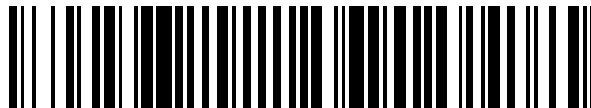


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 521**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2002 E 02734771 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 1442061**

54 Título: **Reducción de las inmunogenicidades de inmunoglobulinas por corrección de la región estructural**

30 Prioridad:

**27.06.2001 US 892613**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.05.2013**

73 Titular/es:

**LEUNG, SHAWN SHUI-ON (100.0%)  
RM. 305, 40 CONSTITUTION WAY, PORTE  
LIBERTE  
JERSEY CITY, NJ 07930, US**

72 Inventor/es:

**LEUNG, SHAWN SHUI-ON**

74 Agente/Representante:

**ÁLVAREZ LÓPEZ, Fernando**

**ES 2 402 521 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

Reducción de las inmunogenicidades de inmunoglobulinas por corrección de la región estructural

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a novedosos procedimientos en re-manipular, o remodelar, anticuerpos con indicaciones clínicas (tanto terapéuticas como de diagnóstico). El procedimiento combina el uso de tecnología recombinante y, enfoques escalonados y sistémicos en re-diseñar secuencias de anticuerpos. La invención  
10 proporciona particularmente anticuerpos que se modifican para ser menos inmunogénicos que el homólogo sin modificar cuando se usa *in vivo*.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los anticuerpos monoclonales (Mab) se han convertido en los fármacos proteicos más satisfactorios que se usan para el tratamiento de una variedad de enfermedades, que incluyen cánceres, trasplante, infección vírica, etc. Sin embargo, el concepto de panacea tardó más de 25 años en alcanzarse, debido a que hubo problemas asociados al uso de anticuerpos monoclonales. Uno de los principales problemas procede de la fuente original de la mayoría de los anticuerpos monoclonales, que son de origen de roedor y murino. Inyecciones repetidas de estas proteínas  
20 extrañas en el ser humano producirían inevitablemente la provocación de respuestas inmunitarias del huésped contra los anticuerpos: las llamadas respuestas de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA). Aunque intentos anteriores por usar las técnicas de ingeniería molecular para construir anticuerpos quiméricos (por ejemplo, regiones variables de ratón unidas a regiones constantes humanas) fueron algo eficaces en mitigar las respuestas de HAMA, sigue habiendo un gran tramo de secuencias variables murinas que constituyen 1/3 de la secuencia de anticuerpos  
25 total que podría ser suficientemente inmunogénica en provocar respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA). Una mejora más avanzada en la ingeniería de anticuerpos se ha utilizado recientemente para generar anticuerpos humanizados en los que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un ratón donante o inmunoglobulina de rata se injertan sobre regiones estructurales humanas (por ejemplo, publicación EPO n° 0239400). El procedimiento se llama "humanización", o "injerto de CDR". El concepto original de la humanización  
30 describe el injerto directo de CDR sobre regiones estructurales humanas, reduciendo las secuencias no humanas a menos del 5%, y así las respuestas de HAMA y HACA. Sin embargo, la sustitución directa de las secuencias de la región estructural sin modificaciones adicionales puede producir la pérdida de afinidad por el antígeno, algunas veces nada menos que 10 veces o más (Jones y col., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoyen y col., Science, 239:1534-1536, 1988). Para mantener la afinidad del anticuerpo injertado con CDR o humanizado se requerirán  
35 sustituciones de un aminoácido de la región estructural humana de la inmunoglobulina aceptora con el aminoácido correspondiente de una inmunoglobulina donante en posiciones seleccionadas. Las posiciones en las que la sustitución tiene lugar se determinan por un conjunto de criterios publicados (documentos US 5.85.089; US 5.693.762; US 5.693.761). Sin embargo, la presencia de aminoácidos murinos dentro de tramos de secuencias humanas de la región estructural pueden ser inmunogénicos en la generación de nuevos epítopes de linfocitos T y  
40 B. Además, la identificación de los aminoácidos de la región estructural apropiados que van a sustituirse puede ser algunas veces difícil, reduciendo adicionalmente las oportunidades de éxito en la humanización sin impactos significativos sobre la especificidad y afinidad del anticuerpo humanizado.

Por tanto, se necesitan medios nuevos y mejorados para producir inmunoglobulina re-manipulada con  
45 inmunogenicidad reducida o eliminada a la vez que se mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo parental. Preferentemente, la inmunoglobulina re-manipulada no debe contener sustituciones de aminoácidos de FR del anticuerpo parental, que puede ser una fuente probable de epítopes inmunogénicos para linfocitos T o B. Sin embargo, el enfoque también ofrece la flexibilidad en el diseño de secuencias en el que algunos residuos murinos o una tramo de las secuencias murinas pueden incluirse en el diseño final, con el objetivo final de reducir la  
50 inmunogenicidad a la vez que se mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo resultante para usos humanos. La presente invención describe los procedimientos y enfoques en satisfacer estos objetivos.

### RESUMEN DE LA INVENCION

55 La presente invención está delimitada por las reivindicaciones. Se desvelan procedimientos para re-manipular cadenas de inmunoglobulina que tienen generalmente una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina donante y porciones de secuencias de la región estructural de una o más inmunoglobulinas humanas, o de primate. Los procedimientos preferidos comprenden primero dividir las secuencias de la región estructural de inmunoglobulinas de todas las especies en subregiones compartimentalizadas de FR1,

FR2, FR3 y FR4, según la base de datos de Kabat (Kabat y col. Sequences of proteins of immunological interest. Maryland: US Department of Health and Human Services, NIH, 1991), y comparar las FR individuales, en lugar de la región estructural completa, en las subregiones de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la inmunoglobulina parental con secuencias correspondientes en una colección de cadenas de inmunoglobulina humana, o de primate, y seleccionar las FR humanas o de primate apropiadas con el mayor grado de homología para sustituir las FR originales de la inmunoglobulina parental (corrección de la región estructural o de FR). Las FR humanas pueden seleccionarse de más de una secuencia de inmunoglobulina humana o de primate. Una colección de secuencias de inmunoglobulina humana o de primate puede obtenerse de diferentes bases de datos (por ejemplo, base de datos de Kabat, National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource, Brookhaven Protein Data Bank, internet, etc.). Las secuencias de FR individuales seleccionadas de inmunoglobulinas humanas o de primate tendrán normalmente más del 60% de homología con las secuencias de FR parentales correspondientes. Aunque la alta homología global será un criterio importante para seleccionar las FR para corrección, se usarán FR de menos homología si la homología de secuencias que flanquean directamente las CDR o en posiciones de bucle en las que el (los) contacto(s) con el sitio de unión a antígeno se determina(n) experimentalmente o se predice(n) mediante modelado informático. La inmunoglobulina parental cuyas FR van a corregirse puede ser tanto una cadena pesada como cadena ligera. Puede usarse una cadena ligera y pesada corregida para formar una inmunoglobulina o anticuerpo de FR corregida completa que tiene dos pares de cadena ligera/pesada, con o sin regiones constantes humanas de longitud parcial o completa.

Las FR individuales elegidas para corregir una cadena de inmunoglobulina parental (se aplica a tanto cadenas pesadas como ligeras) deberán:

(1) tener preferentemente secuencias de aminoácidos inmediatamente adyacentes a las CDR idénticas a las de la cadena de inmunoglobulina parental;

(2) tener secuencias de aminoácidos inmediatamente adyacentes a las CDR conservativamente similares en estructura a, si no completamente idénticas a, las de la cadena de inmunoglobulina parental;

(3) tener preferentemente aminoácido idéntico en posición de FR correspondiente de la inmunoglobulina parental predicha que está dentro de aproximadamente 0,3 a 0,6 nm de las CDR (o el sitio de unión a antígeno eficaz) en un modelo de inmunoglobulina tridimensional y que puede interactuar con el antígeno o con las CDR de la inmunoglobulina parental o de FR corregida;

(4) tener aminoácido conservativamente similar en estructura al aminoácido en posición de FR correspondiente de la inmunoglobulina parental predicha que está dentro de aproximadamente 0,3 a 0,6 nm de las CDR (o el sitio de unión a antígeno eficaz) en un modelo de inmunoglobulina tridimensional y que puede interactuar con el antígeno o con las CDR de la inmunoglobulina parental o de FR corregida.

Cada una de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de FR corregida comprenderá normalmente FR procedentes de una o más inmunoglobulinas humanas o de primate según uno cualquiera o todos los criterios de selección. Las cadenas pesadas y ligeras de FR corregida de la presente invención, cuando se combinan en un anticuerpo intacto, fragmento de anticuerpo o derivados basados en anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo monocatenario, diacuerpos, etc.), serán sustancialmente no inmunogénicas en seres humanos y retendrán sustancialmente la misma afinidad y propiedades (por ejemplo, internalización tras la unión) que la inmunoglobulina parental por el antígeno. Estos niveles de afinidad deben variar dentro del intervalo de 4 veces, y preferentemente dentro de aproximadamente 2 veces de la afinidad original de la inmunoglobulina parental por el antígeno.

