al., *Pro. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

[0202] El molde de ADN es generado por aquellos vectores que derivan de los vectores del bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 disponibles comercialmente son adecuados), o aquellos vectores que contienen un origen de replicación del fago de cadena única tal como se describe por Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). De este modo, el ADN a mutar se puede insertar en uno de estos vectores con el fin de generar un molde de cadena única. La producción del molde de cadena única se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook et al., anterior.

[0203] Para alterar la secuencia de ADN nativo, el oligonucleótido se hibrida al molde de cadena única en condiciones de hibridación adecuadas. A continuación, se añade una enzima polimerizante de ADN, normalmente ADN polimerasa de T7 o el fragmento Klenow de ADN polimerasa I, para sintetizar la hebra complementaria del molde utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. De este modo, se forma una molécula de cadena doble heteróloga, de modo que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1 y la otra cadena (el modelo original) codifica la secuencia nativa inalterada del gen 1. Esta molécula de cadena doble heteróloga se transforma a continuación en una célula huésped adecuada, normalmente una procarionta, tal como *E. coli* JM101. Después del crecimiento de las células, se emplazan sobre placas de agarosa y se criban utilizando el cebador de oligonucleótidos radiomarcado con fosfato-32 para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

[0204] El método descrito inmediatamente antes se puede modificar, de manera que se crea una molécula de cadena doble homóloga, en la que ambas cadenas del plásmido contienen la mutación o mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido de cadena única se hibrida al molde de cadena única tal como se describe anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxiribonucleótidos, desoxiriboadenosina (dATP), desoxiriboguanosina (dGTP), y desoxiribotimidina (dTTP), con una tiodesoxiribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que se puede obtener de Amersham). Esta mezcla añade al complejo molde-oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica al molde a excepción de las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión con endonucleasas de restricción. Después de cortar la hebra del molde de la doble cadena heteróloga con una enzima de restricción apropiada, la hebra del molde se puede digerir con la ExoIII nucleasa u otra nucleasa apropiada después de la región que contiene el sitio o sitios a mutagenizar. A continuación, se detiene la reacción para dejar una molécula que sólo tiene parcialmente una única cadena. A continuación, se forma una doble cadena homóloga de ADN utilizando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfato, ATP y ADN ligasa. Esta molécula de doble cadena homóloga se pueden entonces

transferir a una célula huésped adecuada.

[0205] Tal como se ha indicado previamente, la secuencia del grupo de oligonucleótidos es suficientemente larga para hibridarse al ácido nucleico molde y puede contener, pero no necesariamente, sitios de restricción. El molde de ADN se puede generar mediante estos vectores que derivan de vectores del bacteriófago M13 o vectores que contienen un origen de replicación de fago de cadena única tal como se describe por Viera et al. Meth. Enzymol., 153:3 (1987). De este modo, el ADN a mutar debe insertarse en uno de estos vectores con el fin de generar un molde de cadena única. La producción del molde de cadena única se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook et al., supra.

[0206] Según otro método, se puede generar una biblioteca disponiendo de grupos de oligonucleótidos en dirección 5' y 3', cada grupo teniendo una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las secuencias diferentes establecidas por los grupos de codones en la secuencia de los oligonucleótidos. Los grupos de oligonucleótidos en dirección 5' y 3', junto con una secuencia del ácido nucleico de molde del dominio variable, se pueden utilizar en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos PCR. A los productos de PCR se les puede hacer referencia como "cassettes de ácidos nucleicos", ya que se pueden fusionar con otras secuencias de ácido nucleico relacionadas o no relacionadas, por ejemplo, proteínas de envoltura viral y dominios de dimerización, utilizando técnicas de biología molecular establecidas.

[0207] La secuencia de los cebadores de PCR incluye uno o más de los grupos de codones designados para las posiciones accesibles al disolvente y altamente diversas en la región hipervariable. Tal como se ha descrito anteriormente, un grupo de codones es un grupo de secuencias de tres nucleótidos diferentes utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados.

[0208] Se pueden aislar selectores de anticuerpos que cumplen con los criterios deseados, seleccionados a través de las etapas de cribado/selección apropiadas y clonarse utilizando técnicas recombinantes estándar.

#### Vectores, células huésped y métodos recombinantes

[0209] Para la producción recombinante de un anticuerpo de la presente invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula huésped a utilizar. En general, las células huésped preferidas son de origen procarionota o eucariota (generalmente mamíferos).

#### Generación de anticuerpos utilizando células huésped procarionotas:

##### *Construcción de vectores*

[0210] Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos del anticuerpo de la presente invención se pueden obtener utilizando técnicas de recombinación estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas PCR. Una vez obtenidos, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procarionotas. Existen muchos vectores disponibles y conocidos en la técnica que se pueden utilizar para el objetivo de la presente invención. La selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertar en el vector y de la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótidos heterólogo, o ambos) y de su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0211] En general, los vectores de plásmidos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en relación con estos huéspedes. El vector transporta normalmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, E. coli se transforma habitualmente utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de E. coli. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de este modo, proporciona medios para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, o u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o ser modificados para contener, promotores que se pueden utilizar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 utilizados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter et al., U.S. Patent No. 5,648,237.

[0212] Además, los vectores de fagos que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo huésped se pueden utilizar como vectores transformantes en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago como  $\lambda$ GEM.TM.-11 en la fabricación de un vector recombinante que se puede utilizar para transformar células huéspedes susceptibles, tales como E. coli LE392.

[0213] El vector de expresión puede comprender dos o más parejas promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en dirección 5' con respecto al cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas se clasifican normalmente en dos clases, inducible y constitutivo. El promotor inducible es un promotor que inicia mayores niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a los cambios en la condición del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

[0214] Se conoce una gran cantidad de promotores reconocidos por una serie de células huésped potenciales. El promotor seleccionado se puede unir operativamente a ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada mediante la extracción del promotor del ADN de origen a través de la digestión con enzima de restricción y la inserción de la secuencia del promotor aislada en el vector de la presente invención. Se pueden utilizar tanto la secuencia del promotor nativo como de promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que permiten en general una mayor transcripción y rendimientos más elevados del gen diana expresado en comparación con el promotor de polipéptido diana nativo.

[0215] Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, sistemas de promotores de la  $\beta$ -galactamasa y lactosa, un sistema de promotores de triptófano (trp) y promotores híbridos, tales como el promotor tac o el promotor trc. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en las bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Se ha publicado sus secuencias de nucleótidos, permitiendo así a un técnico unirlos a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) utilizando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

[0216] En un aspecto de la presente invención, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de la secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de la membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el objetivo de la presente invención debería ser aquella que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o enterotoxina II (STII) estable al calor, LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la presente invención, las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de la misma.

[0217] En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la presente invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula huésped, y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción en cada cistrón. En este aspecto, se expresan las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas trx-B de E. coli) proporcionan condiciones del citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo así el pliegue y ensamblaje correctos de subunidades de proteínas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

[0218] La presente invención proporciona un sistema de expresión en el que la proporción cuantitativa de los componentes del polipéptido expresado se puede modular con el fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y correctamente ensamblados de la invención. Dicha modulación se lleva a cabo como mínimo en parte mediante la modulación simultánea de fuerzas traduccionales para los componentes del polipéptido.

[0219] Una técnica para modular la fuerza traduccional se describe en Simmons et al., Patente de Estados Unidos. No. 5,840,523. Utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) en un cistrón. Para una TIR determinada, se puede crear una serie de variantes de la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos con un intervalo de fuerzas traduccionales, proporcionando así un medio conveniente por el cual ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR se pueden generar mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan lugar a cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciado de las secuencias Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" en el inicio de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede conseguir mediante el cambio de la tercera posición de nucleótidos de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la fabricación del banco. Este método de mutagénesis se

describe en detalle en Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

[0220] Preferiblemente, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas TIR para cada cistrón en el mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo varias combinaciones de fuerza de TIR. Las fuerzas de TIR se pueden determinar mediante la cuantificación del nivel de expresión de un gen informador tal como se describe en detalle en Simmons et al. Patente de Estados Unidos No. 5, 840,523. En base a la comparación de la fuerza traduccional, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones de vectores de expresión de la presente invención.

[0221] Entre las células huésped procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la presente invención se incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo. Ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (por ejemplo, *E. coli*), Bacilli (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, especies de Pseudomonas (por ejemplo, *P. aeruginosa*), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, o Paracoccus. En una realización, se utilizan células Gram-negativas. En una realización, se utilizan células *E. coli* como huéspedes para la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; Depósito ATCC No. 27,325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 *A/7tMA* ( $\Delta tonA$ ) *ptr3 lac lq lacL8  $\Delta ompT\Delta$ (nmpc-fepE) degP41 kan<sup>R</sup>* (Patente de Estados Unidos No. 5,639,635). También están disponibles otras cepas y derivados de la misma, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli*<sub>h</sub> 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31,608). Estos ejemplos so más ilustrativos que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, como huésped se pueden utilizar de forma adecuada las especies *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* cuando se utilizan plásmidos conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 para suministrar el replicón. Habitualmente la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar de manera deseable inhibidores de proteasas adicionales en el cultivo celular.

#### *Producción de anticuerpos*

[0222] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medio nutriente convencional según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0223] La transformación significa introducir ADN en el huésped procariota, de manera que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro de calcio se utiliza en general para células bacterianas que contienen barreras de paredes celulares sustanciales. Otro método para la transformación utiliza polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utiliza es la electroporación.

[0224] Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos de la presente invención se desarrollan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Entre los ejemplos de medios adecuados se incluyen caldo de luria (LB) más suplementos de nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan el gen de resistencia a ampicilina.

[0225] También se pueden incluir en las concentraciones apropiadas cualquier suplemento necesario además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico introducidos solos o como una mezcla con otro suplemento medio, tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneitol y ditioneitol.

[0226] Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, más preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, incluso más preferiblemente a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es preferiblemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferiblemente aproximadamente 7,0.

[0227] Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión de la presente invención, se induce la expresión de proteínas bajo condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la presente invención,

los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferiblemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Se puede utilizar un conjunto de otros inductores, según la construcción de vector utilizada, tal como se conoce en la técnica.

[0228] En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma y se recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas implica habitualmente la ruptura del microorganismo, generalmente mediante medios, tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, se pueden eliminar la debris celular o las células completas mediante centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía por afinidad de resina. Alternativamente, las proteínas se pueden transportar en el medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células se pueden extraer del cultivo y el sobrenadante de cultivo se filtra y concentra para una purificación posterior de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar posteriormente e identificarse utilizando métodos conocidos habitualmente, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

[0229] En un aspecto de la presente invención, la producción de anticuerpos se realiza en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Existen varios procedimientos de fermentación a gran escala de alimentación por lotes para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferiblemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a escala pequeña se refiere en general a la fermentación en un fermentador que no tiene más de 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

[0230] En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia habitualmente después de que las células hayan crecido bajo condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, DO550 de aproximadamente 180-220, en cuya fase las células se encuentran en una fase estacionaria inicial. Se pueden utilizar un conjunto de inductores, según la construcción de vector utilizada, tal como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células se pueden desarrollar durante periodos de tiempo más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se pueden utilizar una inducción de tiempo más larga o más corta.

[0231] Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la presente invención, se pueden modificar varias condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje correcto y el pliegue de los polipéptidos anticuerpo secretados, se pueden utilizar vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilproilil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para co-transformar las células huésped procariontas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el correcto pliegue y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen et al. (1999) J Bio Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 6,083,715; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 6,027,888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

[0232] Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), se pueden utilizar ciertas cepas huésped deficientes en enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped se pueden modificar para realizar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de E. coli deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), supra; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 5,264,365; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 5,508,192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

[0233] En una realización, las cepas de E. coli deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas se utilizan como células huésped en el sistema de expresión de la presente invención.

#### *Purificación de anticuerpos*

[0234] En una realización, la proteína anticuerpo producida se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que sin sustancialmente homogéneas para ensayos y usos posteriores. Se pueden utilizar métodos de purificación de proteínas estándar conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, "chromatofocusing", SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel utilizando, por ejemplo,

Sephadex G-75.

**[0235]** En un aspecto, se utiliza la proteína A inmovilizada en una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos anticuerpos de longitud completa de la presente invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una gran afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida a la que se inmoviliza la proteína A es preferiblemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferiblemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento por prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

**[0236]** Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular tal como se ha descrito anteriormente, se aplica a la proteína A inmovilizada en la fase sólida para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. A continuación, la fase sólida se lava para eliminar contaminantes no unidos específicamente a la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

Generación de anticuerpos utilizando células huésped eucariotas:

**[0237]** Entre los componentes del vector se incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

*(i) Componente secuencia señal*

**[0238]** Un vector para usar en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es la que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamíferos, se disponen las secuencias señal de mamíferos, así como las secuencias líderes secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex.

**[0239]** El ADN para dicha región de precursor está ligada en el marco de lectura a ADN que codifica el anticuerpo.

*(ii) Origen de replicación*

**[0240]** Generalmente, no es necesario un componente origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano.

*(iii) Componente de gen de selección*

**[0241]** Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sea pertinente, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo.

**[0242]** Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman de forma satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y sobreviven de esta manera al régimen de selección. Algunos ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

**[0243]** Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneina-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneina de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

**[0244]** Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identificaron por primera vez mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza la DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

**[0245]** Alternativamente, se pueden seleccionar células huésped (particularmente huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable, tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH), mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la Patente de Estados Unidos No. 4.965.199.

*(iv) Componente promotor*

5 [0246] Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico del polipéptido anticuerpo. Prácticamente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en dirección 5' desde el sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas.

15 [0247] La transcripción de polipéptidos anticuerpos de vectores en células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus del Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

20 [0248] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. En la Patente de Estados Unidos No. 4.419.446 se describe un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamíferos que utiliza el virus de papiloma bovino como vector. En la Patente de Estados Unidos No. 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Véase también Reyes et al., *Nature*, 297: 598-601 (1982) en la expresión de ADNc de  $\beta$ -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus de herpes simplex. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus de sarcoma de rous se puede utilizar como promotor.

*(v) Componente elemento potenciador*

30 [0249] La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa frecuentemente mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente, se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de células eucariotas. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv. *Nature* 297:17-18 (1982) en elementos de potenciación para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en la posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido anticuerpo, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

*(vi) Componente de la terminación de la transcripción*

45 [0250] Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucariotas también contendrán habitualmente las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5', y alguna vez desde 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase WO 94/11026 y el vector de expresión descrito en la misma.

*(vii) Selección y transformación de células huésped*

55 [0251] Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células eucariotas superiores, descritas en la presente invención, incluyendo células huésped de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10; células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO. Urlaub et al., *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 (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma

humano (Hep G2).

**[0252]** Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo y se cultivan en un medio con nutrientes habituales modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

*(viii) Cultivo de células huésped*

**[0253]** Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo de la presente invención se puede cultivar en una serie de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), Medio Mínimo Esencial (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 ó 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195 o la Patente de Estados Unidos Re. 30.985, se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), soluciones tampón (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN<sup>TM</sup>), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales a nivel micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario se puede también incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán obvias para un técnico habitual.

*(ix) Purificación de anticuerpos*

**[0254]** Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, o se secreta directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, la debris particulada, ya sea células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran generalmente en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de filtración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

**[0255]** La composición de anticuerpos preparada a partir de células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo ésta última la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isótopo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas humanas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  (Lindmark *et al.*, *J. Immunol Meth* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isótopos de ratón y para  $\gamma 3$  humanas (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero se disponen de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permite mayores velocidades de flujo y tiempos de procesado más cortos que los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C<sub>H3</sub>, la resina Bakerbond ABX<sup>TM</sup> (J.T. Baker Philipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-Sefarosa<sup>TM</sup>, cromatografía en una resina de intercambio de anión o catión (tal como una columna de ácido poliaspártico), "chromatofocusing", SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

**[0256]** Tras cualquier etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se pueden someter a una cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente a concentraciones de sales bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

*Ensayos de actividad*

**[0257]** Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica.

**[0258]** Las inmunoglobulinas purificadas se pueden caracterizar adicionalmente mediante una serie de ensayos que incluyen, pero sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida a presión elevada (HPLC), exclusión por tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.