La inmunoglobulina re-manipulada, o de FR corregida, según la invención puede comprender las secuencias de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo parental, en las que las FR particulares elegidas para corrección cada una correspondiente a FR en la inmunoglobulina parental comprende aminoácidos reintroducidos de la región estructural de la inmunoglobulina parental fuera de las CDR de Kabat y Chothia, en las que los aminoácidos reintroducidos sustituyen aminoácidos correspondientes en la FR de corrección, que es la FR particular derivada de una fuente diferente usada para corrección, o que sustituye la FR original de, la inmunoglobulina parental, y cada uno de dichos aminoácidos reintroducidos:

a. es adyacente a una CDR en la secuencia de inmunoglobulina donante, o

b. contiene un átomo dentro de una distancia de 0,4, 0,5 ó 0,6 nm de una CDR en dicha inmunoglobulina re-manipulada; o

c. puede interactuar con aminoácidos en las CDR, o

d. es típica en su posición para las especies de la FR particular elegida para la corrección, y el aminoácido sustituido en dicha FR es raro en su posición para las especies de las que se deriva la FR.

Se aplican principios similares para re-manipular, o corregir, inmunoglobulinas parentales de una especie con las FR de una especie diferente. Los expertos en la materia de ingeniería de proteínas y/o molecular podrán adoptar el diseño y principio de la presente invención para producir inmunoglobulinas de FR corregida, o derivados de las mismas. Una vez diseñadas, existe una variedad de técnicas en la construcción de la secuencia de inmunoglobulina de FR corregida, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio y síntesis de genes. Las secuencias de FR corregida ensambladas se subclonarán en vectores de expresión que contienen las cadenas pesadas y ligeras constantes de la inmunoglobulina apropiadas para la transfección en líneas celulares productoras. Pueden usarse diferentes sistemas de células para la producción de las inmunoglobulinas de FR corregida, que incluyen células bacterianas, de levadura, de insecto y de mamífero.

Alternativamente, las inmunoglobulinas pueden producirse en las leches de animales transgénicos o transmáticos, o como proteínas almacenadas en plantas transgénicas. La presente divulgación ofrece procedimientos mejorados y novedosos que son relativamente fáciles (no necesitan identificar aminoácido de FR importante que interacciona con las CDR) y altamente flexibles (libertad para hacer corresponder, y cambiar si fuera necesario, FR individuales) en generar inmunoglobulinas con inmunogenicidades reducidas o eliminadas sin sacrificar la afinidad de unión y la probabilidad de introducir nuevos epítopes de linfocitos T y B resultantes de la introducción de aminoácidos de la región estructural de inmunoglobulinas parentales en las FR humanas. Los anticuerpos de FR corregida serán adecuados para uso humano en el tratamiento de una variedad de enfermedades, tanto usados individualmente como repetidamente, a dosis bajas (inferiores a 10 mg/m<sup>2</sup>) o altas (superiores a 100 mg/m<sup>2</sup>), en formas desnudas o como conjugados de fusión o químicos, usados solos, o conjuntamente con otras inmunoglobulinas o modalidades de tratamiento.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

**Fig. 1A y Fig. 1B.** Secuencias de aminoácidos (código de una letra) de las regiones variables de la cadena pesada (VH) (A) y cadena ligera (VL) (B) del anticuerpo anti-CD22 murino, RFB4. Las CDR están recuadradas.

**Fig. 2A y Fig. 2B.** Comparación de las secuencias de la región estructural (FR) compartimentalizadas de las regiones variables de la cadena pesada (A) y cadena ligera (B) de RFB4, con las diferentes FR humanas de la mayor homología. Se indican FR1, FR2, FR3 y FR4. Las CDR están recuadradas. El texto en cursiva entre paréntesis a la izquierda de la secuencia de FR indica la fuente de la FR humana. Los aminoácidos en las FR humanas que son diferentes de los de las FR murinas correspondientes están en negrita.

**Fig. 3A y Fig. 3B.** Las secuencias diseñadas finales (código de una letra) de las regiones variables de la cadena pesada (A) y cadena ligera (B) del anticuerpo de FR corregida, hpRFB4. Las CDR están recuadradas. Los aminoácidos en las FR humanas que son diferentes de los de las FR murinas originales están en negrita.

**Fig. 4.** Análisis de SDS-PAGE de cRFB4 y hpRFB4 purificados bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras.

**Fig. 5.** Análisis de citometría de flujo sobre la especificidad de unión y afinidad de cRFB4 y hpRFB4 sobre células Raji.

**Fig. 6.** Ensayo de unión por competencia comparando la afinidad de unión entre cRFB4 y hpRFB4. Como control se usó un anticuerpo irrelevante.

**Fig. 7A y Fig. 7B.** Secuencias de aminoácidos (código de una letra) de las regiones variables de la cadena pesada (A) y cadena ligera (B) del anticuerpo anti-CD20 murino, 1F5. Las CDR están recuadradas

**Fig. 8A y Fig. 8B.** Comparación de las secuencias de la región estructural (FR) compartimentalizadas de las regiones variables de la cadena pesada (A) y cadena ligera (B) de 1F5 con las diferentes FR humanas de la mayor homología. Se indican FR1, FR2, FR3 y FR4. Las CDR están recuadradas. El texto en cursiva entre paréntesis a la izquierda de la secuencia de FR indica la fuente de la FR humana. Los aminoácidos en las FR humanas que son

diferentes de los de las FR murinas correspondientes están en negrita.

**Fig. 9A y Fig. 9B.** Las secuencias diseñadas finales (código de una letra) de las regiones variables de la cadena pesada (A) y cadena ligera (B) del anticuerpo de FR corregida, hp1F5. Las CDR están recuadradas. Los aminoácidos en las FR humanas que son diferentes de los de las FR murinas originales están en negrita. Se subrayan FR murinas no sustituidas por secuencias humanas.

**Fig. 10.** Secuencia de aminoácidos de un diseño alternativo de regiones variables de FR corregida para 1F5 (Diseño alternativo). Las CDR están recuadradas. Los aminoácidos de la región estructural humana que se diferencian de los de las regiones estructurales murinas correspondientes están en negrita.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se define por las reivindicaciones.

15

La presente divulgación tiene como objetivo establecer novedosos enfoques en el diseño de inmunoglobulina con alto grado de homología con secuencias humanas o de primate mediante un procedimiento llamado "corrección de la región estructural (FR)". La inmunoglobulina de FR corregida (inmunoglobulina corregida después) tendrá inmunogenicidad sustancialmente reducida, o eliminada, cuando se usa en seres humanos, y lleva la mayoría o todas las características de una inmunoglobulina humana tal como la capacidad para elegir como diana antígenos específicos, y funciones efectoras (por ejemplo, fijación del complemento, ADCC, etc.), a la vez que mantiene la especificidad y afinidad de la inmunoglobulina parental contra un antígeno específico. La inmunoglobulina corregida comprenderá una cadena pesada y ligera, de las cuales, la región variable respectiva contendrá secuencias que representan FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4, según la clasificación de Kabat (Kabat y col., trabajo citado). Al menos una de las cuatro FR de cada cadena de inmunoglobulina parental que contiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se sustituirá, o "corregirá", con una FR humana o de primate correspondiente. Si dos o más FR de la cadena de inmunoglobulina parental van a sustituirse, pueden corregirse con FR correspondientes de tanto la misma inmunoglobulina humana como de primate, o de inmunoglobulina humana o de primate diferente, dentro del mismo subgrupo o en diferentes subgrupos, o de una combinación de inmunoglobulinas humanas y de primate. Las inmunoglobulinas corregidas se expresarán en sistema de huésped apropiado para la producción a gran escala en márgenes farmacéuticos típicos, y se usarán en seres humanos en formatos apropiados o combinaciones para tratar o detectar una amplia gama de enfermedades humanas.

35 Para garantizar un mejor entendimiento de la presente invención, se exponen varias definiciones. Como se usa en el presente documento, una "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Una proteína de inmunoglobulina típica contiene dos cadenas pesadas emparejadas con dos cadenas ligeras. Una cadena pesada de longitud completa de la inmunoglobulina tiene aproximadamente 50 kD de tamaño (aproximadamente 446 aminoácidos de longitud), y está codificada por un gen de la región variable de la cadena pesada (aproximadamente 116 aminoácidos) y un gen de la región constante. Hay genes de la región constante diferentes que codifican región constante de la cadena pesada de diferentes isotipos tales como secuencias alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon y mu. Una cadena ligera de longitud completa de la inmunoglobulina tiene aproximadamente 25 Kd de tamaño (aproximadamente 214 aminoácidos de longitud), y está codificada por un gen de la región variable de la cadena ligera (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda. La inmunoglobulina que se produce naturalmente se conoce como anticuerpo, normalmente en forma de un tetrámero que consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de la cadena ligera y pesada son juntas responsables de unirse a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras típicas de un anticuerpo.

50

La inmunoglobulina puede estar en diferentes formas, tanto que se producen naturalmente, químicamente modificadas como genéticamente manipuladas tales como Fv (Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:5879-5833; Bird y col., Science 242:423-426, 1988), diacuerpos, mini-anticuerpos, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpos híbridos bifuncionales (Lanzavecchia y col., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987) (véase, generalmente, Hood y col., "Immunology", Benjamin, NY, 2ª ed. 1984; Hunkapiller y Hood, Nature 323:15-16, 1986).

La región variable de tanto la cadena pesada como ligera se divide en segmentos que comprenden cuatro subregiones de la región estructural (FR1, FR2, FR3 y FR4), interrumpidas por tres tramos de secuencias hipervariables, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), como se definen en la base de datos

de Kabat (Kabat y col., trabajo citado), con la CDR1 posicionada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3 y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región estructural, como se denomina por otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina que se produce naturalmente. Como se usa en el presente documento, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región estructural. Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región estructural de un anticuerpo es las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes y sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de formar el sitio de unión de un anticuerpo que confiere especificidad de unión y afinidad por un epítotope de un antígeno.