[0259] En ciertas realizaciones de la presente invención, las inmunoglobulinas producidas aquí se analizan por su actividad biológica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la presente invención se analizan por su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que son conocidos en la técnica y que se pueden utilizar aquí incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directa o competitiva utilizando técnicas, tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzima), inmunoensayos de “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A. A continuación en los ejemplos, se proporciona un ensayo de unión a antígeno ilustrativo

[0260] En una realización, la presente invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que lo hace un candidato deseado para muchas aplicaciones en las que la vida media del anticuerpo *in vivo* es muy importante, aunque ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc de la inmunoglobulina producida se miden para asegurar que se mantienen sólo las propiedades deseadas. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* se pueden realizar para confirmar la reducción/agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) se pueden realizar para asegurar que el anticuerpo carece de la unión FcγR (por tanto, que probablemente carece de actividad ADCC), pero mantiene la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar *in vivo*, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad CDC. Para evaluar la activación de complemento, se puede realizar una activación de complemento, un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). La unión a FcRn y las determinaciones de purificación/vida media *in vivo* también se pueden realizar utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección de Ejemplos.

#### Anticuerpos humanizados

[0261] La presente invención comprende anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica varios métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos “importados”, que habitualmente se obtienen de un dominio variable “importado”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0262] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado “mejor-ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como armazón (“framework”) humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza un armazón particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0263] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras de conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina

candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor y secuencias importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

5

#### Variantes de anticuerpos

[0264] En un aspecto, la presente invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende modificaciones en la interfase de los polipéptidos Fc que comprende la región Fc, donde las modificaciones facilitan y/o inducen a la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, donde la protuberancia es posicionable en la cavidad para inducir la formación de complejos entre el primer y segundo polipéptido Fc. Los métodos de generación de anticuerpos con estas modificaciones son conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,731,168.

15

[0265] En algunas realizaciones, se contempla la modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos aquí. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución consigue llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sujeto en el momento en que se produce la secuencia.

25

[0266] Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son posiciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por rastreo de alanina", tal como se describe por Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas posiciones de aminoácidos que demuestran una sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación mediante la introducción de variantes adicionales u otras en los sitios de sustitución o para los mismos. De este modo, mientras que el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la acción de una mutación en un sitio determinado, se realiza la mutagénesis de rastreo de alanina o aleatorio en el codón o región diana y se criban las variantes las inmunoglobulinas expresadas por la actividad deseada.

35

[0267] Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxi terminales que varían de longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencias de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N o C terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en el suero.

40

[0268] Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en la FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 2 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "ejemplos de sustituciones", en la Tabla 2 o tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y cribar los productos.

50

Tabla 2

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Substituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (U)	glu; asn	glu
Cys(C)	ser; ala	ser
Gln(Q)	asn; glu	asn
Glu(E)	asp; gln	asp
Gly(G)	Ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg

Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu(L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	Trp; leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro(P)	Ala	ala
Ser(S)	Thr	thr
Thr(T)	Val; ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

**[0269]** Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar según las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pág. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos : Lys (K), Arg (R), His (H).

**[0270]** Alternativamente, los residuos naturales se pueden dividir en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr; Asn, Gln;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

**[0271]** Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservativos).

**[0272]** Un tipo de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se expresan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetados en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe en la presente invención. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente invención. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente invención y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para un desarrollo posterior.

**[0273]** Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

**[0274]** Puede ser deseable para introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos inmunoglobulina de la presente invención, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en

una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

[0275] Según esta descripción y los conocimientos de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo utilizado en los métodos de la presente invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo salvaje, por ejemplo, en la región Fc. Estos anticuerpos, sin embargo, mantendrían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo salvaje. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar ciertas alteraciones en la región Fc que daría lugar a una unión C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, tal como se describe en WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); Patente de Estados Unidos No. 5,648,260; Patente de Estados Unidos No. 5,624,821; y WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

#### Inmunconjugados

[0276] La presente invención también se refiere a inmunconjugados o conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0277] El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la liberación local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para eliminar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; Patente de Estados Unidos No 4,975,278), teóricamente permite la liberación dirigida de fragmentos de fármacos a los tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes fármacos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad en células normales, así como en las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). De este modo se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Se ha descrito que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21: 183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) supra). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como toxina de difteria, toxinas de plantas, tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maytansinoids (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden realizar sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan a anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

[0278] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopos  $^{111}\text{In}$  o  $^{90}\text{Y}$  unidos por un enlazador-quelante de tiourea (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN presenta actividad contra el Linfoma no de Hodgkin (NHL) de células B, la administración da lugar a citopenias severas y prolongadas en la mayoría de pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto de anticuerpo CD33 hu unido a caliqueamicina, se aprobó en el 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patente de Estados Unidos No 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo C242 hu unido a través de un enlazador disulfuro SPP al fragmento de fármaco de maitansinoide, DM1, está avanzando en las pruebas en la Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal para el antígeno de membrana específico antipróstata (PSMA) unido a un fragmento de fármaco de maitansinoide, DM1, se encuentra en desarrollo para el potencial tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos a Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico a Cd30 en tumores hematológicos) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; y Francisco et al. (2003) Blood 102, 1458-1465) y se encuentran bajo desarrollo terapéutico. Otros compuestos para utilizar como agentes citotóxicos conjugados a fármaco incluyen, sin limitación, auristatina E (AE), MMAF (una variante de auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo terminal del fármaco), y AEVB (valeril bencilhidrazona de auristatina E, un enlazador lábil a ácido a través del C terminal de AE). Entre los enlazadores conjugados útiles para unir un fármaco a un anticuerpo se incluyen, sin limitación, MC (maleimidocaproilo), Val Cit (valina-citulina, sitio dipéptido en el enlazador divisible por proteasa), Citulina (ácido 2-amino-5-ureido pentanoico), PAB (p-aminobencilcarbamoilo, una parte "autoinmoladora" del enlazador), Me (N-metil-valina citulina, donde el

enlace peptídico enlazador ha sido modificado para evitar su rotura por la catepsina B), MC(PEG)6-OH (maleimidocaproylpolietilenglicol, unido a cisteínas de anticuerpo), SPP (N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato), y SMCC (N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1 carboxilato). Estos y otros conjugados de fármacos útiles y su preparación se describen, por ejemplo, en Doronina, S.O. et al., *Nature Biotechnology* 21:778-794 (2003), incorporada en la presente por referencia en su totalidad. Las moléculas enlazadoras particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (véase, por ejemplo, Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173, 723-737 (1978)), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4,563,304), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) (véase, por ejemplo, Número de Registro CAS 341498-08-6), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC) (véase, por ejemplo, Yoshitake et al., *Eur. J. Biochem.*, 101, 395-399 (1979)), y N-succinimidil 4-metil-4-[2-(5-nitropiridil)-ditiopentanoato (SMNP) (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4,563,304).

[0279] Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Existe un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{186}\text{Re}$ . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitella et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

[0280] También se contemplan en la presente invención conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tiene actividad de toxina.

#### Maitansina y maitansinoides

[0281] Se conjuga un anticuerpo de la presente invención (longitud completa o fragmentos) a una o más moléculas maitansinoides.

[0282] Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto *Maytenus serrata* del África del este (Patente de Estados Unidos No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos No. (4,151,042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533.

#### Conjugados maitansinoide-anticuerpo

[0283] En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado a anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunconjugados que comprenden un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. Se observó que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumores *in vivo*. Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992) describen inmunconjugados en los que se conjugó un maitansinoide a través de un enlace disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado Ta.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de la superficie de HER-2 por célula. El fármaco conjugado consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podía incrementar mediante el incremento del número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

*Conjugados (inmunoconjugados) de anticuerpo-maitansinoide*

5 [0284] Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado una eficacia en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras publicaciones de patente y no patente referidas anteriormente aquí. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

10 [0285] Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, y Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, tal como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter.

15 [0286] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como, dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como, bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]), y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

20 [0287] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede estar formado por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

*Caliqueamicina*

25 [0288] Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; y 5,877,296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación,  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-acetil- $\gamma_1^1$ , PSAG, y  $\theta_1^1$  (Hinman et al., CancerRes 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que el anticuerpo se puede conjugar es QFA, un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

*Otros agentes citotóxicos*

30 [0289] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos de la presente invención incluyen BCNU, estreptoizicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5,877,296).

35 [0290] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

40 [0291] La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto

con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desorribonucleasa; ADNasa).

[0292] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo  $tc^{99m}$  o  $I^{123}$ , o un marcador de spin para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, fluor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

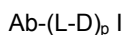
[0293] Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de varias maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, fluor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como,  $tc^{99m}$  o  $I^{123}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$  e  $In^{111}$  se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El ytrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. El método de IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

[0294] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 [1992]; Patente de Estados Unidos No. 5,208,020).

[0295] Los compuestos de la presente invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos interenlazadores: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona) benzoato) que está disponible comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véase las páginas 467-495, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

#### Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco

[0296] En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), se conjuga un anticuerpo (Ab) a uno o más fragmentos de fármacos (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 fragmentos de fármacos por anticuerpo, a través de un enlazador (L). EL ADC de fórmula I se puede preparar mediante varias rutas, utilizando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por un experto en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de una reacción con un fragmento de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de un fragmento de fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo.



[0297] Entre los grupos nucleofílicos en los anticuerpos se incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) hidroxilo o grupos amina de azúcares a donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los fragmentos de enlazador y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS. Ésteres HOBt, haloformiatos y haluros de acilo; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos presentan disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden volver reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará por tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales se pueden introducir en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dado lugar a la conversión de una amina en tiol.

[0298] Los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir grupos electrofílicos, los cuales pueden reaccionar con los sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o fragmentos de fármacos. Los grupos resultantes de base de Schiff iminas pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar uniones amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, las proteínas que contienen los residuos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con met-peryodato sódico dando lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con un nucleófilo de fragmento de fármaco o enlazador.

[0299] Así mismo, los grupos nucleofílicos en un fragmento de fármaco incluye, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en grupos enlazadores y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros de acilo; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida.

[0300] Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado ya estén adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0301] El anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcage de un tumor, en la que se administra el conjugado anticuerpo-receptor al paciente, seguido de la extracción del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente purificador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleido).

#### Derivados de anticuerpos

[0302] Los anticuerpos de la presente invención se puede modificar adicionalmente para contener grupos no proteináceos que son conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Preferiblemente, los grupos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Entre los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua se incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxitilados (por ejemplo, glicerol), polivinil alcohol, y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede presentar ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y pueden ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo pueden variar, y si se unen más de un polímeros, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización se pueden determinar en base a las consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se utilizará bajo condiciones definidas, etc.

#### Formulaciones farmacéuticas

[0303] Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la presente invención se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras formulaciones en seco. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol



(PEG).

**[0304]** La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

**[0305]** Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edición, Osol, A. Ed. (1980).

**[0306]** Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles

**[0307]** Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metakrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico liberan las moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el organismo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, el uso de aditivos apropiados y el desarrollo de composiciones específicas de la matriz de polimérica.

#### Usos

**[0308]** Un anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en, por ejemplo, métodos terapéuticos in vitro, ex vivo e in vivo. Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar como antagonista para bloquear parcial o totalmente la actividad de antígeno específica in vitro, ex vivo y/o in vivo. Además, por lo menos algunos de los anticuerpos de la presente invención pueden neutralizar la actividad de antígeno de otra especie. Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para inhibir una actividad de antígeno específica, por ejemplo, en un cultivo celular, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen el antígeno con el que un anticuerpo de la presente invención reacciona de forma cruzada (por ejemplo, chimpancé, babuino, marmoset, cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo de la presente invención se puede utilizar para inhibir actividades de antígeno mediante el contacto del anticuerpo con el antígeno, de manera que se inhibe la actividad de antígeno. Preferiblemente, el antígeno es una molécula proteica humana.

**[0309]** En una realización, un anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en un método para inhibir un antígeno en un sujeto que sufre de un trastorno en el que la actividad de antígeno es perjudicial, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la presente invención, de manera que se inhibe la actividad de antígeno en el sujeto. Preferiblemente, el antígeno es una molécula proteica humana y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno con el que se une un anticuerpo de la presente invención. El sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido el antígeno (por ejemplo, mediante la administración del antígeno o mediante la expresión de un transgén de antígeno). Un anticuerpo de la presente invención se puede administrar a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, se puede administrar un cuerpo de la presente invención a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que la inmunoglobulina reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate un cerdo o un ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, ensayos de dosis y evolución con el tiempo de la administración). Entre los anticuerpos de bloqueo de la presente invención que son terapéuticamente útiles se incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, anticuerpos anti-HER2, anti-VEGF, anti-IgE, anti-CD11, anti-interferón y anti-factor tisular. Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar para tratar, inhibir, retrasar la progresión, evitar/retrasar la reaparición, mejorar o evitar enfermedades, trastornos o condiciones asociadas con

la expresión anormal y/o actividad de uno o más moléculas de antígeno, incluyendo, pero sin limitación, tumores malignos y benignos; tumores no de leucemia y tumores linfoides; trastornos neuronal, glial, astrocital, hipotalámico y otros trastornos glandulares, macrófágico, epitelial, estromal y blastocoélico; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

5  
[0310] En un aspecto, un anticuerpo de bloqueo de la presente invención es específico para un antígeno ligando e inhibe la actividad de antígeno mediante el bloqueo o interferencia con la interacción ligando-receptor que implica al antígeno ligando, inhibiendo de este modo el correspondiente mecanismo de la señal y otros sucesos moleculares o celulares. La presente invención también caracteriza los anticuerpos específicos de receptores que no evitan necesariamente la unión a ligando, pero interfieren con la activación del receptor, inhibiendo de este modo cualquier respuesta que normalmente se iniciaría por la unión a ligando. La presente invención también comprende anticuerpos que preferiblemente o exclusivamente se unen a complejos ligando-receptor. Un anticuerpo de la presente invención puede actuar también como agonista de un receptor antígeno particular, potenciando, aumentando o activando de este modo todas las actividades o parte de ellas de la activación del receptor mediada por ligando.

10  
15  
[0311] En ciertas realizaciones, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno al que se une es internalizado por la célula, dando lugar a un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la citólisis de la célula diana a la que se une. En una realización, el agente citotóxico reconoce o interfiere con el ácido nucleico en la célula diana. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquier agente quimioterapéutico indicado en la presente invención (tal como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radioactivo o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

20  
25  
30  
35  
[0312] Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar solos o combinados con otras composiciones en terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención se puede coadministrar con otro anticuerpo, agente o agentes quimioterapéuticos (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), otro agente o agentes citotóxicos, un agente o agentes anti-angiogénicos, citoquinas y/o un agente o agentes inhibidores del crecimiento. Cuando un anticuerpo de la presente invención inhibe el crecimiento tumoral, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o más agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento tumoral. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención se puede combinar con un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN) y/o anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo, el anticuerpo anti-HER2 HERCEPTIN®) en una pauta de tratamiento, por ejemplo, en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas aquí, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de mama metastático y cáncer de riñón. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede recibir una terapia por radiación combinada (por ejemplo, radiación de rayos externos o terapia con un agente marcado radioactivamente, tal como un anticuerpo). Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen la administración combinada (donde dos o más agentes están incluidos en la misma formulación o formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la presente invención puede tener lugar antes y/o después de la administración de la terapia o terapias adjuntas.

40  
45  
[0313] El anticuerpo de la presente invención (y el agente terapéutico adjunto) se administran mediante cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra de manera adecuada mediante infusión por pulsos, particularmente con dosis de crecientes de anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

50  
55  
[0314] La composición de anticuerpos de la presente invención se formulará, dosificará y administrará de un modo consistente con la buena práctica médica. Los factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno concreto a tratar, el mamífero específico a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de liberación del agente, el método de administración, las pautas de administración, y otros factores conocidos para los médicos. El anticuerpo no necesita, pero se puede formular opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para evitar o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores descritos anteriormente. Éstos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con las rutas de administración, tal como se utilizan aquí anteriormente, o aproximadamente de 1 a 99% de las dosis utilizadas aquí anteriormente.

60  
65  
[0315] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la presente invención (cuando se utiliza solo o combinado con otros agentes, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administrar para fines preventivos o terapéuticos y la discreción del médico. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente de una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones

separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. De este modo, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ó 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente recibe desde aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación de ejemplo comprende la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

#### 15 Artículos de fabricación

[0316] Se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indican que la composición se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de elección, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un anticuerpo de la presente invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un agente citotóxico adicional. El artículo de fabricación puede comprender además, en esta realización de la invención, un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones de anticuerpo se pueden utilizar para tratar una enfermedad particular, por ejemplo, el cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF), una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0317] A continuación, se indican ejemplos de los métodos y composiciones de la presente invención. Se entiende que se pueden realizar varias realizaciones, teniendo en cuenta la descripción general proporcionada anteriormente.

#### 40 **EJEMPLOS**

[0318] Los ejemplos de la presente invención describen la generación de anticuerpos anti-beta7 humanizados de un anticuerpo anti-ratón de rata que se une a la subunidad beta7 de la integrina alfa4beta7.

#### 45 Ejemplo 1: Humanización de un anticuerpo antagonista de beta7

##### Materiales y Métodos

[0319] El número de residuos es según Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Se utilizan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra. Se representan las degeneraciones de ADN utilizando el código IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = G/T).

[0320] *Injertos directos en la región hipervariable en el armazón consenso humano aceptor* - El fagémido utilizado para este trabajo, pV0350-2B, era un vector de expresión Fab-g3 monovalente que tenía 2 marcos de lectura abiertos bajo el control del promotor phoA, esencialmente tal y como se describe en Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93. El primer marco de lectura abierto consiste en la secuencia señal stII fusionada a los dominios VL y CH1 de la cadena ligera aceptor y el segundo consiste en la secuencia señal stII fusionada a los dominios VL y CH1 de la cadena pesada aceptor seguidos de una forma truncada de la proteína P3 de recubrimiento del fago menor (Lowman, H. et al. (1990) Biochemistry 30:10832).

[0321] Se alinearon los dominios VL y VH de rata Fib504 (anticuerpo FIB504.64 producido por el hibridoma ATCC HB-293, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) con los dominios kappa I de consenso humano (huKI) y VH de consenso del subgrupo III humano (huIII). Para fabricar los injertos de la región hipervariable (HVR), se utilizaron los siguientes armazones: se utilizó HuKI para el armazón de dominio variable de cadena ligera (véanse las figuras 1A y 7). Para el armazón del dominio variable de cadena pesada, el

armazón de VH aceptor, un dominio de VH consenso del subgrupo III (humIII) humano modificado que difiere de la secuencia humIII en 3 posiciones: se pueden utilizar R71A, N73T, y L78A (véase Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992) (véase la figura 1B)). En la generación de anticuerpos de la presente invención, también se preparó el injerto 504K-RF a partir del dominio VH de consenso del subgrupo humano modificado mediante la realización de las siguientes sustituciones de aminoácidos: A71R y A78F.

[0322] Se diseñaron regiones hipervariables de Fib504 de rata (producidas por el hibridoma ATCC HB-293) en el armazón de VH consenso del subgrupo III humano aceptor para generar un injerto directo en HVR (injerto Fib504) (véase la figura 1B). En el dominio de VL, las siguientes regiones de Fib504 de rata se injertaron en el aceptor consenso humano, huKI: las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) (Figura 1A). En el dominio de VH, se injertaron las posiciones 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 94-102 (H3) (Figura 1B). Además, se construyó un segundo injerto en HVR, injerto Fib504K, que también incluía en la HVR, la posición 49 de VL, en base a una definición ampliada para L2 (véase MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)). MacCallum et al. han analizado las estructuras cristalinas del complejo de anticuerpo y antígeno y se encontró que la posición 49 de la cadena ligera y las posiciones 49 y 94 de la cadena pesada son partes de la región de contacto con el antígeno, de este modo estas posiciones se incluyeron en las definiciones de HVR-L2, HVR-H2 y HVR-H3 para anticuerpos anti-beta7 humanizados descritos aquí.

[0323] Las variantes de injerto directo se generaron mediante mutagénesis de Kunkel (Kunkel et al. (1987) supra) utilizando un oligonucleótido separado para cada región hipervariable. Los clones correctos se valoraron mediante secuenciación de ADN.

#### *Aleatorización suave de las regiones hipervariables*

[0324] El proceso de "aleatorización suave" (véase la solicitud de Estados Unidos No. 60/545,840) se refiere a un procedimiento para la mutagénesis parcial de una secuencia proteica seleccionada, tal como una región hipervariable de un anticuerpo. El método mantiene una tendencia hacia la secuencia de región hipervariable de partida murina, de rata u otro, introduciendo una mutación de aproximadamente el 10-50 por ciento en cada posición seleccionada. Esta técnica incrementa la capacidad del cribado de biblioteca utilizado y evita un cambio en el epítipo de antígeno reconocido por el anticuerpo. Según esta técnica de aleatorización suave, se introduce diversidad de secuencia en cada región hipervariable utilizando una estrategia que mantiene una tendencia hacia la secuencia de la región hipervariable murina. Esto se llevó a cabo utilizando una estrategia de síntesis de oligonucleótidos envenenada descrita por primera vez por Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994). Sin embargo, existen otros métodos para mantener una tendencia hacia el residuo de la región hipervariable no humano, tales como PCR propenso a error, barajado de ADN, etc.

[0325] Según el método utilizado aquí, para una posición determinada en una región hipervariable a mutar, se envenena el codón que codifica el aminoácido de tipo salvaje con una mezcla (por ejemplo, una mezcla 70-10-10) de nucleótidos que dan lugar a un índice de mutación promedio de aproximadamente el 50% en cada posición de región hipervariable seleccionada. Para conseguir esto, el codón que codifica el aminoácido de la región hipervariable de tipo salvaje a mutar se sintetiza con un nivel bajo de mezcla contaminante de los otros tres nucleótidos, tales como una mezcla 70-10-10 de nucleótidos. De este modo, a modo de ejemplo, para la aleatorización suave de PRO (CCG), la primera posición sintetizada es una mezcla del 70% C, y 10% de cada uno de G, T y A; la segunda posición es una mezcla del 70% C, y 10% de cada uno de A, G, y T; y la tercera posición es una mezcla del 70% G, y un 10% de cada uno de A, C y T. Se entiende que la tendencia se puede ajustar hacia arriba o abajo dependiendo del codón a sintetizar en una posición determinada, el número de codones que codifican un aminoácido particular, y el grado en que la síntesis de oligonucleótidos se envenena por la composición de nucleótidos de la mezcla de síntesis.

[0326] Los oligonucleótidos aleatorizados de forma suave pueden formar un patrón después de las secuencias de la región hipervariable de partida murinas, de rata u otros y comprenden las mismas regiones definidas por los injertos directos en la región hipervariable. Opcionalmente, se pueden limitar dos posiciones, los aminoácidos en el inicio de H2 y H3 en el dominio de VH, en su diversidad: el codón RGC se puede utilizar para la posición 49 que codifica A, G, S o T y en la posición 94, se pueden utilizar el codón AKG que codifica M o R.

[0327] Generación de bibliotecas de fagos - Se fosforilaron por separado los grupos de oligonucleótidos aleatorizados diseñados para cada región hipervariable en seis reacciones de 20 µl que contenían 660 ng de oligonucleótido, Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1 mM, DTT 20 mM, y 5 U de polinucleótido quinasa durante 1 hora a 37°C. A continuación, se combinaron los seis grupos de oligonucleótidos fosforilados con 20 µg de plantilla Kunkel en Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM en un volumen final de 500 µl dando lugar a una proporción de oligonucleótido con respecto a la plantilla de 3. Se hibridó la mezcla a 90°C durante 4 min, 50°C durante 5 min y a continuación se enfrió en hielo. Se eliminó el oligonucleótido en exceso no hibridado con un kit de purificación PCR QIAQUICK™ (kit Qiagen 28106, Qiagen, Valencia, CA) utilizando un protocolo modificado para evitar la desnaturación excesiva del ADN hibridado. A los 500 µl de mezcla de hibridación, se añadieron 150 µl de tampón PB de Qiagen, y se dividió la mezcla entre 2 columnas de sílice. Después de un lavado de cada columna con 750 µl de tampón PE de Qiagen y una centrifugación extra para secar las columnas, se eluyó cada columna con 110 µl de

Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8. A continuación, se llenó la plantilla hibridada y purificada (220  $\mu$ l) mediante la adición de 1  $\mu$ l de ATP 100mM, 10  $\mu$ l de dNTPs 25mM (25 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 15  $\mu$ l de DTT 100 mM, 25  $\mu$ l de 10X tampón TM (Tris 0,5 M pH 7,5,  $MgCl_2$  0,1 M), 2400 U de T4 ligasa, y 30 U de T7 polimerasa durante 3 h a temperatura ambiente.

**[0328]** Se analizó el producto relleno en geles de agarosa/Tris-Acetato-EDTA (Sidhu et al., *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)). Normalmente fueron visibles tres bandas: la banda inferior es un producto correctamente relleno y ligado, la banda central es un producto relleno pero no ligado, y la banda superior es un producto de hebra desplazada. La banda superior es producida por una actividad secundaria intrínseca de T7 polimerasa y es difícil de evitar (Lechner et al., *J. Biol. Chem.* 258:11174-11184 (1983)); no obstante, esta banda transforma con una eficacia 30 veces menor que la banda inferior y normalmente contribuye poco a la biblioteca. La banda central es debida a la ausencia de un 5' fosfato para la reacción de unión final; esta banda transforma de manera eficiente y produce principalmente secuencia de tipo salvaje.

**[0329]** A continuación, se purificó el producto relleno y se electroporó en células SS320 y se propagó en presencia del fago auxiliar M13/KO7 tal y como describen Sidhu et al., *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000). Los tamaños de biblioteca variaban de  $1 - 2 \times 10^9$  clones independientes. Se secuenciaron clones aleatorios a partir de las bibliotecas iniciales para valorar la calidad de las bibliotecas.

**[0330]** *Selección de fagos* – Se expresó la integrina humana de longitud completa alfa4beta7 en células 293 (Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)), se purificó mediante cromatografía de afinidad a Fib504 y se utilizó como la diana para la selección de fagos. Para la inmovilización en placas de microtitulación MaxiSorp™ (Nalge Nunc, Rochester, NY), se cubrieron 100  $\mu$ l de integrina humana alfa4beta7 a 5  $\mu$ g/ml en NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,5m  $CaCl_2$  2 mM,  $MgCl_2$  2 mM y  $MnCl_2$  2 mM (TBSM), durante la noche a 4 grados C. Se bloquearon los pocillos durante 1 hora utilizando TBSM que contenía BSA al 1%. Para la primera ronda de selección, se utilizaron 8 pocillos recubiertos con la diana; se utilizó un único pocillo recubierto con la diana para las sucesivas rondas de selección. Se recogieron los fagos del sobrenadante del cultivo y se suspendió en TBSM que contenía BSA al 1% y TWEEN 20 al 0,05% (TBSMBT). Después de unirse a los pocillos durante 2 h, se extrajeron los fagos no unidos mediante un lavado intenso con TBS que contenía TWEEN 20 al 0,05 % (TBSM). Se eluyeron los fagos unidos mediante la incubación de los pocillos con HCl 100 mM durante 30 min. Se amplificaron los fagos utilizando células Top10 y fago auxiliar M13/KO7 y crecieron durante toda la noche a 37°C en 2YT, carbanacilina 50  $\mu$ g/ml. Se compararon los títulos de fago eluido de un pocillo recubierto de diana con los títulos de fago recuperado de un pocillo recubierto sin diana para valorar el enriquecimiento. Después de realizar cuatro rondas de selección, se seleccionaron clones aleatorios para un análisis de secuencia.

**[0331]** *Producción de Fab y determinación de la afinidad* - Para expresar la proteína Fab para mediciones de afinidad, se introdujo un codón de parada entre la cadena pesada y g3 en el vector de expresión del fagos. Se transformaron clones en células de E. coli 34B8 y crecieron en medios AP5 a 30°C (Presta et al. *Cancer Res.* 57: 4593-4599 (1997)). Se recogieron las células mediante centrifugación, se suspendieron en Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8 y se abrieron rompiéndolas utilizando un microfluidizador. Se purificó Fab con cromatografía de afinidad de Proteína G.

**[0332]** Las determinaciones por afinidad se realizaron mediante resonancia de plasmón de superficie utilizando BIAcore™-3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Se inmovilizaron variantes de Fab Fib504 humanizados en acetato 10 mM pH 4,5 (que variaba de 250 a 1500 unidades de respuesta (RU)) en un chip sensor CM5 y se inyectaron diluciones de dos veces de integrina humana alfa4beta7 (1,5 a 770 nM) en TBSM que contenía n-octilglucósido al 2%. Cada muestra se analizó con un tiempo de asociación de 5 minutos y tiempos de disociación de 5-60 minutos. Después de cada inyección, se regeneró el chip utilizando tres inyecciones de 1 minuto de urea 8M. Se corrigió la respuesta de unión mediante la resta del RU de una celda de flujo como blanco. Se utilizó un modelo 1:1 de Languir de ajuste simultáneo de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  para análisis cinéticos.

### Resultados y Discusión

**[0333]** *Humanización de Fib504 de rata* – El armazón aceptor humano utilizado para la humanización se basa en el armazón utilizado para HERCEPTIN® y consiste en el dominio de VL de kappa I (huKI) humano de consenso y una variante del dominio de VH consenso del subgrupo III (humIII) humano. Este dominio de VH variante tiene 3 cambios del consenso humano: R71A, N73T y L78A. Los dominios de VL y VH de Fib504 de rata se alinearon cada uno con los dominios de kappa I y subgrupo III humanas; cada región hipervariable (HVR) se identificó y se injertó en el armazón aceptor humano para generar un injerto en HVR (injerto 504) que se podría expresar como un Fab en fago (figuras 1A y 1B)

**[0334]** En base al análisis de estructuras cristalinas disponibles del complejo de anticuerpo y antígeno, MacCallum et al. (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) propusieron definiciones de HVR en base a los residuos de dominios variables que frecuentemente contactan con los antígenos. De este modo, se incluyeron 49G y 94M de la cadena pesada en el injerto en HVR de Fib504 (figura 1B). Además, también se generó un segundo injerto en HVR, injerto Fib504K, que incluía la posición 49K de la cadena ligera, porque esta posición está también en la definición

de contacto de HVR-L2 y puede servir como un contacto con el antígeno (Figura 1A). Cuando los injertos Fib504 o Fib504K se expresaron en fagos y se analizó la unión a alfa4beta7 inmovilizada, no se observó unión.

5 [0335] Se generaron bibliotecas utilizando los injertos en HVR Fib504 y Fib504-K en que cada una de las regiones HVR se aleatorizaron simultáneamente de forma suave. Cada biblioteca de injertos de HVR se cribó frente a alfa4beta7 inmovilizado durante 4 rondas de selección. No se observó enriquecimiento y los clones recogidos para el análisis de secuencia de ADN mostraron únicamente cambios aleatorios de secuencia dirigidos a las 6 regiones de HVR.

10 [0336] Se investigaron dos secuencias de armazón de VH "RL" y "RF" como armazones aceptores y contenían cambios en las posiciones 71 y 78. La posición 71 se cambió a una Arginina como en el consenso del subgrupo III humano, y la posición 78 se cambió a una Leucina como en el consenso del subgrupo III humano (armazón aceptor "RL") o una Fenilalanina como en el consenso del subgrupo II humano y el armazón de VH de Fib504 de rata (armazón aceptor "RF") (figura 10A). Cuando el armazón aceptor con los injertos Fib504 o Fib504K en el "RL" (Fib504-RL y Fib504K-RL) o "RF" (Fib504-RF y Fib504K-RF) se expresaban en el fago y se analizaba la unión a alfa4beta7 inmovilizada, sólo se observó una unión específica a fago para el injerto Fib504K utilizando el armazón "RF" (Figura 10B). La unión más modesta del fago que expresa el injerto Fib504-RF en relación a otros injertos que carecen de Y49K (cadena ligera) y L78F (cadena pesada) indica la importancia de estas posiciones en la selección de un armazón aceptor útil.