Anticuerpo parental es un anticuerpo de una especie particular, por ejemplo, murina, que va a re-manipularse, remodelarse, o en la presente invención, corregirse en FR en una forma, secuencia, o estructura, apropiada para su uso en una especie diferente, por ejemplo, humana, con inmunogenicidad reducida o minimizada.

Anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyas regiones variables están ligadas, sin modificaciones de secuencia significativas de las secuencias de la región V parental, a las regiones constantes de la cadena pesada y ligera correspondientes de una especie diferente. La construcción de un anticuerpo quimérico se realiza normalmente ligando las secuencias de ADN que codifican las regiones variables con las secuencias de ADN que codifican las cadenas constantes correspondientes. Los tipos más comunes de anticuerpos quiméricos son aquellos que contienen regiones variables murinas y regiones constantes humanas. En este caso, la molécula híbrida expresada tendrá la especificidad de unión y afinidad del anticuerpo murino parental, y las funciones efectoras de un anticuerpo humano. Y, lo que es más importante, 2/3 de los aminoácidos de la proteína recombinante son de origen humano; por tanto, se espera una inmunogenicidad reducida o insignificativa cuando se use en seres humanos, como en el caso del anticuerpo quimérico terapéutico C2B8 (o Rituxan) (Davis y col., J. Clin. Oncol. 17:1851-1857, 1999; Coiffier y col., Blood 92:1927-1932, 1998; McLaughlin y col., J. Clin. Oncol. 16:2825-2833, 1998).

Una inmunoglobulina "humanizada" es generalmente aceptada como una inmunoglobulina que comprende una región estructural humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (Jones y col., trabajo citado; Verhoeyen y col., trabajo citado; Riechmann y col., trabajo citado). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se llama la "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la región estructural se llama el "aceptor". Normalmente, como se ha usado y denominado por otros, un aceptor se deriva de una única especie de inmunoglobulina humana. Para mantener la afinidad de la inmunoglobulina "humanizada", residuos de aminoácidos donantes pueden tener que incorporarse en la región estructural de la inmunoglobulina aceptora. Hay un conjunto de criterios para seleccionar un número limitado de aminoácidos dentro de la inmunoglobulina aceptora para la conversión en secuencias de donante, como se ha publicado en una serie de publicaciones (documentos US 5.85.089; US 5.693.762; US 5.693.761). Las inmunoglobulinas humanizadas pueden o pueden no contener regiones constantes. Una inmunoglobulina de la cadena pesada humanizada es una inmunoglobulina humanizada que comprende una región constante de la cadena pesada humana correspondiente, y una inmunoglobulina de la cadena ligera humanizada es una inmunoglobulina humanizada que comprende una región constante de la cadena ligera humana correspondiente. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una inmunoglobulina de la cadena pesada humanizada.

Un anticuerpo humanizado satisfactorio tendrá que tener las siguientes características:

(1) inmunogenicidad significativamente reducida, y preferentemente eliminada, resultante de las secuencias humanizadas, permitiendo inyección múltiple del anticuerpo humanizado para usos humanos;

(2) inmunorreactividad mínimamente perturbada que incluye especificidad y afinidad (dentro de 3 veces) contra el antígeno original;

(3) capaz de inducir funciones efectoras humanas tales como fijación del complemento, citotoxicidad mediada por complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, etc.

El injerto directo de CDR de donante sobre la región estructural aceptora humana sin modificaciones de secuencia adicionales producirá probablemente una pérdida sustancial de la afinidad por antígeno. Aunque la introducción de aminoácidos donantes seleccionados a regiones estructuralesceptoras rectificará algo el problema, y la mayor parte del tiempo, mejorará la afinidad, sin embargo, el enfoque es tedioso, requiriendo algunas veces la ayuda de modelado informático en identificar el aminoácido de la región estructural apropiado a mutar, y carece de flexibilidad

en la elección de regiones estructurales humanasceptoras en un modo todo o nada. Y, lo que es más importante, es probable que introduzca posibles nuevos epítopes inmunogénicos reteniendo residuos “donantes” parentales en la región estructural “aceptora” humana.

5 La presente divulgación trata estos problemas y crea un enfoque novedoso con elevada flexibilidad y simplicidad en generar un anticuerpo de FR corregida que no es inmunogénico o tiene baja inmunogenicidad, habiendo todavía retenido la mayor parte o toda la afinidad original contra un antígeno específico, como en el anticuerpo parental. Como la mayoría de las respuestas inmunitarias contra una inmunoglobulina quimérica o humanizada irá dirigida contra epítopes en las regiones variables, sin pretender quedar ligado por teoría, el principio por el que la invención  
10 ocurre se ilustrará, pero no se limitará a, usando la región variable como ejemplo.

Existen al menos dos tipos de epítopes que contribuyen a la inmunogenicidad contra una proteína. Los llamados “epítopes de linfocitos T” son secuencias de péptidos cortas liberadas durante la degradación de proteínas dentro de células y posteriormente presentadas por moléculas de los complejos de histocompatibilidad mayor (MHC) con el fin  
15 de desencadenar la activación de linfocitos T. Para péptidos presentados por la clase II de MHC, tal activación de linfocitos T puede luego dar lugar a una respuesta de anticuerpos por estimulación directa de linfocitos B para producir tales anticuerpos. Un análisis detallado de la estructura de una región variable humanizada revela la existencia inevitable de tramos de CDR posiblemente inmunogénicas. Estas CDR compartimentalizan físicamente y funcionalmente el resto de las secuencias de la región estructural en cuatro subregiones, concretamente, FR1, FR2,  
20 FR3 y FR4 (Kabat y col., trabajo citado). Como los epítopes de linfocitos T son péptidos cortos continuos lineales, la presencia o ausencia de tales epítopes en cada compartimento de FR no debe tener correlación entre sí, si las FR diferentes se derivan de las mismas regiones estructurales o regiones estructurales diferentes. La introducción de residuos de la región estructural donantes a la región estructural aceptora usando el enfoque de humanización de Queen y col. (documentos US 5.85.089; US 5.693.762; US 5.693.761) tendrá la posibilidad de generación de nuevos  
25 epítopes de linfocitos T inmunogénicos, produciendo la provocación de respuestas inmunitarias contra el anticuerpo humanizado, particularmente respuestas de anticuerpos contra la región idiotípica formada por los bucles de CDR donantes. No es común tener entre 3 y 7 aminoácidos donantes incorporados en una cadena de inmunoglobulina humanizada, aumentando enormemente las posibilidades de urgencia de nuevos epítopes de linfocitos T.

30 Similarmente, estos residuos derivados de donante incorporados dentro de la región estructural humana pueden formar nuevos epítopes de linfocitos B inmunogénicos reconocibles por anticuerpos. Aunque está bien establecido que la re-introducción de residuos donantes a la región estructural aceptora es importante en mantener la afinidad por antígeno original de la inmunoglobulina humanizada, idealmente sería preferible si la humanización pudiera llevarse a cabo por injerto directo de CDR donantes sobre la región estructural aceptora sin modificación y pérdida  
35 de afinidad adicional.

La presente divulgación proporciona un nuevo enfoque en la reducción o eliminación de inmunogenicidad de inmunoglobulinas cuya afinidad contra el antígeno específico se mantiene dentro de tres veces su nivel original. El enfoque es flexible, versátil, simple y normalmente no requiere análisis por modelado informático sofisticado (aunque  
40 no se descarta que sea usado). Trata con el problema de la relación recíproca entre reducir la inmunogenicidad y mantener la afinidad en la humanización de un anticuerpo con las metodologías previas y disponibles. Usando una región variable de inmunoglobulina como ejemplo, un conjunto de criterios y principios será seguido en la corrección de FR de la secuencia. Los criterios puede usarse individualmente, o cuando sea necesario en combinación, para lograr inmunogenicidad reducida o eliminada, y la afinidad deseada u otras características.

45 En la humanización de una región variable de inmunoglobulina por corrección de FR, las secuencias de aminoácidos de la inmunoglobulina parental se compartimentalizan en FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 según la clasificación de Kabat y col. (trabajo citado). Cada una de las FR compartimentalizadas será tratada por separado y se usará para alinear con los segmentos de FR correspondientes encontrados en todas las bases de datos,  
50 disponibles tanto en el dominio público, entidades comerciales, como posesión privada (por ejemplo, la base de datos de Kabat, trabajo citado; the National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource). Una inmunoglobulina puede corregirse con FR de más de una fuente de inmunoglobulina. Preferentemente se usarán segmentos de FR humanos con el mayor grado de homología (>60%) con las FR parentales correspondientes. Sin embargo, los aminoácidos en las FR adyacentes a una o más de las 3 CDR en la secuencia de la cadena de  
55 inmunoglobulina primaria pueden interaccionar directamente con el antígeno (Amit y col., Science, 233:747-753, 1986, que se incorpora en el presente documento por referencia) y se usará la selección de estos aminoácidos idénticos a las FR humanas con menor homología según los criterios expuestos más adelante.

Se usará una FR1 humana cuando tenga la mayor homología con la FR1 parental, preferentemente 100%, en tres o

más aminoácidos inmediatamente adyacentes a CDR1.

Se usará una FR2 humana cuando tenga la mayor homología con la FR2 parental, preferentemente 100%, en tres o más aminoácidos en ambos extremos inmediatamente adyacentes a las CDR1 y CDR2 flanqueantes.

5

Se usará una FR3 humana cuando tenga la mayor homología con la FR3 parental, preferentemente 100%, en tres o más aminoácidos en ambos extremos inmediatamente adyacentes a las CDR2 y CDR3 flanqueantes.