20 [0337] Se generaron bibliotecas como antes utilizando una estrategia de aleatorización suave simultáneamente a cada una de las 6 HVR para los injertos Fib504K-RL y Fib504K-RF y se organizaron en alfa4beta7 inmovilizada durante 4 rondas de selección tal como se ha descrito anteriormente. Sólo se observó enriquecimiento para la biblioteca basada en el injerto Fib504K-RF. Se seleccionaron clones de la ronda 4 de la biblioteca de Fib504KRF para el análisis de secuencia y se revelaron cambios de aminoácidos dirigidos a HVR-L1. La mayoría de los clones contenían el cambio Y32L; además la posición 31 cambió frecuentemente a D, S, P o N (Figura 1C). Además del injerto de partida, Fib504K-RF, se expresaron 3 clones y se purificaron como proteína Fab y se analizaron posteriormente mediante Biacore tal como se ha descrito anteriormente. Los clones hu504-5, hu504-16 y hu504-32 (variantes de SEC ID NO:1 que contenían las sustituciones T31S más Y32L (variante hu504.5), Y32L (variante hu504.16), o T31D más Y32L (variante hu504.32); véase la figura 1C), mostraron una unión excelente a alfa4beta7 en relación con el injerto Fib504K-RF y cumplían o superaban la afinidad del Fab Fib504 quimérico para la unión a alfa4beta7. Los resultados del análisis Biacore se muestran en la Tabla 3, a continuación, e indican que la variación seleccionada en las HVR y/o regiones armazón, descritas aquí generó anticuerpos antagonistas a alfa4beta7 que tenía una afinidad mejorada en relación con el anticuerpo de partida. Los resultados en la Tabla 3 indican que la variante humanizada 504.32 mostraba el mayor incremento en la afinidad en relación con el anticuerpo de rata de partida al unirse 3 veces más fuertemente a alfa4beta7.

Tabla 3

Fab (análisis BIACore™)	Afinidad a Alfa4beta7 (nM)
Fib504	11
Variante 504.5	9
Variante 504.16	23
Variante 504.32	3

40 [0338] Los resultados en la Tabla 3 también indican que el rediseño de HVR-L1 era importante para la recuperación de la unión a antígeno con afinidad elevada. En particular, la mutación Y32L era la más frecuente entre los diversos clones. Otros cambios en la posición 31 y otras numerosas sustituciones a lo largo de HVR-H1 parecen estar bien tolerados y pueden proporcionar una mejora adicional. A partir de estos resultados, está claro que existen múltiples cambios en la secuencia que pueden mejorar la afinidad de Fib504 injertado en un armazón humano para generar afinidades que cumple o superan la del anticuerpo inicial de rata.

50 [0339] De este modo, partiendo del injerto de las 6 HVR de Fib504 de rata en el armazón aceptor humano, la expansión de HVRL2 para incluir la posición 49 (lisina), la expansión de HVR-H2 para incluir la posición 49 (glicina) y la expansión de HVR-94 para incluir la posición 94 (metionina), así como los cambios de aminoácidos en la posición 32 de VHR-L1 (donde L o I sustituyen a Y) y, opcionalmente, en la posición 31 de la VHR-L1 (donde T se sustituye por D o S, por ejemplo). Los cambios de aminoácidos en el armazón útiles se realizaron en las posiciones 71 (A71R) y 78 (L78F) en el dominio de VH. Dichos cambios de aminoácidos condujeron a un anticuerpo totalmente humano, variante hu504.32, por ejemplo, con una mejora de 3 veces de la afinidad de unión para la integrina alfa4beta7. Además, los anticuerpos humanizados seleccionados descritos aquí se han determinado para tener por lo menos una actividad biológica comparable al anticuerpo Fib504 de rata de origen (véase el ejemplo 3 en el presente documento).

Ejemplo 2: Variantes humanizadas adicionales de HVR de Fib504

[0340] Las secuencias de aminoácidos de HVR de la variante humanizada Fib504.32 se modificaron posteriormente para generar variantes adicionales capaces de antagonizar la actividad la subunidad de la integrina beta7 y/o integrinas que contienen la subunidad beta7.

[0341] *Generación de una biblioteca de rastreo amplio de aminoácidos* – Se generó una biblioteca para el rastreo de posiciones de HVR seleccionadas para otros residuos de aminoácidos capaces de generar variantes de unión a beta7 de la variante hu504.32 utilizando 3 oligonucleótidos: 504-L1, diseñado para aleatorizar de forma suave una parte de la HVR-L1 con una tendencia hacia la secuencia de HVR-L1 hu504.32 (es decir, la secuencia ASESVDDLLH (SEC ID NO:47, para las posiciones relativas A2-A11) se aleatorizó de forma suave tal como se ha descrito anteriormente); y 504-N96 de HVR-L3 y 504-M94 de HVR-H3 que introducen NNS en las posiciones de HVR-L3, en la posición 96 en la cadena ligera y la posición 94 de HVR-H3 en la cadena pesada, permitiendo de este modo los 20 aminoácidos en estas posiciones. Con estos tres oligonucleótidos, se generó la amplia biblioteca de rastreo de aminoácidos descrito anteriormente utilizando una plantilla que contenía tres codones de parada en la cadena ligera (posiciones 31 y 32 en HVR-L1 y la posición 96 en HVR-L3) y 1 codón de parada en la cadena pesada (posición 94 en HVR-H3). **Rastreo amplio de aminoácidos de hu504-32** – Para explorar más en profundidad las secuencias preferidas permitidas en HVR-L1 y para aumentar la estabilidad de 504-32, se diseñó una biblioteca de fagos en que a) se aleatorizaba de forma suave la HVRL1 de 504-32 en la región donde se observaron cambios (es decir, ASESVDDLLH (SEC ID NO:47, para las posiciones relativas A2-A11) durante la humanización (figura 1C), y b) permitía todos los posibles aminoácidos en N96 en HVR-L3 y M94 en HVR-H3. Después de las 4 rondas de selección frente a la integrina humana de longitud completa alfa4beta7 inmovilizada descrita anteriormente, se seleccionaron 96 clones aleatorios para el análisis de secuencia. La frecuencia a la que se hallaron los aminoácidos en cada posición en la biblioteca de rastreo amplio de aminoácidos sugiere que la secuencia de HVR-L1 presente en hu504-32 y la metionina en la posición 94 en la cadena pesada son óptimas para la unión con afinidad elevada (figura 12). Los aminoácidos más preferidos obtenidos mediante las selecciones partiendo de la variante 504.32 (Figura 12) se muestran en amarillo. En cambio, aunque la asparagina está presente en la posición 96 en la cadena ligera de hu504-32, la frecuencia elevada de leucina observada en esta posición en el rastreo amplio de aminoácidos sugiere que la mutación N96L podría mejorar adicionalmente la afinidad de las variantes de Fib504 humanizadas para alfa4beta7y también eliminar cualquier problema de desamidación en esta posición. La información en la figura 12 también sugiere que es probable que se toleren un conjunto de aminoácidos de sustitución sin una pérdida sustancial en la afinidad. Por ejemplo, para eliminar la oxidación de M94 en HVR-H3, se podría sustituir probablemente la glutamina o arginina.

[0342] *Generación de bibliotecas de rastreo limitado de aminoácidos* – Seis bibliotecas para un rastreo limitado de aminoácido utilizó seis plantillas de Kuntel diferentes, conteniendo cada una un codón de parada localizado en una de las seis HVR. Cada biblioteca se generó utilizando un único oligonucleótido que codificaba una única HVR y utilizando los codones indicados en la figura 11A (columna de "codones") para alterar los residuos de aminoácidos para el posterior análisis para la unión a beta7 o alfa4beta7. Se utilizan los mismos procedimientos para alterar residuos de aminoácidos de los anticuerpos anti-beta7 y analizarlos para la unión a integrinas alfaEbeta7.

[0343] **Rastreo limitado de aminoácidos de hu504-32** – El rastreo limitado de aminoácidos de hu504-16 se diseñó para hacer la hu504-16 más parecida a la secuencia consenso de cadena ligera y pesada humana y en el proceso identificar los elementos de la secuencia de Fib504 de rata que son necesarios para la unión. Se generaron seis bibliotecas y se dirigieron a cada una de las HVR en las posiciones que diferían entre la hu504-16 y las cadenas pesadas de la cadena ligera kappa I o subgrupo III de consenso humano (figuras 1A y 1B); se permitió aminoácido de rata o humano en estas posiciones en la biblioteca (Figura 11A). A efectos de satisfacer la codificación para ambos aminoácidos durante la síntesis de oligonucleótidos y la mutagénesis, también se introdujeron aminoácidos adicionales en algunos casos (véase los aminoácidos codificados, figura 11A). Se seleccionaron las bibliotecas de rastreo limitado de aminoácidos frente a integrina humana de longitud completa alfa4beta7 tal como se ha descrito anteriormente y se secuenciaron aproximadamente 32 clones aleatorios de cada biblioteca después de la ronda 3. La frecuencia de cada aminoácido hallado en cada posición se muestra en las figuras 11B y 11C.

[0344] Como el rastreo amplio de aminoácidos, el rastreo limitado de aminoácidos también proporciona información sobre qué cambios son tolerados en muchas posiciones en Fib504 humanizado. A diferencia del rastreo amplio de aminoácidos, sin embargo, la diversidad permitida en cada posición aleatorizada en el rastreo limitado de aminoácidos se limitó a un par de aminoácidos. De este modo, la falta de cualquier sustitución observada en una posición determinada no indica que un residuo particular no se pueda cambiar ni una frecuencia elevada de cualquier aminoácido particular en una posición determinada indica necesariamente que es la mejor solución para una afinidad elevada.

[0345] En algunas posiciones (posiciones 27, 29, 30, 53, 54 de la cadena ligera y 50, 54, 58, 60, 61, y 65 de la cadena pesada), se selecciona el aminoácidos de consenso humano de forma bastante frecuente sugiriendo que una retromutación al consenso humano no alteraría bruscamente la unión a alfa4beta7 humana. De hecho, en la posición 54 de la cadena ligera (en HVR-L2), el aminoácido de consenso humano se selecciona de manera más frecuente que el aminoácidos de Fib504 de rata, indicadno que este cambio realizado a 504-32 proporciona un

anticuerpo de unión a beta útil.

[0346] Además, como resultado del diseño de la biblioteca, los aminoácidos que no derivan de consenso humano o Fib504 de rata se selecciona más frecuentemente en algunas posiciones y proporcionan potenciales sustituciones para mejorar la afinidad de variantes humanizadas de Fib504. Éstas incluyen, sin limitación, D30A y I55V en la cadena ligera y Y50F en la cadena pesada. Los resultados de estas 2 bibliotecas indican que muchas posiciones de HVR toleran otras sustituciones de aminoácidos y aún mantienen la actividad biológica comparable.

[0347] En las figuras 13 y 15 se muestran resúmenes de los cambios de aminoácidos observados. La figura 15 resume los diversos aminoácidos útiles en cada una de las posiciones en las CDR de las variantes de anticuerpo de la invención en las posiciones numeradas según la numeración de Kabat o un sistema de numeración relativa. Cada uno de los anticuerpos adicionales comprendidos por las variantes representadas en las figuras 13 y 15 es una realización de la invención.

### Ejemplo 3: Ensayos de adhesión celular

[0348] Se analizó la capacidad de algunas de las variantes humanizadas de Fib504 de la invención de unirse a ligandos expresados en una superficie celular mediante ensayos de adhesión celular. La unión a alfa4beta7 y otra integrina beta7, alfaEbeta7, se analizó mediante la capacidad de las variantes humanizadas de alterar la unión de la integrina a su receptor natural. La unión de las variantes humanizadas de Fib504 a la subunidad beta7 sola expresada en una superficie celular se analizó de forma similar. Los procedimientos y los resultados se describen a continuación. **Producción de IgG** – Se expresaron de forma transitoria las variantes humanizadas de IgG Fib504 en células 293 (Graham et al. (1977) supra) utilizando un vector separado para las cadenas ligera y pesada. Los vectores se construyeron mediante la subclonación de los dominios variables de cadena ligera o pesada en vectores de expresión adecuados para cada una de las cadenas ligera y pesada. Se filtró el sobrenadante de 1,1 L de cultivo celular de CHO de una variante humanizada de Fib504 a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se aplicó a una nueva columna HiTrap Protein A HP de 1 mL (Amersham/Pharmacia) equilibrada en tampón A (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM). Se aplicaron las muestras a 0,8 mL/min, durante la noche, 4 grados C. A continuación, se lavó cada columna y se equilibró con 30 mL de tampón A. La elución de anticuerpo se llevó a cabo mediante cromatografía a temperatura ambiente en un FPLC (Amersham/Pharmacia) utilizando un gradiente lineal de 14 min a 1 mL/min de 0 a 100% de tampón B (100 mM Glicina, pH 3,0). Las fracciones de 1 mL resultante se neutralizaron inmediatamente mediante la adición de 75  $\mu\text{L}$  de Tris 1 M, pH 8. La proteína eluida se detectó mediante absorción a 280 nm y se agruparon las fracciones en los máximos y se desalaron en PBS en columnas adaptables desechables Sephadex G-25 PD10 (Amersham/Pharmacia). La proteína se detectó mediante DO280 y se agruparon las fracciones de los máximos. El anticuerpo en PBS se filtró a través de 0,22  $\mu\text{m}$  y se almacenó a 4 grados C. Se utilizó el análisis de aminoácidos para cuantificar las concentraciones de estos anticuerpos purificados y se asignaron los valores del promedio de dos determinaciones separadas.

### Marcaje con BCECF:

[0349] En cada uno de los ensayos presentados en este Ejemplo 3, las células se marcaron según el siguiente procedimiento. Todas las células utilizadas en los ensayos de adhesión se marcaron con 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-( $\gamma$ -6)-carboxifluoresceína, éster de acetoximetilo (BCECF) a 10  $\mu\text{M}$  en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% para células RPMI8866 y células 38C13 transfectadas con la subunidad beta7 (células beta7 38C13) y en una mezcla F-12:DMEM (50:50) que contenía FBS al 10% para células 293 transfectadas con alfaEbeta7 (células 293 con alfaEbeta7). Las células se marcaron durante 30 minutos y se lavaron dos veces con medio de ensayo. La densidad celular se ajustó a  $3 \times 10^6$  células por ml para células RPMI8866 y 38C13beta7 y  $2,2 \times 10^6$  células por ml para células 293 con alfaEbeta7.

### Variantes de Fib504 humanizado alteran la unión de alfa4beta7 a MAdCAM

[0350] Adhesión celular RPMI8866/MAdCAM-1-Ig: las células RPMI8866 expresan alfa4beta7 en su superficie (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY). Se pusieron en contacto variantes de Fib504 humanizado (variantes hu504) con una mezcla de células RPMI8866 y MAdCAM fusionado a IgG recubierta en un soporte sólido. Se midieron las concentraciones de variante de Fib504 humanizado que dan lugar a una inhibición del 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) de la unión de las células RPMI8866 a MAdCAM-1 mediante el recubrimiento de placas Nunc Maxisorp™ de 96 pocillos con 2  $\mu\text{g/ml}$  en PBS, 100  $\mu\text{l/pocillo}$  de MAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc., en el que Ig se refiere a la fusión de MAdCAM-1 a una región de Fc) durante toda la noche a 4°C. Tras bloquear las placas con 200  $\mu\text{l/pocillo}$  de BSA 5 mg/ml durante una hora a temperatura ambiente, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de variantes de Fib504 humanizado en medios de ensayo (medios RPMI 1640 m, Hyclone®, Logan Utah, Estados Unidos, suplementados con BSA 5 mg/mL) a cada pocillo y se añadieron 150.000 células marcadas con BCECF (BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR) en 50  $\mu\text{l}$  de medios de ensayo a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Se lavaron los pocillos dos veces con 150  $\mu\text{l}$  de medios de ensayo para extraer las células sin unir. Se solubilizaron las células unidas con 100  $\mu\text{l}$  de SDS al 0,1% en Tris/HCl 50 mM pH 7,5. Se midió la cantidad de fluorescencia liberada de las células lisadas mediante SPECTRAmax GEMINT™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a longitudes de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 530 nm. Se analizaron los valores de fluorescencia como una función de las concentraciones de



las variantes de Fib504 humanizado añadidas en cada ensayo, utilizando un ajuste por mínimos cuadrados no lineal de cuatro parámetros, para obtener los valores de IC<sub>50</sub> de cada variante de Fib504 humanizado en el ensayo. Se estimaron los valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> del ajuste de cuatro parámetros. La figura 14 es un representación de ejemplo de los resultados. A continuación en la Tabla 4 se muestran los valores de IC<sub>90</sub> e IC<sub>50</sub> para cada una de las variantes analizadas.

5

Tabla 4 Unión de anticuerpo a MAdCAM-1 humano

Anticuerpos analizados: Fib504 y variantes hu504	IC <sub>50</sub> (nM) Exp 1/Exp 2*	IC <sub>90</sub> (nM) Exp 1/Exp 2*
Fib504 de rata	0,098/0,197	0,483/0,703
Variante hu504.5	0,067/0,248	0,361/0,880
Variante hu504.16	0,0768/0,206	0,244/0,551
Variante hu504.32	0,036/0,119	0,150/0,396
6B11 (control no bloqueante)	>100	>100

\*Exp 1/Exp 2 se refiere a los resultados de ensayos repetidos.