Se usará una FR4 humana cuando tenga la mayor homología con la FR4 parental, preferentemente 100%, en tres o más aminoácidos inmediatamente adyacentes a CDR3.

10

En el caso de que FR humanas con 100% de homología en tres o más aminoácidos adyacentes a las CDR no puedan identificarse, se seleccionarán FR con la homología más próxima en estas posiciones que contienen aminoácidos conservativamente similares, tales como, gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

15

Preferentemente, se seleccionarán FR humanas cuyos aminoácidos en las posiciones conocidas por ser próximas a, o tener interacciones con las CDR/sitio de unión a antígeno (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987; Chothia y col., *Nature* 342:877, 1989, y Tramontano y col., *J. Mol. Biol.* 215:175, 1990), tanto basados en modelado informático (véanse Levy y col., *Biochemistry* 28:7168-7175, 1989; Bruccoleri y col., *Nature* 335:564-568, 1988; Chothia y col., *Science* 233:755-758, 1986), estructura cristalina, información publicada como experiencia previa, que son idénticos, o conservativamente similares a los de las FR parentales.

20

La corrección de FR no descarta la introducción de aminoácidos parentales en posiciones correspondientes de una FR corregida cuando sea necesario, o la inclusión de FR en la inmunoglobulina de diferentes especies tales como diferentes primates, murina, etc., cuando las bases de datos disponibles fracasen en producir una FR satisfactoria que cumpla los criterios anteriores. El objetivo primario es producir anticuerpos con inmunogenicidad reducida, preferentemente, eliminada, sin pérdida sustancial de afinidad. El enfoque aumenta las posibilidades de éxito a este respecto, con mejoras significativas con respecto a otros procedimientos en términos de flexibilidad, simplicidad y facilidad de operación.

30

Los anticuerpos de FR corregida que llevan secuencias constantes humanas podrán inducir funciones efectoras inmunitarias humanas tales como citotoxicidad mediada por complemento (CM) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), tras la unión a los antígenos diana. Además, cuando se inyectan en seres humanos para fines terapéuticos o de diagnóstico, se espera que los anticuerpos corregidos con FR humanas sean no inmunogénicos, es decir, no provoquen respuestas de anticuerpos contra la proteína inyectada, permitiendo múltiples inyecciones en pacientes humanos si fuera necesario para alcanzar los máximos beneficios clínicos. Se ha informado de anticuerpos no humanos que tienen semividas en circulación significativamente más cortas que las de anticuerpos humanos (Shaw y col., *J Immunol.* 138:4534-4538, 1987). Los anticuerpos corregidos, que llevan en gran parte secuencias humanas, tendrán supuestamente una semivida prolongada reminiscente a la de los anticuerpos humanos que se producen naturalmente.

40

En la construcción de una inmunoglobulina de FR corregida, el diseño de secuencias para las regiones variables de la inmunoglobulina se hará usando los criterios y principios ilustrados anteriormente. La secuencia de la región variable de FR corregida diseñada se ensamblará usando una variedad de técnicas recombinantes convencionales muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Preferentemente, la secuencia diseñada, normalmente de un tamaño de aproximadamente 350 pares de bases, será sintetizada por genes (Leung y col., *Molecular Immunol.* 32:1413-1427, 1995; Daugherty y col., *Nucl. Acid Res.* 19:2471-2476; DeMartino y col., *Antibody Immunoconj. Radiopharmaceut.* 4:829, 1991; Jones y col., trabajo citado, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia), o las FR individuales pueden introducirse para sustituir las FR parentales mediante procedimientos de mutagénesis dirigida a sitio o a oligonucleótido (Gillman y Smith, *Gene* 8:81-97, 1979; y Roberts y col., *Nature* 328:731-734).

45

50

El segmento de ADN que codifica la inmunoglobulina de FR corregida se unirá a secuencias de ADN que codifican las regiones de la cadena pesada y ligera humana en vectores de expresión de ADN adecuados para propagación bacteriana y expresión en diferentes células huésped. Hay una variedad de vectores de ADN adecuados para la expresión en una variedad de sistemas de células huésped. Vectores de ADN apropiados pueden elegirse para la expresión de las inmunoglobulinas de FR corregidas. Normalmente, una secuencia de ADN de control de la expresión adecuada está operativamente ligada a segmentos de ADN que codifican las cadenas de inmunoglobulina. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores eucariotas

55



- en vectores que pueden transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control para huéspedes procariontes. La secuencia que codifica las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras de FR corregida pueden incorporarse en un único vector de expresión de ADN, o en vectores de expresión de cadenas pesadas y ligeras separados. En el último caso, las células huésped tendrán que estar
- 5 simultáneamente incorporadas con ambos vectores con el fin de producir un anticuerpo de FR corregida con los polipéptidos de la cadena pesada y ligera adecuadamente emparejados. En general, una secuencia conductora que permite el transporte del polipéptido de inmunoglobulina al aparato de Golgi para la posterior secreción se incluye en el extremo N de cada cadena de inmunoglobulina para la expresión en células huésped eucariotas. Una vez el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para
- 10 expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y, según se desee, pueden seguir recogida y purificación de las cadenas ligeras humanizadas, cadenas pesadas, dímeros de cadenas ligeras/pesadas o anticuerpos intactos, fragmentos de unión, anticuerpo monocatenario (sFv), diacuerpos, o derivados de los mismos, u otras formas de inmunoglobulina (véase Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, NY, 1979).
- 15 Es un hecho muy conocido que haya diferentes regiones constantes humanas para las cadenas pesadas y ligeras. Un isotipo particular tendrá características efectoras específicas que pueden elegirse para su uso para diferentes fines. Secuencias de ADN de la región constante humana pueden aislarse según procedimientos muy conocidos de una variedad de células humanas, pero preferentemente linfocitos B inmortalizados (véanse, Kabat, trabajo citado y el documento WO87/02671). Las CDR para producir las inmunoglobulinas de la presente invención se derivarán
- 20 similarmente de anticuerpos monoclonales que pueden unirse a los antígenos predeterminados, tales como CD22 y CD20, por ejemplo, y producirse por procedimientos muy conocidos en cualquier fuente de mamífero conveniente que incluye, ratones, rata, conejos, u otro vertebrado, que pueden producir anticuerpos. Células fuente adecuadas para el ADN de la región constante y región estructural y secreción pueden obtenerse de varias fuentes tales como la Colección americana de cultivos tipo ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", sexta edición, 1988, Rockville, MD, EE.UU.).
- 25

Los vectores de expresión de ADN que contienen las secuencias codificantes para las cadenas de inmunoglobulina de FR corregida operativamente ligadas a una secuencia de control de la expresión (incluyendo promotor y potenciadores) son normalmente replicables en los organismos huésped tanto como episomas como una parte

30 integral del ADN cromosómico huésped. Marcadores de selección tales como tetraciclina, neomicina, beta-lactamasa, etc., están incluidos en el vector para permitir la detección de células transformadas con los vectores de ADN (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.704.362).

Los huéspedes bacterianos son adecuados para propagar los vectores de ADN, además de expresar el ADN de

35 inmunoglobulina incorporado. Por ejemplo, *E. coli* es el huésped procarionte más comúnmente usado para clonar la secuencia de ADN para la presente invención. Otros huéspedes microbianos que son útiles para los mismos fines incluyen, como ejemplos, bacilos (por ejemplo, *Bacillus subtilis*) y otras enterobacteriáceas (por ejemplo, *Salmonella*, *Serratia*), y diversas especies de *Pseudomonas*. La expresión de secuencias clonadas en estos huéspedes requiere la presencia de secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por

40 ejemplo, un origen de replicación), y promotores funcionales que van a incluirse en el vector de ADN. Ejemplos de un sistema promotor muy conocido incluyen, pero no se limitan a, sistema promotor de triptófano (trp), sistema promotor de beta-lactamasa, sistema promotor de fago lambda, etc. Estos promotores son responsables de controlar la expresión, o transcripción, de la secuencia funcional de genes en la dirección 3' del sistema promotor que contiene, además de todos los motivos necesarios, y opcionalmente con una secuencia operadora, secuencias de

45 sitio de unión a ribosoma y similares, necesarias para la iniciación y traducción de la transcripción.

Similarmente, otros microbios, tales como levadura, también pueden usarse para la expresión. Por ejemplo, un huésped preferido será *Saccharomyces*, que es un huésped adecuado para vectores de expresión que contienen los

50 elementos de control de la expresión apropiados tales como promotores, que incluyen 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee.

Pueden usarse células huésped eucariotas de origen invertebrado. Por ejemplo, células de insecto, tales como hi-5, SF9, SF21. Vectores de expresión apropiados que contienen sitios de clonación convenientes, promotores, secuencias de terminación, etc., que son importantes para la expresión de alto nivel en las células huésped están

55 disponibles comercialmente (Invitrogen, San Diego, CA).

Preferentemente, puede usarse cultivo celular de tejido de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (véase, Winnacker, "From Genes to Clones," VCH Publisher, NY, NY, 1987). Las células huésped de mamífero más comúnmente usadas son líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), diversas

líneas celulares de COS, células HeLa, y líneas de células de mieloma tales como líneas celulares SP2/0, líneas celulares NS0, líneas celulares YB2/0, etc., y linfocitos B transformados o hibridomas. Estas líneas celulares pueden conferir la glucosilación correcta en el sitio apropiado tal como aminoácido 297 en el dominio CH2 de la cadena pesada, y secretar inmunoglobulinas de longitud completa, y son el sistema de células huésped de elección para esta invención particular. Similar a los vectores de expresión para otras células huésped, un vector de expresión de célula eucariota contendrá las secuencias de control de la expresión apropiadas que incluyen promotor (por ejemplo, aquellos derivados de genes de inmunoglobulina, gen de metalotioneína, SV40, adenovirus, citomegalovirus, virus del papiloma bovino y similares), potenciadores, normalmente con una secuencia conductora para dirigir el polipéptido expresado al aparato de Golgi para la glucosilación y exportación, los segmentos de ADN de interés (por ejemplo, las secuencias codificantes de la cadena pesada y ligera y secuencias de control de la expresión), un codón de terminación, otros sitios de información de procesamiento necesarios (tal como sitios de unión a ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, una secuencia de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción), y un marcador de selección (tal como Dhfr mutante, glutamina sintetasa (GS), higromicina, neomicina) (véase Kellems, "Gene Amplification in mammalian cells", Marcel Dekker Inc., NY, NY, 1993).

Existe una plétora de procedimientos establecidos y muy conocidos para introducir los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés en la célula huésped, tanto transitoriamente como establemente integrados, en el genoma de la célula huésped. Incluyen, pero no se limitan a, transfección con cloruro de calcio, tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, etc. (véase, Maniatis y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1982). La identificación de células huésped incorporadas con el vector de expresión apropiado podrá alcanzarse normalmente cultivando primero las células bajo presión de selección según el marcador de selección usado en el vector, y detección de proteínas secretadas, por ejemplo, los anticuerpos completos que contienen dos pares de cadenas pesadas y ligeras, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, mediante procedimientos convencionales tales como ELISA y análisis Western. La purificación de la inmunoglobulina expresada puede purificarse según procedimientos convencionales de la materia, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, generalmente, R Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, NY, 1982). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95% de homogeneidad, y las más preferidas del 98 al 99% o más homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o a homogeneidad según se desee, los polipéptidos pueden luego usarse terapéuticamente (incluyendo extracorpóreamente) o en desarrollar y realizar procedimientos de ensayos, tinciones inmunofluorescentes y similares (véase, generalmente, *Immunological Methods* vols I y II, Lefkovits y Pemis, eds., Academic Press, Nueva York, NY, 1979 y 1981).

Los anticuerpos de la presente invención encontrarán normalmente uso individualmente, o en combinación con otras modalidades de tratamiento, en el tratamiento de enfermedades susceptibles a terapia basada en anticuerpos. Por ejemplo, las inmunoglobulinas pueden usarse para inmunización pasiva, o la eliminación de células o antígenos no deseados, tales como por lisis mediada por complemento, todas sin reacciones inmunitarias adversas sustanciales (por ejemplo, choque anafiláctico) asociadas a muchos anticuerpos anteriores.

Un uso preferible de los anticuerpos de la presente invención será el tratamiento de enfermedades usando sus formas desnudas (anticuerpos desnudos) a dosificaciones que oscilan de 50 mg a 400 mg/m<sup>2</sup>, administradas tanto localmente en el sitio de lesión, subcutáneamente, intravenosamente como intramuscularmente, etc. Se realizarán múltiples dosificaciones a diferentes intervalos para lograr respuestas terapéuticas o diagnósticas óptimas, por ejemplo, a intervalos semanales, una vez a la semana, durante cuatro semanas. El uso de los anticuerpos derivados de la presente invención puede combinarse con diferentes modalidades de tratamiento tales como fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, CHOP, Dox, 5-Fu, etc.), radioterapia, radioinmunoterapia, vacunas, enzimas, toxinas/inmunotoxinas, u otros anticuerpos derivados de la presente invención u otras. Los anticuerpos de la presente invención, si son específicos para el idiotipo de un anticuerpo antitumoral, pueden usarse como vacunas tumorales para la provocación de Ab3 contra el antígeno de tumor. También pueden utilizarse numerosos agentes adicionales, o combinaciones de agentes, muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en diferentes composiciones farmacéuticas. Los anticuerpos pueden usarse en sus formas desnudas, o como proteínas conjugadas con fármacos, radionúclidos, toxinas, citocinas, factores solubles, hormonas, enzimas (por ejemplo, carboxilesterasa, ribonucleasa), péptidos, antígenos (como vacuna tumoral), ADN, ARN, o cualquier otras moléculas efectoras que tengan una función terapéutica específica con el anticuerpo, sirviendo el resto de agentes que eligen diana o vehículos de administración. Además, los anticuerpos o anticuerpo derivados, tales como fragmentos de anticuerpos, Fv monocatenario, diacuerpos, etc., de la presente invención pueden usarse como proteínas de fusión

con otros restos funcionales tales como anticuerpos o derivados de anticuerpo de una invención diferente (por ejemplo, como anticuerpos biespecíficos), toxinas, citocinas, factores solubles, hormonas, enzimas, péptidos, etc. También pueden utilizarse diferentes combinaciones de composición farmacéutica, muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

5

El anticuerpo de FR corregida de la presente invención también puede usarse para fines *in vitro*, por ejemplo, como herramientas de diagnóstico para la detección de antígenos específicos, o similares. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no de limitación.

## 10 PARTE EXPERIMENTAL

En el diseño de la secuencia de aminoácidos de la cadena de inmunoglobulina de FR corregida, la secuencia de la región variable murina (se aplica tanto a VH como a VL) se compartimentalizó en FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4, según la clasificación de Kabat (Kabat y col., trabajo citado). La selección de las FR individuales para la corrección fue según las pautas que se han descrito previamente.

15

Se usará una FR1 humana cuando tenga la mayor homología con la FR1 parental, preferentemente 100%, en tres o más aminoácidos inmediatamente adyacentes a CDR1.

20 Se usará una FR2 humana cuando tenga la mayor homología con la FR2 parental, preferentemente 100%, en tres o más aminoácidos en ambos extremos inmediatamente adyacentes a las CDR1 y CDR2 flanqueantes.

Se usará una FR3 humana cuando tenga la mayor homología con la parental FR3, preferentemente 100%, en tres o más aminoácidos en ambos extremos inmediatamente adyacentes a las CDR2 y CDR3 flanqueantes.

25

Se usará una FR4 humana cuando tenga la mayor homología con la parental FR4, preferentemente 100%, en tres o más aminoácidos inmediatamente adyacentes a CDR3.

En el caso de que FR humanas con 100% de homología en tres o más aminoácidos adyacentes a las CDR no puedan identificarse, se seleccionarán FR con la homología más próxima en estas posiciones que contienen aminoácidos conservativamente similares, tales como, gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

30

Preferentemente, se seleccionarán FR humanas cuyos aminoácidos en las posiciones conocidas por ser próximas a, o tener interacciones con las CDR/sitio de unión a antígeno (Chothia y Lesk, trabajo citado; Chothia y col., trabajo citado, y Tramontano y col., trabajo citado), tanto basado en modelado informático (véanse Levy y col., Biochemistry trabajo citado; Brucoleri y col., trabajo citado; Chothia y col., trabajo citado), estructura cristalina, información publicada como experiencia previa, que son idénticos, o conservativamente similares a los de las FR parentales.

35

40 En el caso en el que no esté disponible una FR humana particular que satisfaga todo lo anterior, y la corrección directa produzca la pérdida de afinidad o especificidad, residuos murinos considerados por tener interacciones con el sitio de unión a antígeno, o contribuir a la afinidad final del anticuerpo, se introducirán de nuevo en la mejor FR disponible. Alternativamente, la FR particular sin homólogo humano de correspondencia será retenida y usada en su composición murina sin modificación; la secuencia de FR corregida final contendrá una mezcla de FR humanas y murinas. Para el fin de ilustración, dos anticuerpos anti-linfocitos B murinos serán de FR corregida usando el enfoque que se describe en el presente documento en la presente invención.

45

### EJEMPLO 1

#### 50 ANTICUERPO ANTI-CD22 DE FR CORREGIDA

Diseño de genes para cadena ligera y pesada anti-CD22 de FR corregida

La secuencia de cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-CD22 murino, RFB4 (Li y col., Cell Immunol. 118:85, 55 1989; Mansfield y col., Blood 90:2020-2026, 1997) se usa como ejemplo para ilustrar el enfoque de uso de corrección de FR para reducir o eliminar la inmunogenicidad del anticuerpo re-manipulado. Las secuencias de la región variable de la cadena pesada (a) y ligera (b) para el anticuerpo murino se muestran en la Figura 1.

La corrección de las FR individuales para la región variable de la cadena pesada para RFB4 se hizo del siguiente

modo:

a. FR1: la secuencia de FR1 de la VH murina se comparó con las secuencias de FR1 de VH humana de la base de datos de Kabat (Kabat y col., trabajo citado). Aunque se prefiere FR1 humana de la mayor homología de secuencias, se hizo énfasis particular en la secuencia más próxima a CDR1. Hay tres secuencias de FR1 que son de alta homología con la FR1 murina. Son, concretamente, EIK, RF-SJ1 y WAS. La FR1 con la mayor homología global con los cinco residuos más próximos a CDR1 idéntica a la murina parental es EIK, sin embargo, hay un residuo ausente en la posición 12, que puede crear posibles problemas que afectarían la inmunorreactividad del anticuerpo resultante. Por tanto, la FR1 preferida elegida para la corrección fue de WAS. Primero, excepto en la posición 28, el tercer residuo más próximo a CDR1, un tramo completo de 11 aminoácidos próximo a la CDR1, es idéntico al parental murino. En la posición 28 se encuentra un residuo de serina en lugar de una alanina en la secuencia murina. Como la serina se considera una versión hidroxilada de la alanina, el cambio es conservativo. Además, los residuos que son diferentes entre la humana y murina son de características relativamente similares. Por ejemplo, valina y leucina en la posición 5, lisina y glutamina en la posición 13, lisina y arginina en la posición 19 y alanina y serina en la posición 28. Por tanto, la secuencia humana de WAS se eligió para la corrección de la FR1 del anticuerpo anti-CD22 (Figura 2A).

b. FR2: se cogió por lo mismo y basándose en el grado de homología, la secuencia de WAS humana se elige para la corrección de FR2 del anticuerpo anti-CD22 (Figura 2A).

c. FR3: con las secuencias más próximas a CDR2, y siendo CDR3 idéntica, y el alto grado de homología, la secuencia de GAL humana se seleccionó para la corrección de FR3 del anticuerpo anti-CD22 (Figura 2A).

d. FR4: hay muchas FR4 humanas con la secuencia más próxima a la CDR3 que son idénticas, y un alto grado de homología con la parental murina. En este ejemplo, la secuencia de DOB humana se seleccionó para la corrección de la FR4 del anticuerpo anti-CD22 (Figura 2A).