Alteración de la variante de Fib504 humanizado de la unión de alfa4beta7 con VCAM

10

**[0351]** Adhesión celular de RPMI8866/7dVCAM-1: El ensayo de RPMI8866/7dVCAM- es de formato similar al RPMI8866/MAd-CAM-1-Ig excepto que se utilizó 7VCAM-1 (ADP5, R&D Systems, Minneapolis, MN) a 2 µg/ml para cubrir las placas. Se analizaron los resultados tal y como se describe anteriormente para los experimentos de unión a MAdCAM. A continuación en la Tabla 5 se muestran los valores de IC<sub>50</sub> para cada una de las variantes analizadas.

15

Tabla 5 Unión de anticuerpo a VCAM humano

Anticuerpos analizados: Fib504 y variantes hu504	IC <sub>50</sub> (nM) Exp 1/Exp 2*	IC <sub>90</sub> (nM) Exp 1/Exp 2*
Fib504 de rata	0,107/0,193	0,396/0,580
Variante hu504.5	0,088/0,270	0,396/0,726
Variante hu504.16	0,098/0,223	0,261/0,774
Variante hu504.32	0,059/0,110	0,183/0,337
6B11 (control no bloqueante)	>100	>100

\*Exp 1/Exp 2 se refiere a los resultados de ensayos repetidos.

Alteración de la variante de Fib504 humanizado de la unión de alfaEbeta7 a E-cadherina humana

20

**[0352]** Adhesión celular de AlfaEbeta7 293/huE-Cadherina: se transfectaron células 293 (Graham et al. (1977) supra) con alfaE y beta7 (Genentech, Inc.). El formato de ensayo es similar al ensayo de RPMI8866/MAd-CAM-1-Ig excepto que se utilizó huE-Cadherina (648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN) a 2 µg/ml para cubrir las placas. A continuación se bloquearon las placas con BSA 5 mg/ml tal y como se menciona anteriormente y se añadieron 50 µl de variantes de FIB504 en medios de ensayo (F-12:DMEM (50:50) complementado con BSA 5 mg/ml) a cada pocillo y se añadieron 110.000 células marcadas BCECF en 50 µl de medios de ensayo a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Se lavaron los pocillos dos veces con 150 µl de medios de ensayo y se midió la cantidad de fluorescencia liberada por las células lisadas y se analizó tal y como se describe anteriormente. En la Tabla 6 se muestran los resultados del ensayo de tres experimentos.

25

30

Tabla 6 Unión de anticuerpo a cadherina humana

Anticuerpos analizados: Fib504 y variantes hu504	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
Fib504 de rata	2,047/7,89/4,19	8,80/24,5/9,95
Variante hu504.5	2,132/10,18/4,77	7,99/28,7/10,19
Variante hu504.16	1,957/10,05/4,58	7,03/33,7/13,51
Variante hu504.32	1,814/6,99/3,47	8,8/24,5/11,73
HP2/1 (anti-alfa4, control)	>100/>100/>100	>100/>100/>100

Alteración de la variante de Fib504 humanizado de la unión de beta7 a MAdCAM

35

**[0353]** Ensayo de adhesión celular de 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig: El ensayo de 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig fue de formato similar al de RPMI8866/MAdCAM-1-Ig excepto que se utilizó muMAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc.) a 2 µg/ml para cubrir las placas. Se transfectaron las células de linfoma murino 38C13 alfa4+ (Crowe, D.T. et al., J. Biol. Chem. 269:14411-14418 (1994)) con ADN que codificaba integrina beta7 de manera que se expresó alfa4beta7 en la superficie celular. Se realizó como antes la capacidad de las variantes de los anticuerpos de alterar la interacción entre el alfa4beta7 asociado a membrana celular y MAdCAM. En la tabla 7 se muestran los resultados del ensayo. (Se muestran los valores de IC<sub>50</sub> y IC<sub>90</sub> para dos experimentos).

40

Tabla 7 Actividad de anticuerpos de variante hu504 en la unión de células que expresan 38C13-beta7 a MAdCAM murino

Anticuerpos analizados: Fib504 y variantes hu504	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
Fib504 de rata	0,682/0,306	2,869/1,51
Variante hu504.5	0,8587/0,466	2,322/2,61
Variante hu504.16	0,998/0,610	3,717/4,08
Variante hu504.32	0,718/0,458	4,08/1,51

Alteración de la variante de Fib504 humanizado de la unión de beta7 a VCAM murino

5 **[0354]** Ensayo de adhesión celular de 38C13beta7/muVCAM-1-Ig: Se realizó el ensayo de 38C13beta7/muVCAM-1-Ig según el ensayo de unión celular de MAdCAM-1-Ig/RPMI8866 murino anterior, excepto que se utilizó muVCAM-1-Ig (Genentech, Inc.) a 2 µg/ml para cubrir las placas. En la Tabla 8 se muestran los resultados del ensayo. (Se muestran los valores de IC50 y IC90 para dos experimentos).

10 Tabla 8 Actividad de anticuerpos de variante hu504 en la unión de células que expresan 38C13-beta7 a VCAM-1-Ig murino

Anticuerpos analizados: Fib504 y variantes hu504	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
Fib504 de rata	0,845/0,447	2,903/2,30
Variante hu504.5	0,763/0,407	3,074/2,30
Variante hu504.16	0,835/0,584	2,857/1,84
Variante hu504.32	0,562/0,330	2,004/1,84

15 **[0355]** Los resultados de los estudios de la unión de variantes de Fib504 humanizado demuestran que el anticuerpo humanizado de la invención se une a su subunidad de integrina beta7 diana, además de las integrinas alfa4beta y alfaEbeta7, con aproximadamente la afinidad del anticuerpo de rata inicial y, en algunas realizaciones, con mayor afinidad. De este modo, un anticuerpo anti-beta7 humanizado según la invención tiene usos en terapias de integrina anti-beta7, particularmente terapias humanas.

20 Actividad relativa de variantes de hu504.32 de la invención

**[0356]** Se analizaron diferentes variantes de aminoácidos del anticuerpo hu504.32 en ensayos de adhesión celular humana y de ratón por su capacidad de inhibir la unión del receptor que contiene beta7 con su ligando según los procedimientos de ensayo de adhesión descritos en la presente invención. Se realizó el ensayo de RPMI8866/MAdCAM-1-Fc tal y como se describe anteriormente en la presente invención. Se modificó el ensayo de alfaEbeta7-293/E-cadherina hu mediante el uso como ligando de E-cadherina-Fc humana (Ecadherina-Fc humana, 648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN). También se examinó la capacidad relativa de las variantes de hu504.32 de inhibir la interacción de la fibronectina humana (huFN40) con el receptor de alfa4beta7 en células PRMI8866. El ensayo de RPMI8866/Fibronectina hu (huFN40) utilizado para estos estudios fue similar en formato al ensayo de RPMI8866/MAdCAM-1-Ig descrito en la presente invención excepto que se utilizó el fragmento alfa-quimiotriptico de fibronectina humana de 40 kDa (F1903, Chemicon International, Temecula, CA) a 2 µg/ml para cubrir las placas.

**[0357]** Se examinó la capacidad de las variantes de hu504.32 de inhibir la interacción de receptores que contenían beta7 murina con MAdCAM-1 murino o VCAM-1 murino. Se inhibieron MAdCAM-1-Fc murino y VCAM-1-Fc murino en su interacción con células alfa4+ de linfoma murino que expresan beta7 murina (células 38C13beta7) por las variantes hu504.32. Se realizaron los ensayos de adhesión celular de MAdCAM-1-Fc y VCAM-1-Fc murinos de modo similar a aquellos descritos en la presente invención para VCAM y MAdCAM humanos. Cuando se fusionaron los ligandos a las regiones Fc, se bloquearon los receptores de Fc en las células con 0,5 µg de anticuerpo anti-CD16/32 (anticuerpo de receptor anti-Fcγ III/II, catálogo N° 553142, BD Biosciences, San Jose, CA) por 1 millón de células durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 150.000 células marcadas en 50 µl de medio de ensayo a cada pocillo y se incubaron durante 13 minutos a 37°C. Se lavaron los pocillos y se midió la cantidad de fluorescencia liberada de las células lisadas tal y como se describe en la presente invención anteriormente. El anticuerpo de control para los ensayos de adhesión celular humana fue el anticuerpo monoclonal de ratón para albúmina sérica humana, 6B11 (Catálogo n° ab10244, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). El anticuerpo de control para los ensayos de adhesión celular murino fue el anticuerpo de integrina beta7 anti-ratón de rata, M293 (BD Biosciences, San Jose, CA), que no compete con el ligando o con Fib504 por unirse a la integrina beta7.

50 **[0358]** En las Tablas 9 y 10 se proporcionan los resultados de los ensayos por triplicado para los ensayos de adhesión celular de humano y de murino, respectivamente.

Tabla 9 Actividad de anticuerpos de variante hu504.32 en ensayos de adhesión celular humana

Variante de anticuerpo	IC50 Promedio $\pm$ SD			
	RPMI8866/ huMAdCAM-1-Fc	RPMI8866/ hu7dVCAM-1	$\alpha$ E $\beta$ 7-293/ huE- Cadherina- Fc	RPMI8866/ huFN40
hu504.32	0,088 $\pm$ 0,035	0,101 $\pm$ 0,021	3,970 $\pm$ 1,664	0,100 $\pm$ 0,046
hu504.32M94Q	0,090 $\pm$ 0,045	0,111 $\pm$ 0,035	4,130 $\pm$ 1,212	0,124 $\pm$ 0,056
hu504.32M94R	0,075 $\pm$ 0,034	0,089 $\pm$ 0,009	3,963 $\pm$ 1,776	0,119 $\pm$ 0,056
Control (6B11)	>100	>100	>100	>100

Tabla 10 Actividad de anticuerpos de variante hu504.32 en ensayos de adhesión celular murina

5

Variante de anticuerpo	IC50 Promedio $\pm$ SD	
	38C13beta7/ muMAdCAM-1-Fc	38C13beta7/ mu7dVCAM-1-Fc
hu504.32	0,270 $\pm$ 0,041	0,228 $\pm$ 0,065
hu504.32M94Q	0,370 $\pm$ 0,102	0,264 $\pm$ 0,083
hu504.32M94R	0,391 $\pm$ 0,112	0,228 $\pm$ 0,081
Control (M293)	>100	>100

10

**[0359]** El anticuerpo hu504.32 tiene una metionina en la posición 94 de la CDR3 de cadena pesada. Las variantes M94Q (o hu504.32Q) y M94R (o hu504.32R) tienen glutamina o arginina, respectivamente, en la posición 94 de la variante de anticuerpo hu504.32. Los anticuerpos hu504.32M, Q, y R redujeron substancialmente la interacción ligando-receptor de la integrina beta7 en cada uno de los ensayos y son, de este modo, potentes inhibidores de la adhesión celular mediada por beta7.

**[0360]** Actividad *in vivo* del anticuerpo hu504.32R

15

**[0361]** Se analizó *in vivo* la variante de anticuerpo hu504.32R por su capacidad de reducir la interacción ligando-receptor de la integrina beta7 y de reducir el reclutamiento de linfocitos para el colon inflamado en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal de murino *in vivo*. Se obtuvieron los ratones BALB/c y los ratones CB 17 SCID de Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, MA, USA). Se prepararon ratones colíticos SCID reconstituidos con células T CD4+CD45Rb alto mediante el aislamiento de células T CD4+CD45Rb alto de ratones BALB/c donantes y la transferencia intravenosa de  $3 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l de PBS. Los ratones SCID de control no recibieron las células T CD4+CD45Rb alto. Los ratones CD4+ reconstituidos que cumplieron los criterios de inscripción al grupo de tratamiento de pérdida del 10% del peso basal o del 15% del peso máximo en la semana 4 se consideraron que habían inducido la enfermedad inflamatoria intestinal y se seleccionaron para el tratamiento.

20

25

**[0362]** En el día del tratamiento con anticuerpos de prueba, se recogieron las células de nódulo linfático mesentérico (MLN) de ratones BALB/c y se radiomarcaron con Cr<sup>51</sup>. El tratamiento incluyó la administración previa del anticuerpo anti-GP120, el anticuerpo hu504.32 antibeta7, el anticuerpo hu504.32R anti-beta7, o sin anticuerpo (control) intravenosamente, 200  $\mu$ g/100  $\mu$ l PBS. Treinta minutos después de la administración del anticuerpo, se inyectaron células MLN marcadas con Cr<sup>51</sup>,  $4 \times 10^6$  células/100  $\mu$ l. Una hora después de la inyección de las células marcadas, se sacrificaron los ratones y se recogieron el bazo, el colon y las placas de Peyer, se pesaron y se determinó la radioactividad de Cr<sup>51</sup> total por órgano. La Figura 16 es un gráfico de barras de los resultados de estos análisis que demuestran la capacidad relativa de los anticuerpos de bloquear el quimiotactismo de las células T radiomarcadas al colon de los ratones que sufren enfermedad inflamatoria intestinal. Se inhibió el quimiotactismo de las células T al colon inflamado por los anticuerpos antibeta7 hu504.32 y hu504.32R en relación con el control negativo, el anticuerpo anti-GP120. La distribución al bazo fue similar para todos los anticuerpos. De este modo, los anticuerpos anti-beta7 hu504.32 y hu504.32R inhiben de forma efectiva el quimiotactismo de las células T al colon inflamado *in vivo*.

30

35

40

**[0363]** La glicación del anticuerpo no afecta a la capacidad de la variante hu504.32R de bloquear la unión de MAdCAM-1 al receptor de alfa4beta7.

45

**[0364]** La glicación, la glicosilación no enzimática de proteínas, puede afectar a las interacciones anticuerpo-ligando (ver, por ejemplo, Kennedy, D.M. et al., Clin Exp Immunol. 98(2):245-51 (1994). Se observó la glicación de la lisina en la posición 49, la glicación en 504.32R de la lisina en la posición 49 de la cadena ligera de la variante hu504.32R (posición B1 relativa de HVR-L2), pero no afectó significativamente en la capacidad de la variante de anticuerpo de bloquear la unión de MAdCAM-1 a células RPMI8866 que expresaban el receptor de alfa4beta7. Se realizó la determinación de la glicación y de los niveles de glicación utilizando espectroscopia de masas con ionización por electrospray estándar (ESI-MS) y mediante cromatografía de afinidad de boronato. Se encuentran procedimientos de HPLC de afinidad de boronato útiles para analizar la glicación en, por ejemplo, Quan C.P. et al., Analytical Chemistry 71(20):4445-4454 (1999) y Li Y.C. et al., J. Chromatography A, 909:137-145 (2001). Se realizó el ensayo de

50

adhesión celular según el ensayo de adhesión celular de RPMI8866/MAdCAM-1-Fc descrito en la presente invención.

5 [0365] En realizaciones alternativas de la invención, se redujo o se eliminó la glicación en la posición 49 cuando la posición 49 comprende un aminoácido diferente de lisina. El polipéptido o anticuerpo de la invención comprende como aminoácido en la posición 49 (posición B1 relativa de HVR-L2) cualquiera de los aminoácidos A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y, en los que cada letra se refiere a un aminoácido de acuerdo con la designación de aminoácido estándar de una sola letra. Alternativamente, se selecciona la posición 49 del aminoácido de la cadena ligera de una variante 504.32R (u otra variante 504) del grupo que consiste en R, N, V, A, F, Q, H, P, I, o L. Se selecciona un aminoácido útil en la posición 49, por ejemplo, mediante la expresión (preparando una biblioteca de fago de) Fab de hu504.32R en fago (variante) y substituyendo de forma separada, en el codón de la posición 49, un codón para cada uno de los 20 aminoácidos naturales. Se analizaron los fagos que expresaban las variantes hu504.32R alteradas en la posición 49 por su unión a la integrina beta7 y/o a un receptor que comprende la integrina beta7, tal como los receptores de alfa4beta7 o alfaEbeta7. Se criban adicionalmente esas variantes que se unen a la integrina beta7 o los receptores de alfa4beta7 o alfaEbeta7 por su capacidad de inhibir la unión del ligando-receptor de la integrina beta7 y la eficacia *in vivo* tal y como se describe en la presente invención. De modo alternativo, pueden sustituirse los aminoácidos naturales o no naturales en la posición 49 mediante técnicas de mutagénesis estándar y analizarse en la adhesión celular y los ensayos *in vivo* descritos en la presente invención. De modo alternativo, el aminoácido en la posición 49 de la cadena ligera es un aminoácido diferente a la lisina (K), y se alteran aminoácidos en cualquier otra posición de HVR o de armazón o posiciones en la cadena ligera y/o la cadena pesada para seleccionar un polipéptido de unión a anti-beta7 variante o anticuerpo que exhibe afinidad de unión, actividad biológica *in vitro* o *in vivo*, farmacocinética, depuración de fármaco e inmunogenicidad útiles para la reducción de la inflamación mediante la reducción de la actividad biológica de integrina beta7. Se realizan la mutagénesis y la selección de dicha variante de polipéptido o anticuerpo tal y como se describe en la presente invención y según otras técnicas estándar. Dicho polipéptido o anticuerpo de unión anti-beta7 variante muestra afinidad de unión a integrina beta7 de 10.000 veces, 1.000 veces, alternativamente de 100 veces, alternativamente de 10 veces, alternativamente de 5 veces, alternativamente de 2 veces la afinidad de unión mostrada por cualquiera de las variantes de Fib504 humanizado descritas en la presente invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo anti-beta7 humanizado que comprende:

5 una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende RASESVDDLLH (SEC ID NO:9), KYASQSIG (SEC ID NO:2), QQGNSLPNT (SEC ID NO:3), GFFITNNYWG (SEC ID NO: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEC ID NO:5), y ARTGSSGYFDF (SEC ID NO:64).

2. Anticuerpo anti-beta7 humanizado que comprende:

10 una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende RASESVDDLLH (SEC ID NO:9), KYASQSIG (SEC ID NO:2), QQGNSLPNT (SEC ID NO:3), GFFITNNYWG (SEC ID NO: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEC ID NO:5), y MTGSSGYFDF (SEC ID NO:6).

3. Anticuerpo anti-beta7 humanizado que comprende:

15 una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende RASESVDDLLH (SEC ID NO:9), KYASQSIG (SEC ID NO:2), QQGNSLPNT (SEC ID NO:3), GFFITNNYWG (SEC ID NO: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEC ID NO:5), y AMTGSSGYFDF (SEC ID NO:63).

4. Anticuerpo anti-beta7 humanizado que comprende:

20 una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende RASESVDDLLH (SEC ID NO:9), KYASQSIG (SEC ID NO:2), QQGNSLPNT (SEC ID NO:3), GFFITNNYWG (SEC ID NO: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEC ID NO:5), y RTGSSGYFDF (SEC ID NO:66).

5. Anticuerpo anti-beta7 hhumanizado que comprende:

30 una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende RASEVDSLH (SEC ID NO:7), SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, y SEC ID NO:64.

6. Anticuerpo anti-beta7 humanizado que comprende:

35 una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende RASEVDSLH (SEC ID NO:7), SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, y SEC ID NO:6.

7. Anticuerpo anti-beta7 humanizado que comprende:

40 una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende RASEVDTLH (SEC ID NO:8), SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, y SEC ID NO:64.

8. Anticuerpo anti-beta7 humanizado que comprende:

45 una HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 and HVR-H3, en la que cada una, en orden, comprende RASEVDTLH (SEC ID NO:8), SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, y SEC ID NO:6.

9. Anticuerpo anti-beta7 humanizado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-beta7 comprende una o más secuencias de armazón humanas y/o de consenso humana en su dominio variable de cadena pesada y/o ligera.

50 10. Anticuerpo anti-beta7 humanizado según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo anti-beta7 comprende por lo menos una parte o toda la secuencia consenso del armazón del subgrupo I k humano.

55 11. Anticuerpo anti-beta7 humanizado según la reivindicación 9, en el que el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-beta7 comprende una secuencia consenso de armazón del subgrupo III humano.

60 12. Anticuerpo anti-beta7 humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el aminoácido en la posición 71 del armazón de cadena pesada se selecciona del grupo de R, A, y T, y/o el aminoácido en la posición 73 del armazón de cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en N y T, y/o el aminoácido en la posición 78 de la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en F, A, y L.

65 13. Anticuerpo anti-beta7 humanizado según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo anti-beta7 comprende una variante de la secuencia consenso del armazón de cadena pasada del subgrupo III que comprende una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73, 78 y/o 94.

14. Anticuerpo anti-beta7 humanizado según la reivindicación 13, en el que la sustitución es R71A, N73T, L78A y/o

R94M.

- 5 15. Anticuerpo anti-beta7 humanizado, o fragmento de unión a beta7 del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la afinidad monovalente del anticuerpo o el fragmento de unión a beta7 humana es sustancialmente la misma o superior que la afinidad monovalente de un anticuerpo que comprende las secuencias variables de la cadena ligera y cadena pesada tal como se representan en la SEC ID NO:10 de la figura 1A y/o la SEC ID NO:11 de la figura 1B, o la SEC ID NO:12 de la figura 9A y/o la SEC ID NO:13 de la figura 9B.
- 10 16. Anticuerpo humanizado o fragmento de unión del mismo según la reivindicación 15, en el que la afinidad es por lo menos 2 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 100 veces, por lo menos 500 veces, por lo menos 1000 veces, por lo menos 5000 veces, o por lo menos 10.000 veces mayor que un anticuerpo que comprende las secuencias de cadena ligera y cadena pesada tal como se representan en la SEC ID NO:10 de la figura 1A y la SEC ID NO:11 de la figura 1B, o la SEC ID NO:12 de la figura 9A y la SEC ID NO:13 de la figura 9B.
- 15 17. Anticuerpo humanizado o fragmento de unión según la reivindicación 16, en el que la afinidad monovalente del anticuerpo a la beta7 humana es por lo menos 3 veces superior a la afinidad monovalente de un anticuerpo que comprende las secuencias de cadena ligera y cadena pesada representadas en la SEC ID NO:10 de la figura 1A y la SEC ID NO:11 de la figura 1B, o la SEC ID NO:12 de la figura 9A y la SEC ID NO:13 de la figura 9B.
- 20 18. Anticuerpo humanizado o fragmento de unión según la reivindicación 15 ó 16, en el que el anticuerpo que comprende las secuencias de cadena ligera y cadena pesada representadas en la SEC ID NO:10 de la figura 1A y la SEC ID NO:11 de la figura 1B, o la SEC ID NO:12 de la figura 9A y la SEC ID NO:13 de la figura 9B, es producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el Número de Acceso ATCC de la American Type Culture Collection con la designación HB-293.
- 25 19. Anticuerpo humanizado o fragmento de unión según la reivindicación 15, en el que la afinidad de unión se expresa como un valor Kd.
- 30 20. Anticuerpo humanizado o fragmento de unión según la reivindicación 15, en el que la afinidad de unión se mide mediante Biacore™ o un radioinmunoensayo.
- 35 21. Anticuerpo anti-beta7 humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que la afinidad monovalente del anticuerpo a la beta7 humana es sustancialmente la misma o superior a la afinidad monovalente a beta7 humana de un anticuerpo que comprende las secuencias variables de la cadena ligera y cadena pesada tal como se representan en la SEC ID NO:10 de la figura 1A y/o la SEC ID NO:11 de la figura 1B, o la SEC ID NO:12 de la figura 9A y/o la SEC ID NO:13 de la figura 9B.
- 40 22. Método de inhibición de la interacción de una subunidad de integrina beta7 humana con una segunda subunidad de integrina y/o un ligando *in vitro*, mediante el contacto del anticuerpo anti-beta7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 con la integrina beta7.
- 45 23. Método según la reivindicación 22, en el que la segunda subunidad de integrina es la subunidad de integrina alfa4, y en el que el ligando es MAdCAM, VCAM o fibronectina.
- 50 24. Método según la reivindicación 23, en el que la subunidad de integrina alfa4 es de humano.
- 55 25. Método según la reivindicación 24, en la que el ligando es de humano.
- 60 26. Método según la reivindicación 25, en el que la segunda subunidad de integrina es la subunidad de integrina alfaE y en el que el ligando es E-cadherina.
- 65 27. Método según la reivindicación 26, en el que la subunidad de integrina alfaE es de humano.
28. Método según la reivindicación 27, en el que el ligando es de humano.
29. Anticuerpo anti-beta7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para utilizar en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad.
30. Anticuerpo anti-beta7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para utilizar en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del hígado, inflamación del SNC, pancreatitis crónica, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjorgen, psoriasis e inflamación de la piel, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, alergia, enfermedad autoinmune, rechazo de transplante, rechazo de injerto renal, enfermedad de injerto frente a huésped, diabetes o cáncer.

- 5 31. Utilización de un anticuerpo anti-beta7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del hígado, inflamación del SNC, pancreatitis crónica, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjorgen, psoriasis e inflamación de la piel, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, alergia, enfermedad autoinmune, rechazo de trasplante, rechazo de injerto renal, enfermedad de injerto frente a huésped, diabetes o cáncer.
- 10 32. Anticuerpo anti-beta7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para utilizar en un método de inhibición de la interacción de una subunidad de integrina beta7 humana con una segunda subunidad de integrina y/o un ligando mediante el contacto con la integrina beta7, en el que la inhibición reduce o alivia los síntomas de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en inflamación, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes, inflamación resultante del trasplante de órganos, trastorno de injerto frente a huésped, e inflamación asociada con trastornos de aloinjertos.
- 15 33. Utilización de un anticuerpo anti-beta7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para la preparación de un medicamento para utilizar en un método de inhibición de la interacción de una subunidad de integrina beta7 humana con una segunda subunidad de integrina y/o un ligando mediante el contacto con la integrina beta7, en el que la inhibición reduce o alivia los síntomas de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en inflamación, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes, inflamación resultante del trasplante de órganos, trastorno de injerto frente a huésped, e inflamación asociada con trastornos de aloinjertos.
- 20 34. Utilización de una composición que comprende un anticuerpo anti-beta7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un portador farmacéutico para la preparación de un medicamento para utilizar en un método de modulación de la adhesión y/o reclutamiento celular mediada por la integrina beta7 en un mamífero que padece un trastorno; en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en inflamación, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes, inflamación resultante del trasplante de órganos, trastorno de injerto frente a huésped, e inflamación asociada con trastornos de aloinjertos.
- 25 35. Utilización según la reivindicación 34, en la que el mamífero es un ser humano.
- 30 36. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 34 ó 35, en la que la composición comprende además un segundo agente biofarmacéutico o agente quimioterapéutico.
- 35 37. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en la que la modulación inhibe la interacción de la integrina beta7 con la integrina alfa4, integrina alfaE, MADCam, VCAM, E-cadherina, y/o fibronectina.
- 40 38. Composición que comprende un anticuerpo anti-beta7 humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 39. Composición que comprende un anticuerpo anti-beta7 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un portador farmacéutico para utilizar en un método de modulación de la adhesión y/o reclutamiento celular mediada por la integrina beta7 en un mamífero que padece un trastorno; en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en inflamación, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes, inflamación resultante del trasplante de órganos, trastorno de injerto frente a huésped, e inflamación asociada con trastornos de aloinjertos.
- 50 40. Composición según la reivindicación 39, en la que el mamífero es un ser humano.
41. Composición según la reivindicación 39, en la que la composición comprende además un segundo agente biofarmacéutico o agente quimioterapéutico.
42. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 39-41, en la que la modulación inhibe la interacción de la integrina beta7 con la integrina alfa4, integrina alfaE, MADCam, VCAM, E-cadherina, y/o fibronectina.





Kabat # 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42

hum III  
 Fib504  
 injerto 504K

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G  
 E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L F C S V T G F I T N N Y W C W I R R K F P G  
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F I T N N Y W C W V V R Q A P G

HVR1

Kabat # 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 a

hum III  
 Fib504  
 injerto 504K  
 hu504-5  
 hu504-16  
 hu504-32

K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R R D N S K N T L Y L Q M N  
 N K M E W M G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S R R D T S K N Q F F L Q L N  
 K G L E W V G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S R F T I S R R D N S K N T L Y L Q M N  
 F F F

HVR2

Kabat # b c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 a k 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

hum III  
 Fib504  
 injerto 504K

S L R A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO.: 24)  
 S V T E D T A T Y Y C A M T G S S G Y F D F W G P G T M V T V S S (SEQ ID NO.: 11)  
 S L R A E D T A V Y Y C A M T G S S G Y F D F W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO.: 26)

HVR3

FIG. 1B

Variantes humanizados de **Fib504**

Sustituciones HVR-L1 y L2 Armazón Fib504-K RF		Ensayo de Afinidad BIAcore (nM)
<b>504K-RF</b>	<b>L1</b> R A S E S V D T Y L H	<b>11</b>
Residuos	<b>L2</b> K Y A S Q S I S	
Variante		
<u>68</u>	R A S E S V D D T I L H	
74	R A S E S V D D L V L H	
<b>504-32</b>	R A S E S V D D L L L H	3.5
51	R A S E S V D D N L L H	
59	R A S E S V D D P L L H	
<b>504-5</b>	R A S E S V D D S L L H	9
60	R (S) S E S V D D S L V H	
96	R A S E (D) V D D T L L H	
83	R A S E (N) V D D T L L H	
<b>504-16 (8)</b>	R A S E S V D D T L L H	23.4
<b>504-RF (29)</b>	R A S E S V D D T Y L H	132

**FIG. 1C**

Consenso humano

cadena ligera ( $\kappa$  I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQISNYLAWYQOKPGKAPKLLIYAASSLES  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYNSLPWTFGQGTKVEIKRTVAA  
PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYSLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 27)

## FIG. 2A

Consenso humano

| Cadena pesada (subgrupo III)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGG  
STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYFDFWGQGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT  
HTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 28)

## FIG. 2B

Injerto Fib504

cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIYYASQIS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA  
PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYSLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 29)

## FIG. 3A

Injerto Fib504

| Cadena pesada |

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKGLEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSRTTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYFDFWGQGT  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 30)

## FIG. 3B

InjertoFib504K

| Cadena ligera|

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIKYASOSIS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA  
PSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

# FIG. 4A

InjertoFib504K

| Cadena pesada|

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSRTTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYDFWVGQTL  
VTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 30)

# FIG. 4B

Injerto Fib504K-RF

| Cadena ligera|

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIKYASOSIS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA  
PSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

# FIG. 5A

Injerto Fib504K-RF

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSRTTISRDTSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYDFWVGQTL  
VTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 32)

# FIG. 5B

Variante humanizada **504.32**

Cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDDLHWYQOKPGKAPKLLIKYASQIS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNPFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)

## FIG. 6A

Variante humanizada **504.32**

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKGLEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSRTISRDTSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYFDWQGT  
LTVSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 32)

## FIG. 6B

| Dominios variables de Fib504 anti-ratón de rata

Cadena ligera variable

DVVMTQSPATLSVTPGERISLSCRASESVDTYLHWYQOKPNESPRLLIKYASQIS  
GIPSRFSGSGSGTDFTLSINGVELEDLSIYYCQOQNSLPNTFGAGTKLELKRADAA  
PTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDVSDQDS  
KDSTYS (SEQ ID NO: 12)

## FIG. 9A

Dominios variables de Fib504 anti-ratón de rata ;

Cadena pesada variable

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGFFITNNYWGWRKFPNGKMEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQLNSTVEDTATYYCAMTGSSGYFDWGP  
GTMVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLV (SEQ ID NO: 13)