El diseño final de la secuencia de VH de FR corregida (Figura 3A) para el anticuerpo anti-CD22 está compuesto por FR1 y FR2 de WAS humana, y FR3 de GAL y FR4 de DOB, sustituyendo las FR de VH originales del anticuerpo anti-CD22. No hay mutación simple o re-introducción de residuos de FR murinos en el diseño final de la secuencia de FR corregida.

Usando una estrategia similar, el diseño de secuencias para la cadena ligera (VL) de FR corregida se hizo del siguiente modo:

a. FR1: se eligió JOH humana para la corrección de FR1 de VL murina. Tiene un alto grado de homología de secuencias y el tramo de 8 aminoácidos adyacentes a las CDR1 es idéntico a la secuencia parental (Figura 2B).

b. FR2: se eligió Vd'CL humana para la corrección de FR2 de VL murina, por motivos similares. Más de 4 secuencias idénticas son adyacentes a CDR1 y CDR2 (Figura 2B).

c. FR3: se eligió WES humana para la corrección de FR3 de VL murina. FR3 tiene la secuencia más larga, y la homología de secuencias entre WES y FR3 murina es alta, siendo las secuencias flanqueantes de CDR2 y CDR3 idénticas (Figura 2B).

d. FR4: se eligió RZ humana para la corrección de FR4 de VL murina, por motivos similares (Figura 2B).

El diseño final de la secuencia de VH de FR corregida (Figura 3B) para el anticuerpo anti-CD22 está compuesto por FR1 de JOH, FR2 de Vd'CL, FR3 de WES y FR4 de RZ humanas, sustituyendo las FR de VL originales del anticuerpo anti-CD22. De nuevo, no hay mutación simple o re-introducción de residuos de FR murinos en el diseño final de la secuencia de FR corregida.

#### **Construcción de los genes de la cadena pesada y ligera de FR corregida**

Las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera diseñadas del anticuerpo de FR corregida se ensamblan por una combinación de síntesis de oligonucleótidos y PCR usando una variedad de procedimientos publicados (Leung y col., trabajo citado; Daugherty y col., trabajo citado; DeMartino y col., trabajo citado; Jones y col., trabajo citado).

Para construir la secuencia de la región variable de la cadena pesada de FR corregida (SEQ ID no. 1), la secuencia de ADN completa se divide en dos mitades: la mitad del extremo N y la mitad del extremo C. Ambas se construyen por separado por PCR y la secuencia de la región variable completa se forma uniendo las mitades del extremo N y C en el sitio KpnI.

5

La mitad del extremo N se construye del siguiente modo: un molde de N (SEQ ID no. 3) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (111-mero) que codifica los aminoácidos 14 - 50 de la región VH (SEQ ID no. 2). El molde es amplificado por PCR por dos cebadores:

10 El cebador de 5' (SEQ ID no. 4) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (57-mero) que codifica los aminoácidos 1 - 19 de la región VH. El extremo 3' del cebador se solapa con el extremo 5' del molde por 18 nucleótidos.

El cebador de 3' (SEQ ID no. 5) es un oligonucleótido de hebra no codificante sintético (48-mero) que codifica los  
15 aminoácidos 43 - 59. El cebador se solapa con el molde por 21 nucleótidos.

El molde de N (SEQ ID no. 3) se amplifica por PCR usando el conjunto de cebadores de 5' y 3' (SEQ ID no. 4 y 5) usando técnicas y procedimientos convencionales.

20 La mitad del extremo C se construye del siguiente modo: un molde de C (SEQ ID no. 6) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (132-mero) que codifica los aminoácidos 68 - 111 de la región VH (SEQ ID no. 2). El molde es amplificado por PCR por dos cebadores:

El cebador de 5' (SEQ ID no. 7) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (60-mero) que codifica los  
25 aminoácidos 55 - 74 de la región VH. El extremo 3' del cebador se solapa con el extremo 5' del molde por 21 nucleótidos.

El cebador de 3' (SEQ ID no. 8) es un oligonucleótido de hebra no codificante sintético (58-mero) que codifica los aminoácidos 105 - 123 de la región VH. El cebador y el molde se solapan por 21 nucleótidos.

30

El molde de C (SEQ ID no. 6) se amplifica por PCR usando el conjunto de cebadores de 5' y 3' (SEQ ID no. 7 y 8) usando técnicas y procedimientos convencionales.

Para la construcción del dominio VH de RFB4 de FR corregida de longitud completa, el molde de N (SEQ ID no. 3,  
35 111-mero), el molde de C (SEQ ID no. 6, 132-mero) y sus cebadores de 5' y 3' respectivos (SEQ ID no. 4 y 5 para el molde de N y SEQ ID no. 7 y 8 para el molde de C) se sintetizan en un sintetizador de ADN de Applied Biosystem 380B automatizado (Foster City, CA). Los oligonucleótidos se desalan pasando a través de una columna CHROMOSPIN-10™ (Clonetech, Palo Alto, CA). Los oligonucleótidos se ajustan a una concentración final de 20 µM. Un µl de oligonucleótidos de molde a diversas diluciones (10X, 100X, 1000X y 10000X, etc.) se mezcla con 5 µl de  
40 sus cebadores flanqueantes correspondientes en presencia de 10 µl de 10x tampón de PCR (KCl 500 mM, tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) y 5 unidades de ADN polimerasa AMPLITAQ™ (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA). Esta mezcla de reacción se ajusta a un volumen final de 100 µl y se somete a 30 ciclos de reacción de PCR que consisten en desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 50°C durante 1 minuto y polimerización a 72°C durante 1 minuto. Las mezclas de reacción de PCR se analizan bajo  
45 electroforesis en 2% de gel de agarosa. La mayor dilución del molde que da lugar a producto suficientemente abundante del tamaño adecuado se elegirá para procesamiento adicional.

Productos amplificados por PCR bicatenarios para los moldes de N y C se purifican en gel, se digieren con restricción con KpnI. El ADN bicatenario de N y C restringido se ligan en el sitio KpnI, y los productos ligados se  
50 someten a otra ronda de amplificación por PCR usando el cebador de 5' para el molde de N (SEQ ID no. 4) y el cebador de 3' para el molde de C (SEQ ID no. 8). El producto de PCR con un tamaño de ~350 se clona directamente en el vector de clonación TA (Invitrogen, San Diego, CA). La secuencia del fragmento clonado se confirma por el procedimiento de Sanger (Sanger y col., PNAS 74:5463-5467, 1977) que es idéntica a la secuencia de VH diseñada. La secuencia confirmada se usa para sustituir la secuencia de VH de un vector de expresión de la cadena pesada  
55 que contiene un promotor de IgH, un potenciador de Ig, una secuencia genómica de la región constante de IgG1 humana y un marcador de selección, gpt. El vector de expresión de la cadena pesada final se designa hpRFB4pSMh.

Para construir la secuencia de la región variable de la cadena ligera de FR corregida (SEQ ID no. 9), la secuencia de

la región variable VL de longitud completa se divide en dos mitades. Las mitades del extremo N y el extremo C se ensamblan por separado por PCR y se unen juntas por el sitio SpeI.

La mitad del extremo N se construye del siguiente modo: un molde de N (SEQ ID no. 11) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (108-mero) que codifica los aminoácidos 11 - 46 de la región VL (SEQ ID no. 10). El molde es amplificado por PCR por dos cebadores:

El cebador de 5' (SEQ ID no. 12) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (51-mero) que codifica los aminoácidos 1 - 17 de la región VL. El extremo 3' del cebador se solapa con el extremo 5' del molde por 21 nucleótidos.

El cebador de 3' (SEQ ID no. 13) es un oligonucleótido de hebra no codificante sintético (40-mero) que codifica los aminoácidos 40 - 53. El cebador se solapa con el molde por 18 nucleótidos.

15 El molde de N (SEQ ID no. 11) se amplifica por PCR usando el conjunto de cebadores de 5' y 3' (SEQ ID no. 12 y 13) usando técnicas y procedimientos convencionales.

La mitad del extremo C se construye del siguiente modo: un molde de C (SEQ ID no. 14) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (120-mero) que codifica los aminoácidos 59 - 98 de la región VL (SEQ ID no. 10). El molde es amplificado por PCR por dos cebadores:

El cebador de 5' (SEQ ID no. 15) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (49-mero) que codifica los aminoácidos 50 - 65 de la región VL. El extremo 3' del cebador se solapa con el extremo 5' del molde por 21 nucleótidos.

El cebador de 3' (SEQ ID no. 16) es un oligonucleótido de hebra no codificante sintético (48-mero) que codifica los aminoácidos 92 - 107 de la región VL. El cebador y el molde se solapan por 21 nucleótidos.