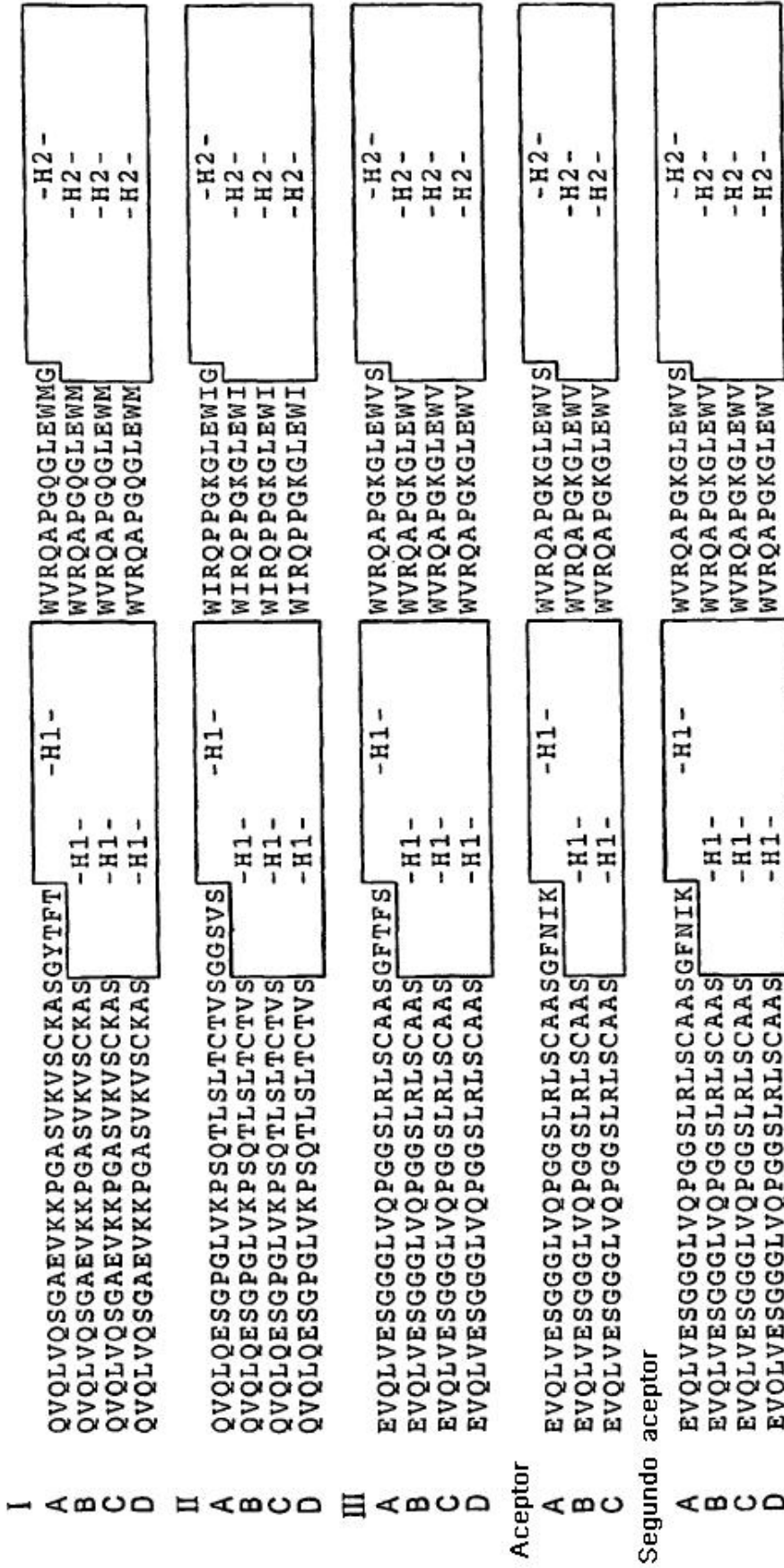
## FIG. 9B

kv1 Z DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP  
 kv1 X DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP  
 kv2 DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA  
 kv3 EIVLTQSPGTLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLRLEP  
 kv4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

**FIG. 7A**

kv1 Z EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 14  
 kv1 X EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 15  
 kv2 EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 16  
 kv3 EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 17  
 kv4 EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 18

**FIG. 7B**



**FIG. 8A**

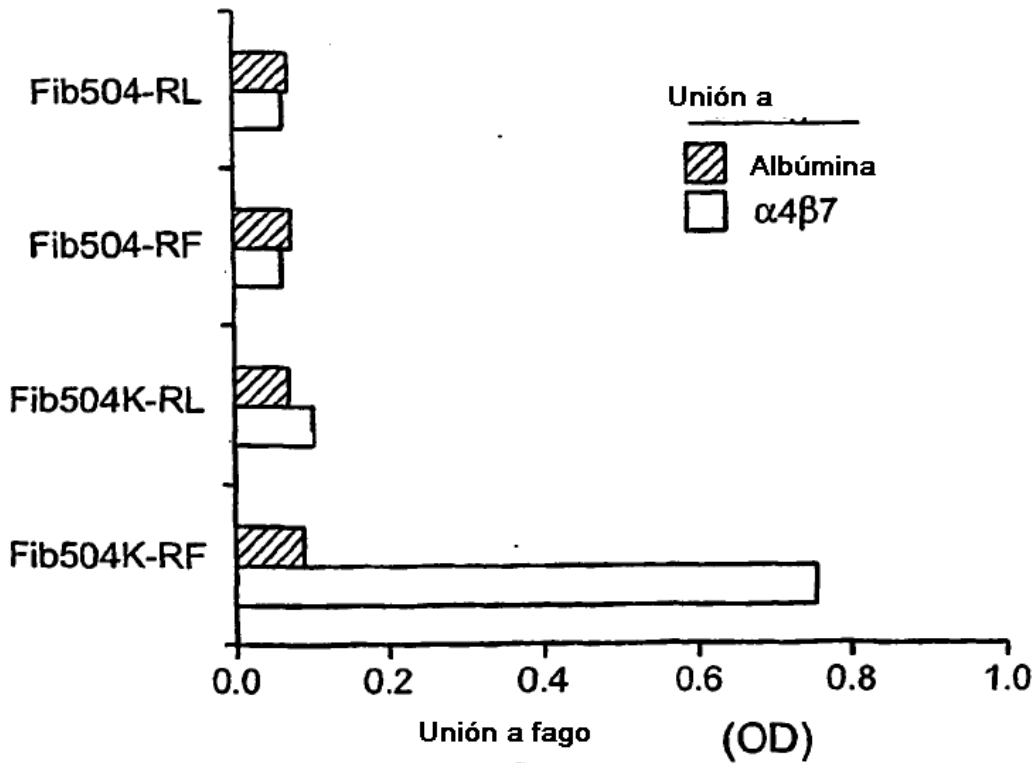




Comparación de secuencias de armazón de VH

	Región armazón H3							
	71	72	73	74	75	76	77	78
hu : subgrupo I	A	D	T	S	T	S	T	A
hu : subgrupo II	V	D	T	S	K	N	Q	F
hu : subgrupo III	R	D	N	S	K	N	T	L
Herceptin	A	D	T	S	K	N	T	A
Fib504	R	D	T	S	K	N	Q	F
Fib504-RL	R	D	T	S	K	N	T	L
Fib404-RF	R	D	T	S	K	N	T	F

**FIG. 10A**



**FIG. 10B**

**FIG. 11A**

FIG. 11A-1 FIG. 11A-2

**FIG. 11A-1**

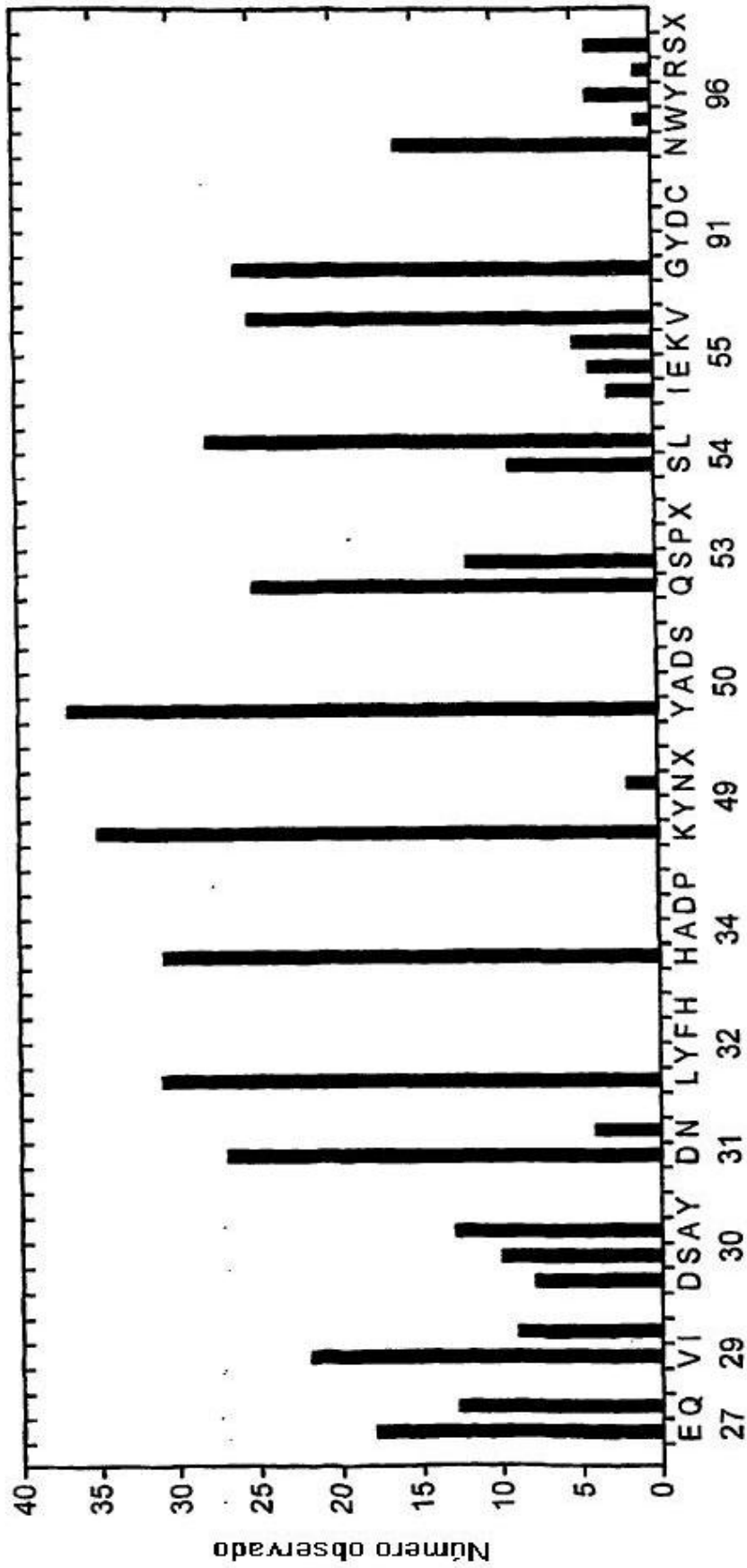
504.16		Humano	Codon	Aminoácidos	Aminoácidos ;					
		Consenso		Codificados		Observados				
HVR-L1		R	R							
	<u>25</u>	A	A							
		S	S							
	<u>27</u>	E	Q	SAA	EQ	E	Q			
		S	S							
	<u>29</u>	V	I	RTT	VI	V	I			
		D	S	KMT	DSAY	D	S	A		
	<u>31</u>	T	N	RAC	DN	D	N			
	L	Y	YWC	LYFH	L					
<u>33</u>	L	L								
	H	A	SMC	HADP	H					
HVR-L2	<u>49</u>	K	Y	WAW	KYNZ	K	N			
		Y	A	KMC	YADS	Y				
	<u>51</u>	A	A							
		S	S							
	<u>53</u>	Q	S	YMG	QSPZ	Q	S			
		S	L	TYG	SL	S	L			
	<u>55</u>	I	E	RWA	IEKV	I	E	K	V	
	S	S								
HVR-L3	<u>89</u>	Q	Q							
		Q	Q							
	<u>91</u>	G	Y	KRT	GYDC	G				
		N	N							
	<u>93</u>	S	S							
		L	L							
	<u>95</u>	P	P							
	N	W	WRS	NWYRSZ	N	W	Y	R	S	
<u>97</u>	T	T								

NOTA: Z es un codón de parada. El aminoácido observado más frecuentemente está encuadrado

504.16		Humano	Codon	Aminoácidos	Aminoácidos					
		Consenso		Codificados		Observados				
HVR-H1	<u>26</u>	G	G							
		F	F							
	<u>28</u>	F	T	WYC	FITS	F				
		I	F	WTC	IF	I				
	<u>30</u>	T	S	ASC	TS	T				
		N	S	ARC	NS	N				
	<u>32</u>	N	Y	WAC	NY	N				
		Y	A	KMT	YADS	Y				
<u>34</u>	W	M	WKG	WMRL	W					
	G	S	RGC	GS	G					
HVR-H2	<u>49</u>	G	S	RGC	GS	G				
		Y	V	KWT	YVDF	Y	V	D	F	
	<u>51</u>	I	I							
		S	S							
	<u>53</u>	Y	G	KRT	YGCD	Y				
		S	G	RGC	SG	S	G			
	<u>55</u>	G	G							
		S	S							
	<u>57</u>	T	T							
		S	Y	TMT	SY	S	Y			
	<u>59</u>	Y	Y							
		N	A	RMC	NADT	N	A	D	T	
	<u>61</u>	P	D	SMT	PDAH	P	D	A	H	
		S	S							
<u>63</u>	L	V	STG	LV	L	V				
	K	K								
<u>65</u>	S	G	RGC	SG	S	G				
HVR-H3	<u>93</u>	A	A							
		M	R	AKG	MR	M				
	<u>95</u>	T	G	RSC	TGAS	T				
		G								
	<u>97</u>	S								
		S								
	<u>99</u>	G								
		Y								
	F	F								
<u>101</u>	D	D								
	F	Y	TWC	FY	F	Y				