El molde de C (SEQ ID no: 14) se amplifica por PCR usando el conjunto de cebadores de 5' y 3' (SEQ ID no. 15 y 16) usando técnicas y procedimientos convencionales.

Para la construcción del dominio VL de RFB4 de FR corregida, el molde de N (SEQ ID no. 11, 108-mero), el molde de C (SEQ ID no. 14, 120-mero) y sus cebadores de 5' y 3' respectivos (SEQ ID no. 12 y 13 para el molde de N y SEQ ID no. 15 y 16 para el molde de C) se sintetizan en un sintetizador de ADN de Applied Biosystem 380B automatizado. Los oligonucleótidos se desalan pasando a través de una columna CHROMOSPIN-10™ (Clontech). Los oligonucleótidos se ajustan a una concentración final de 20 µM. Un µl de oligonucleótidos de molde a diversas diluciones (10X, 100X, 1000X y 10000X, etc.) se mezcla con 5 µl de sus cebadores flanqueantes correspondientes en presencia de 10 µl de 10x tampón de PCR (KCl 500 mM, tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) y 5 unidades de ADN polimerasa AMPLITAQ™ (Perkin Elmer). Esta mezcla de reacción se ajusta a un volumen final de 100 µl y se somete a 30 ciclos de reacción de PCR que consisten en desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 50°C durante 1 minuto y polimerización a 72°C durante 1 minuto. Las mezclas de reacción de PCR se analizan bajo electroforesis en 2% de gel de agarosa. La mayor dilución del molde que da lugar a producto suficientemente abundante del tamaño adecuado se elegirá para procesamiento adicional.

Los productos amplificados por PCR bicatenarios para los moldes de N y C se purifican en gel, se digieren con restricción con SpeI. El ADN bicatenario de N y C restringido se ligan en el sitio SpeI, y los productos ligados se someten a otra ronda de amplificación por PCR usando el cebador de 5' para el molde de N (SEQ ID no. 12) y el cebador de 3' para el molde de C (SEQ ID no. 16). El producto de PCR con un tamaño de ~ 320 se clona directamente en el vector de clonación TA (Invitrogen). La secuencia del fragmento clonado se confirma por el procedimiento de Sanger (Sanger, trabajo citado), que es idéntica a la secuencia de VL diseñada. La secuencia confirmada se usa para sustituir la secuencia de VL de un vector de expresión de la cadena ligera que contiene un promotor de IgH, un potenciador de Ig, una secuencia genómica de la región constante kappa humana y un marcador de selección, hyg. El vector de expresión de la cadena ligera final se designa hpRFB4pSMk.

## 55 Expresión y afinidad de anticuerpo de FR corregida

Los plásmidos de expresión hpRFB4pSMh y hpRFB4pSMk se linealizan y se co-transfectan en células Sp2/0 de ratón. Las células transfectadas con los plásmidos se seleccionan en presencia de ácido micofenólico y/o higromicina B conferidos por los genes gpt y hyg sobre los plásmidos mediante procedimientos convencionales. Las

células que sobreviven a la selección se prueban para la secreción de anticuerpo humano usando procedimientos de ELISA. Los clones que se identifican que están secretando anticuerpo humano se expanden para la producción en botellas rotatorias de 500 ml. Los anticuerpos se purifican usando columnas de proteína A convencionales. El anticuerpo purificado se analiza en un gel de SDS-PAGE bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras (resultados predichos mostrados en la Figura 4). La afinidad del anticuerpo de FR corregida (hpRFB4) se evalúa primero por citometría de flujo. Células Raji ( $5 \times 10^5$ ) se incuban con  $1 \mu\text{g}$  de tanto hpRFB4 purificado como RFB4 quimérico (cRFB4) en un volumen final de  $100 \mu\text{l}$  de PBS complementado con 1% de SBF y 0,01% (peso/volumen) de azida de sodio (PBS-FA). cRFB4 se diferencia de hpRFB4 en las secuencias de la región variable que se derivan directamente de la parental murina sin modificaciones. Las mezclas se incuban durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y se lavan tres veces con PBS para eliminar anticuerpos sin unir. Los niveles de unión de los anticuerpos a células Raji se evalúan mediante la adición de un anticuerpo específico para fragmento de Fc de cabra dirigido contra IgG1 humana marcada con FITC diluida 20 x (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en un volumen final de  $100 \mu\text{l}$  en PBS-FA, e incubando durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . La mezcla se lava tres veces con PBS y las intensidades de fluorescencia se miden por citometría de flujo activada por fluorescencia FACSCAN (Becton Dickinson, Bedford, MA) (resultados predichos mostrados en la Figura 5). Los resultados predichos indican que ambos anticuerpos se unen bien a células Raji con afinidad similar.

Para comparar la afinidad del anticuerpo antes y después de re-manipular las secuencias de VH y VL de RFB4 se realiza un ensayo de unión competitiva. La cantidad fija ( $10 \times$  dilución de disolución concentrada) de RFB4 conjugado con FITC (Ansell Corporation, Bayport, MN) se mezcla con concentraciones variables de tanto cRFB4 como hpRFB4. Las mezclas se añaden a células Raji en un volumen final de  $100 \mu\text{l}$  en PBS-FA y se incuban durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Después de lavar tres veces con PBS, las intensidades de fluorescencia de células Raji unidas a FITC-RFB4 se miden por FASCAN (Becton Dickinson, Bedford, MA). Los resultados predichos indican que la corrección de FR de la secuencia de RFB4 no tiene efectos significativos sobre la afinidad del anticuerpo re-manipulado (resultados predichos mostrados en la Figura 6).

## EJEMPLO 2

### ANTICUERPO ANTI-CD20 DE FR CORREGIDA

**Diseño de genes para cadena ligera y pesada anti-CD20 de FR corregida.**

La secuencia de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-CD20 murino, 1F5 (Ref), se usa como ejemplo para ilustrar el enfoque de uso de corrección de FR para reducir o eliminar la inmunogenicidad del anticuerpo re-manipulado. Las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera para el anticuerpo murino se muestran en la Figura (7).

En el diseño de la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina de FR corregida para 1F5 se aplica el mismo conjunto de reglas que se han descrito previamente. Sin embargo, siempre hay situaciones en las que FR no apropiadas satisfacen todos los requisitos anteriormente mencionados. El enfoque de corrección de FR ofrece un gran grado de flexibilidad que permite la introducción de residuos murinos en las FR problemáticas, o alternativamente, inclusión de las FR murinas originales sin modificaciones. El anticuerpo de FR corregida resultante tendrá supuestamente inmunogenicidad significativamente reducida en comparación con un anticuerpo murino o quimérico. Un anticuerpo anti-CD20, 1F5, se usa como ejemplo para corrección de FR para ilustrar estos puntos.

La corrección de las FR individuales de la secuencia de VH de 1F5 se hizo del siguiente modo:

a. FR1: la secuencia de FR1 de la VH murina se comparó con las secuencias de FR1 de VH humana de la base de datos de Kabat (Kabat y col., trabajo citado). Se prefirió FR1 humana de la mayor homología de secuencias, particularmente en las secuencias más próximas a CDR1. La secuencia de FR1 humana de LS2'CL tiene aproximadamente el 80% de homología de secuencias con la del anticuerpo anti-CD20 murino, y los 10 residuos adyacentes a las CDR1 son idénticos a la secuencia parental murina. Por tanto, la secuencia de FR1 humana de LS2'CL se eligió para la corrección de FR1 del anticuerpo anti-CD20 (Figura 8A)

b. FR2: la secuencia de FR2 de NEWM humana se eligió para la corrección de la secuencia de FR2 del anticuerpo anti-CD20. Debe observarse que, aunque el tercer residuo de la FR2 de NEWM está más próximo a CDR1, no es idéntico al de la secuencia parental murina, es una conversión conservada de K a R (Figura 8A).

c. FR3: no pudieron identificarse secuencias de FR3 de la cadena pesada humana con homología de secuencias

satisfactoriamente alta y secuencias idénticas adyacentes a las CDR2 y CDR3. Aunque la FR2 humana de 783C'CL presentó el 78% de homología de secuencias, los residuos que flanquean la CDR2 son drásticamente diferentes, a pesar de las diferencias que se conservan. Por ejemplo, K, A y L en las posiciones 57, 58 y 60 (numeración de Kabat, Kabat y col., trabajo citado) que son los 1º, 2º y 4º residuos más próximos a la CDR2 están sustituidos con los  
 5 residuos humanos conservados R, V y I, respectivamente. Sin embargo, el alto número de cambios en la proximidad de CDR2, no obstante conservativos, podría producir cambios conformacionales significativos en el sitio de unión a antígeno. Sin arriesgar a pérdida de afinidad, y como ilustración de la flexibilidad del enfoque de corrección de FR, FR3 no sería corregida con ninguna de las FR humanas. En su lugar, la secuencia de FR3 murina fue retenida en este anticuerpo particular (Figura 8A).

10

d. FR4: hay muchas FR4 humanas con la secuencia más próxima a CDR3 que son idénticas, y un alto grado de homología con la parental murina. En este ejemplo, la secuencia de 4G12'CL humana se seleccionó para la corrección de FR4 del anticuerpo anti-CD20 (Figura 8A).

15 El diseño final de la secuencia de VH de FR corregida (Figura 9A) para el anticuerpo anti-CD20 está compuesto por FR1 de LS2'CL humana, FR2 de NEWM, FR3 de 1F5 murina y FR4 de 4G12'CL, sustituyendo las FR de VH originales del anticuerpo anti-CD20 murino.