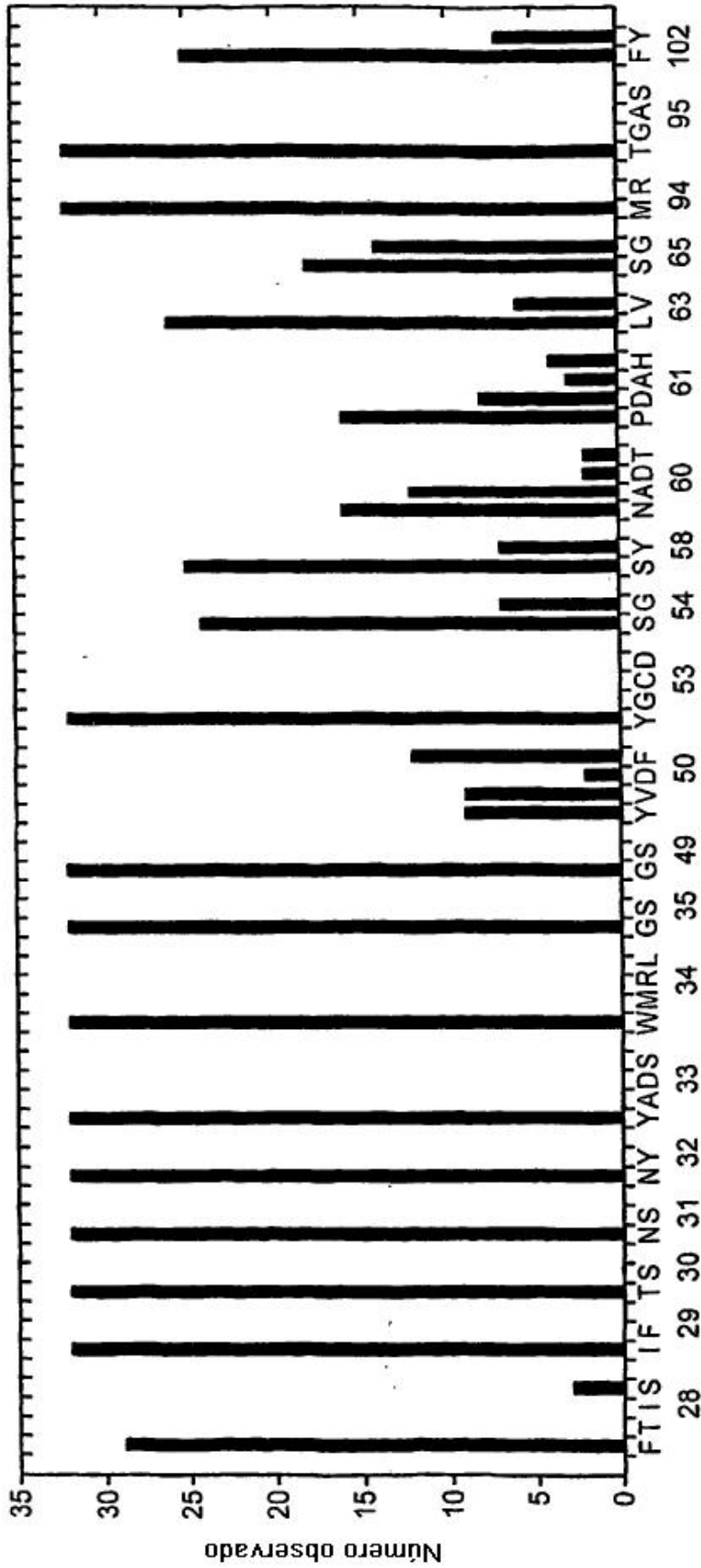
**FIG. 11A-2**

Rastreo limitado de aminoácidos - HVR de cadena ligera



**FIG. 11B**

Rastreo limitado de aminoácidos - HVR de cadena pesada



**FIG. 11C**

Posición del aminoácido	Aminoácido													
	Número de veces observado													
HVR-L1	A25	$\frac{A}{64}$	$\frac{G}{2}$	$\frac{S}{11}$	$\frac{T}{7}$	$\frac{Y}{9}$								
	S26	$\frac{G}{4}$	$\frac{I}{2}$	$\frac{K}{3}$	$\frac{N}{8}$	$\frac{P}{1}$	$\frac{Q}{1}$	$\frac{R}{7}$	$\frac{S}{61}$	$\frac{T}{6}$				
	E27	$\frac{A}{6}$	$\frac{D}{8}$	$\frac{E}{60}$	$\frac{G}{2}$	$\frac{H}{1}$	$\frac{I}{1}$	$\frac{K}{4}$	$\frac{L}{1}$	$\frac{N}{2}$	$\frac{Q}{5}$	$\frac{R}{1}$	$\frac{V}{2}$	
	S28	$\frac{A}{1}$	$\frac{D}{1}$	$\frac{G}{7}$	$\frac{H}{1}$	$\frac{I}{1}$	$\frac{K}{1}$	$\frac{N}{9}$	$\frac{P}{3}$	$\frac{R}{7}$	$\frac{S}{56}$	$\frac{T}{4}$	$\frac{V}{1}$	$\frac{Y}{1}$
	V29	$\frac{A}{11}$	$\frac{G}{6}$	$\frac{I}{3}$	$\frac{K}{1}$	$\frac{L}{9}$	$\frac{M}{6}$	$\frac{Q}{1}$	$\frac{R}{1}$	$\frac{V}{55}$				
	D30	$\frac{A}{3}$	$\frac{D}{59}$	$\frac{E}{9}$	$\frac{G}{3}$	$\frac{H}{3}$	$\frac{I}{1}$	$\frac{K}{1}$	$\frac{L}{1}$	$\frac{N}{6}$	$\frac{P}{1}$	$\frac{S}{1}$	$\frac{T}{2}$	$\frac{V}{3}$
	D31	$\frac{D}{77}$	$\frac{E}{13}$	$\frac{G}{2}$	$\frac{N}{1}$									
	L32	$\frac{I}{1}$	$\frac{L}{88}$	$\frac{M}{4}$										
	L33	$\frac{A}{1}$	$\frac{I}{5}$	$\frac{L}{64}$	$\frac{M}{1}$	$\frac{V}{22}$								
	H34	$\frac{F}{1}$	$\frac{H}{87}$	$\frac{Y}{4}$	$\frac{S}{1}$									
HVR-L3	N96	$\frac{A}{2}$	$\frac{F}{6}$	$\frac{H}{1}$	$\frac{I}{3}$	$\frac{L}{47}$	$\frac{M}{3}$	$\frac{N}{2}$	$\frac{R}{2}$	$\frac{S}{2}$	$\frac{T}{4}$	$\frac{V}{2}$	$\frac{W}{16}$	$\frac{Y}{3}$
HVR-H3	M94	$\frac{A}{1}$	$\frac{E}{3}$	$\frac{G}{1}$	$\frac{M}{48}$	$\frac{Q}{10}$	$\frac{R}{24}$	$\frac{S}{8}$						

NOTA: El aminoácido observado más frecuentemente está encuadrado

FIG. 12

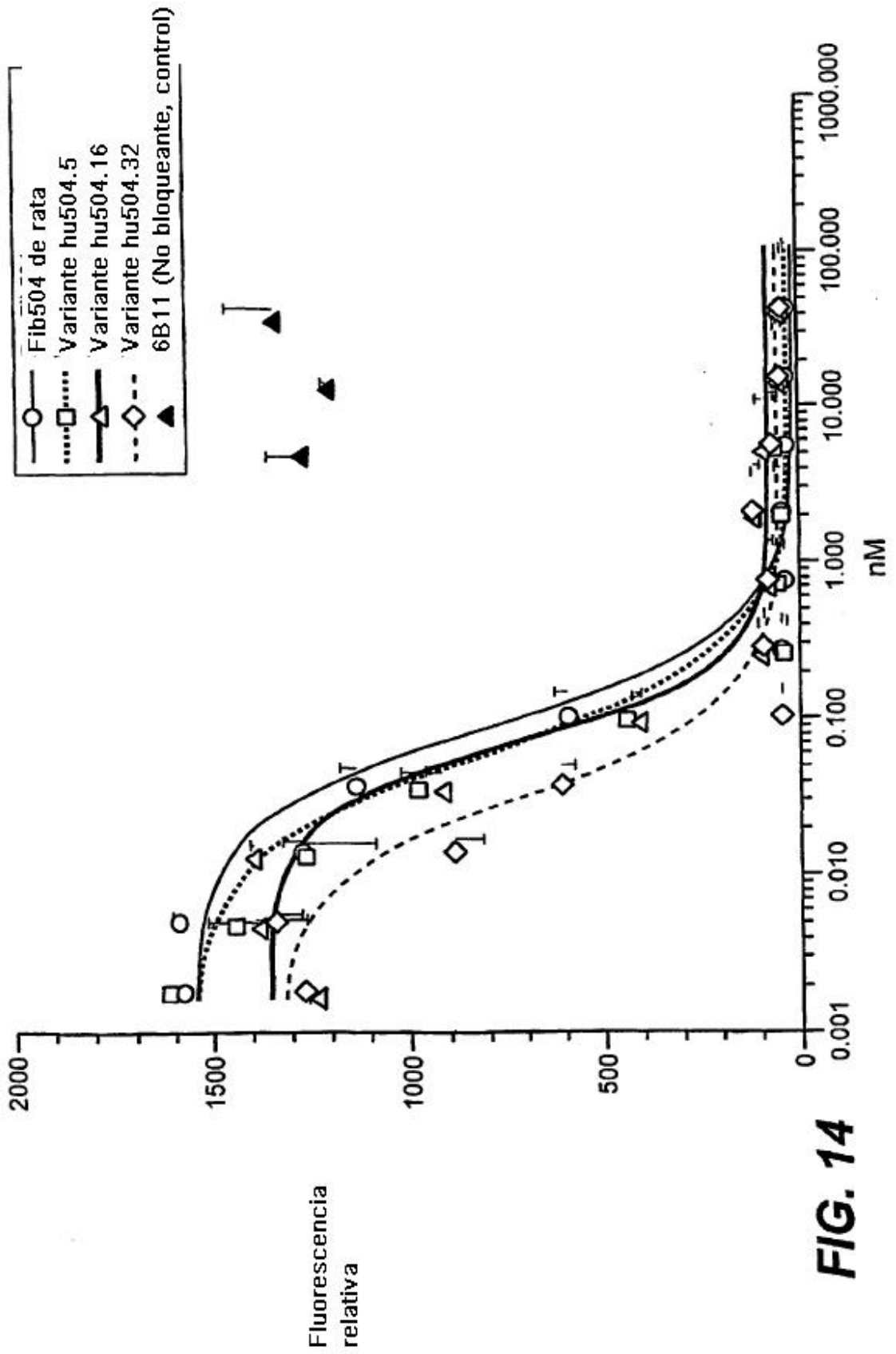


	Todos los cambios observados Fib504 de rata	Consenso humano	Todos los aminoácidos observados	Rastreo limitado	Rastreo amplio de aminoácidos observados
CDR-H1	<u>26</u>	G	G		
	<u>28</u>	F	F		
	<u>30</u>	I	F	F	F
	<u>32</u>	N	S	I	I
	<u>34</u>	Y	S	T	T
	W	A	N	N	
	G	M	Y	Y	
		S	W	W	
		S	G	G	
CDR-H2	<u>49</u>	G	S	G	G
	<u>51</u>	Y	V	DFVY	Y V D F
	<u>53</u>	I	I		
	<u>55</u>	S	S	Y	Y
	<u>57</u>	S	G	GS	S G
	<u>59</u>	T	G		
	<u>61</u>	S	S	SY	S Y
	<u>63</u>	Y	T		
	<u>65</u>	N	Y	ADNT	N A D T
		P	A	ADHP	P D A H
	S	D			
	L	S	LV	L V	
	K	V	GS	S G	
	S	K			
CDR-H3	<u>93</u>	A	A		A E G M Q R S
	<u>95</u>	M	R	AEGMQRS	M
	<u>97</u>	T	G	T	T
	<u>99</u>	G			
	#	S			
	G				
	Y	F	FY	F Y	
	F	D			
	D	Y			

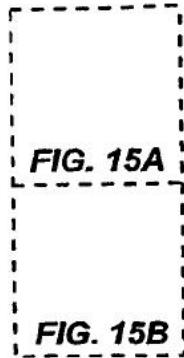
FIG. 13B



Actividad de variantes de Fib504 en células RPMI8866  
Unión a MADCAM-1-Ig humana



**FIG. 15**

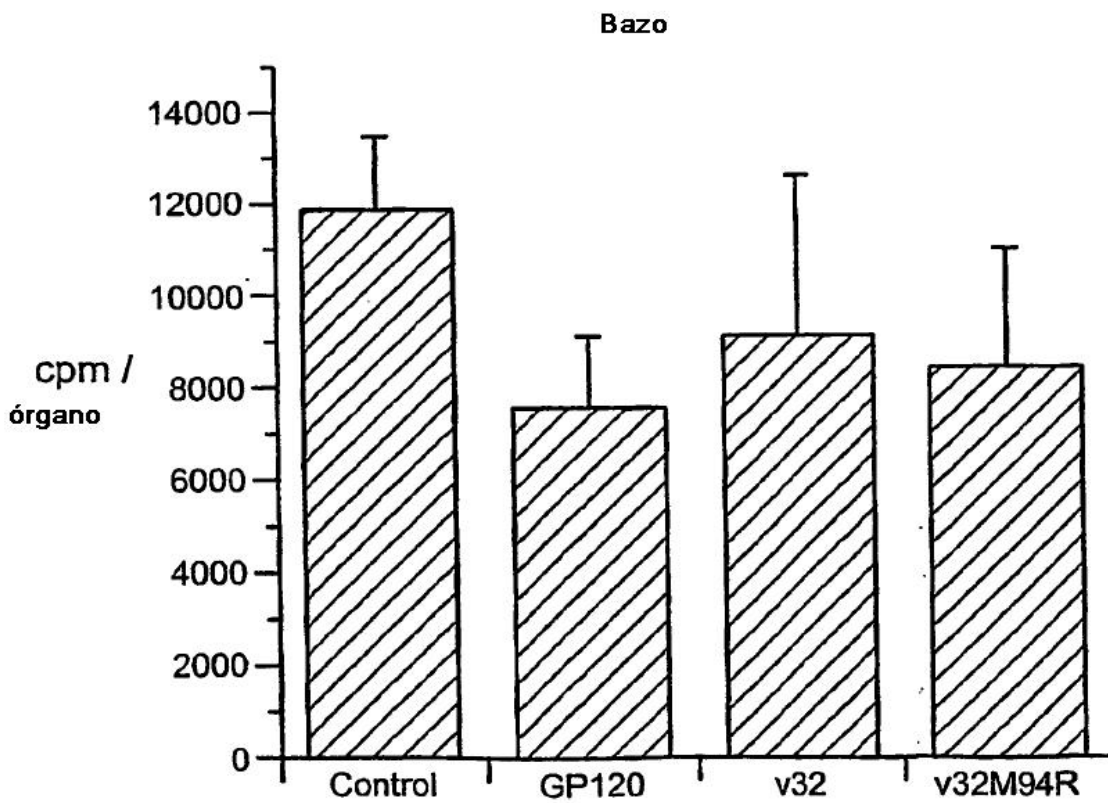
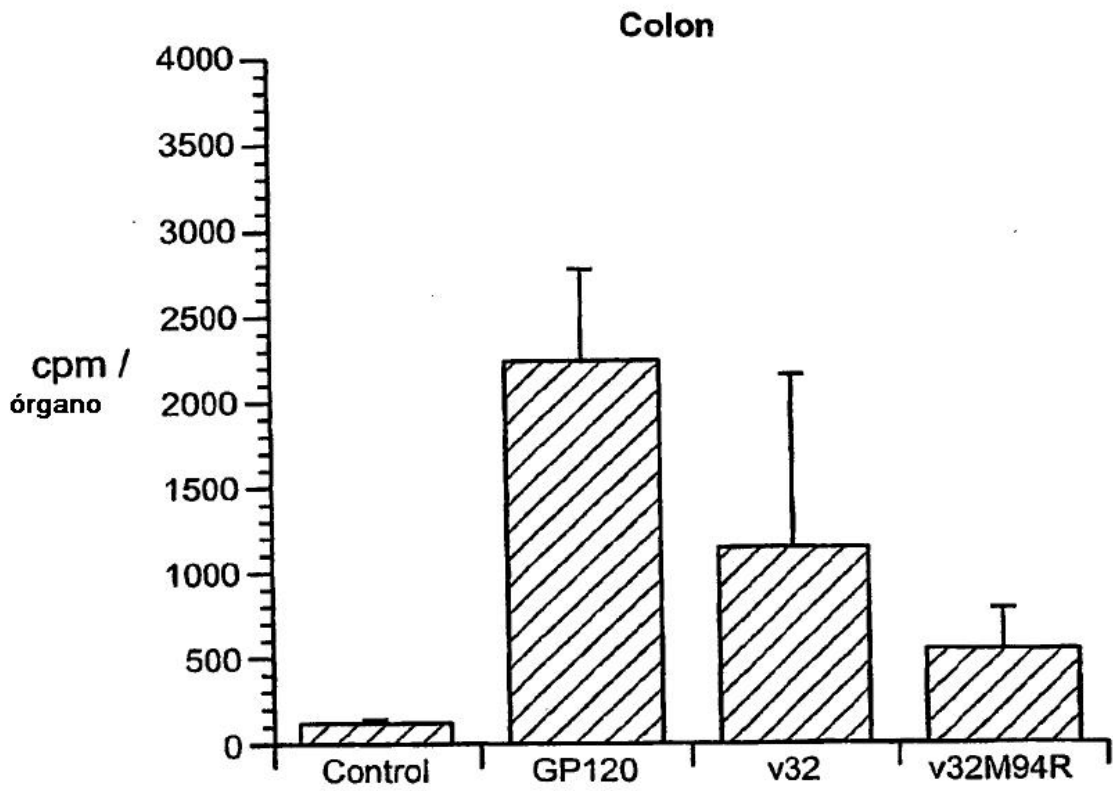


**FIG. 15A**

	Posición	504.32R	Sustituciones de aminoácidos
	Kabat #	Relativo #	Aminoácido
HVR-L1	24	A1	R
	25	A2	A
	26	A3	S
	27	A4	E
	28	A5	S
	29	A6	V
	30	A7	D
	31	A8	D
	32	A9	L
	33	A10	L
	34	A11	H
HVR-L2	49	B1	K
	50	B2	Y
	51	B3	A
	52	B4	S
	53	B5	Q
	54	B6	S
	55	B7	I
	56	B8	S
HVR-L3	89	C1	Q
	90	C2	Q
	91	C3	G
	92	C4	N
	93	C5	S
	94	C6	L
	95	C7	P
	96	C8	N
	97	C9	T

	Posición		504.32R	Sustituciones de
	Kabat #	Relativa #	Aminoácido	aminoácidos
HVR-H1	26	D1	G	
	27	D2	F	
	28	D3	F	
	29	D4	I	
	30	D5	T	
	31	D6	N	
	32	D7	N	
	33	D8	Y	
	34	D9	W	
	35	D10	G	
HVR-H2	49	E1	G	
	50	E2	Y	FVD
	51	E3	I	
	52	E4	S	
	53	E5	Y	
	54	E6	S	G
	55	E7	G	
	56	E8	S	
	57	E9	T	
	58	E10	S	Y
	59	E11	Y	
	60	E12	N	TAD
	61	E13	P	HDA
	62	E14	S	
	63	E15	L	V
	64	E16	K	
	65	E17	S	G
HVR-H3	93	F1	A	
	94	F2	R	MAEGQS
	95	F3	T	
	96	F4	G	
	97	F5	S	
	98	F6	S	
	99	F7	G	
	100	F8	Y	
	k	F9	F	
	101	F10	D	
	102	F11	F	Y
Cadena pesada	71		R	AT
	73		T	N
FR3	78		F	AFL

**FIG. 15B**



**FIG. 16**