Un diseño alternativo será una VH corregida que contiene las CDR murinas incorporadas en FR1 de LS2'CL  
 20 humana, FR2 de NEWM, FR3 de 783C'CL y FR4 de 4G12'CL (Figura 10A). Para el fin de ilustración, la construcción de la anterior versión se ilustrará a continuación.

Usando una estrategia similar, el diseño de secuencias para la cadena ligera de FR corregida se construyó del siguiente modo:

25

a. FR1: se eligió BJ19 humana para la corrección de FR1 de la VL murina. Ésta es la secuencia de FR1 humana con la mayor homología con la parental murina (61%). Además, algunos de los residuos humanos que son diferentes de los de la murina están conservados. Por ejemplo, las conversiones de E a D, y K a R en las posiciones 18 y 19, respectivamente, son cambios conservados (Figura 8B).

30

b. FR2: aunque hay una FR2 humana, MOT, que se encontró que era de alta homología de secuencias (73%) para la FR2 murina, el triptófano en la posición 32 (numeración de Kabat, Kabat y col., trabajo citado), los 3º residuos más próximos a CDR2, se sustituyó con una valina no conservativa en la secuencia de FR2 de MOT. Esta sustitución podría tener posiblemente un efecto significativo sobre la conformación final del sitio de unión a antígeno. Por tanto,  
 35 se determinó que la FR2 murina del dominio VL permanecería en el diseño del anticuerpo de FR corregida (Figura 8B).

c. FR3: se eligió WES humana para la corrección de FR3 de la VL murina. FR3 tiene la secuencia más larga, y la homología de secuencias entre WES y la FR3 murina es del 71%, siendo los tres residuos humanos que flanquean  
 40 CDR2 y CDR3 idénticos a los de la murina (Figura 8B).

d. FR4: la secuencia de FR4 de  $\lambda$  humana de NIG-58 se eligió para la corrección de FR4 de la VL murina, por motivos similares. Las secuencias son el 72% homólogas al tramo de 7 residuos adyacente a CDR3 que es idéntico entre humana y murina (Figura 8B).

45

El diseño final de la secuencia de VL de FR corregida (Figura 9B) para el anticuerpo anti-CD20 está compuesto por FR1 de BJ19 de humana, FR2 de 1F5 murina, FR3 de WES y FR4 de NIG-58, sustituyendo las FR de VL originales del anticuerpo anti-CD20. Un diseño alternativo de VL de FR corregida estará compuesto por FR1 de BJ19 humana, FR2 de MOT, FR3 de WES y FR4 de NIG-58, formando el andamiaje que soporta los bucles de CDR (Figura 10B).

50 Para el fin de ilustración en la presente solicitud, sólo la construcción de la primera VL de FR corregida se describirá a continuación.

Construcción de los genes de la cadena pesada y ligera de FR corregida

55 Las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera diseñadas del anticuerpo de FR corregida se ensamblan por una combinación de síntesis de oligonucleótidos y PCR usando una variedad de procedimientos publicados.

Para construir la secuencia de la región variable de la cadena pesada de FR corregida (SEQ ID no. 17), la secuencia



de ADN completa se divide en dos mitades. La mitad del extremo N y la mitad del extremo C se construyen por separado por PCR y la secuencia de la región variable completa se forma uniendo las mitades del extremo N y C en el sitio SpeI.

- 5 La mitad del extremo N se construye del siguiente modo: un molde de N (SEQ ID no. 19) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (114-mero) que codifica los aminoácidos 12 - 49 de la región VH (SEQ ID no. 18). El molde es amplificado por PCR por dos cebadores:

10 El cebador de 5' (SEQ ID no. 20) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (57-mero) que codifica los aminoácidos 1 - 19 de la región VH. El extremo 3' del cebador se solapa con el extremo 5' del molde por 24 nucleótidos.

El cebador de 3' (SEQ ID no. 21) es un oligonucleótido de hebra no codificante sintético (55-mero) que codifica los aminoácidos 43 - 60. El cebador se solapa con el molde por 21 nucleótidos.

15 El molde de N (SEQ ID no. 19) se amplifica por PCR usando el conjunto de cebadores de 5' y 3' (SEQ ID no. 20 y 21) usando técnicas y procedimientos convencionales.

La mitad del extremo C se construye del siguiente modo: un molde de C (SEQ ID no. 22) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (126-mero) que codifica los aminoácidos 70 - 111 de la región VH (SEQ ID no. 18). El molde es amplificado por PCR por dos cebadores:

20 El cebador de 5' (SEQ ID no. 23) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (61-mero) que codifica los aminoácidos 57 - 76 de la región VH. El extremo 3' del cebador se solapa con el extremo 5' del molde por 21 nucleótidos.

25 El cebador de 3' (SEQ ID no. 24) es un oligonucleótido de hebra no codificante sintético (59-mero) que codifica los aminoácidos 105 - 123 de la región VH. El cebador y el molde se solapan por 21 nucleótidos.

30 El molde de C (SEQ ID no. 22) se amplifica por PCR usando el conjunto de cebadores de 5' y 3' (SEQ ID no. 23 y 24) usando técnicas y procedimientos convencionales.

35 Para la construcción del dominio VH de 1F5 de FR corregida, el molde de N (SEQ ID no. 19, 114-mero), el molde de C (SEQ ID no. 22, 126-mero) y sus cebadores de 5' y 3' respectivos (SEQ ID no. 20 y 21 para el molde de N y SEQ ID no. 23 y 24 para el molde de C) se sintetizan en un sintetizador de ADN de Applied Biosystem 380B automatizado. Los oligonucleótidos se desalan pasando a través de una columna CHROMOSPIN-10™ (Clontech). Los oligonucleótidos se ajustan a una concentración final de 20 µM. Un µl de oligonucleótidos de molde a diversas diluciones (10X, 100X, 1000X y 10000X, etc.) se mezcla con 5 µl de sus cebadores flanqueantes correspondientes en presencia de 10 µl de 10x tampón de PCR (KCl 500 mM, tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) y 5 unidades de ADN polimerasa AMPLITAQ™ (Perkin Elmer). Esta mezcla de reacción se ajusta a un volumen final de 40 100 µl y se somete a 30 ciclos de reacción de PCR que consisten en desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 50°C durante 1,5 minutos y polimerización a 72°C durante 1 minuto. Las mezclas de reacción de PCR se analizan bajo electroforesis en 2% de gel de agarosa. La mayor dilución del molde que da lugar a producto suficientemente abundante del tamaño adecuado se elegirá para procesamiento adicional.

45 Los productos amplificados por PCR bicatenarios para los moldes de N y C se purifican en gel, se digieren con restricción con el sitio KpnI. El ADN bicatenario de N y C se ligan en el sitio SpeI, y los productos ligados se someten a otra ronda de amplificación por PCR usando el cebador de 5' para el molde de N (SEQ ID no. 19) y el cebador de 3' para el molde de C (SEQ ID no. 22). El producto de PCR con un tamaño de ~ 350 se clona directamente en el vector de clonación TA (Invitrogen). La secuencia del fragmento clonado se confirma por el procedimiento de Sanger 50 (Sanger y col. trabajo citado), que es idéntica a la secuencia de VH diseñada. La secuencia confirmada se usa para sustituir la secuencia de VH de un vector de expresión de la cadena pesada que contiene un promotor de IgH, un potenciador de Ig, una secuencia genómica de la región constante de IgG1 humana y un marcador de selección, gpt. El vector de expresión de la cadena pesada final se designa hp1F5pSMh.

55 Para construir la secuencia de la región variable de la cadena ligera de FR corregida (SEQ ID no. 25), la secuencia de la región variable VL de longitud completa se divide en dos mitades. Las mitades del extremo N y el extremo C se ensamblan por separado por PCR y se unen juntas por el sitio BspEI.

La mitad del extremo N se construye del siguiente modo: un molde de N (SEQ ID no. 27) es un oligonucleótido de

hebra codificante sintético (129-mero) que codifica los aminoácidos 9 - 51 de la región VL (SEQ ID no. 26). El molde es amplificado por PCR por dos cebadores:

El cebador de 5' (SEQ ID no. 28) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (45-mero) que codifica los aminoácidos 1 - 15 de la región VH. El extremo 3' del cebador se solapa con el extremo 5' del molde por 21 nucleótidos.

El cebador de 3' (SEQ ID no. 29) es un oligonucleótido de hebra no codificante sintético (40-mero) que codifica los aminoácidos 45 - 57. El cebador se solapa con el molde por 21 nucleótidos.

10

El molde de N (SEQ ID no. 27) se amplifica por PCR usando el conjunto de cebadores de 5' y 3' (SEQ ID no. 28 y 29) usando técnicas y procedimientos convencionales.

La mitad del extremo C se construye del siguiente modo: un molde de C (SEQ ID no. 30) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (120-mero) que codifica los aminoácidos 61 - 100 de la región VH (SEQ ID no. 26). El molde es amplificado por PCR por dos cebadores:

15

El cebador de 5' (SEQ ID no. 31) es un oligonucleótido de hebra codificante sintético (43-mero) que codifica los aminoácidos 54 - 67 de la región VH. El extremo 3' del cebador se solapa con el extremo 5' del molde por 21 nucleótidos.

20

El cebador de 3' (SEQ ID no. 32) es un oligonucleótido de hebra no codificante sintético (42-mero) que codifica los aminoácidos 94 - 107 de la región VH. El cebador y el molde se solapan por 21 nucleótidos.

El molde de C (SEQ ID no. 30) se amplifica por PCR usando el conjunto de cebadores de 5' y 3' (SEQ ID no. 31 y 32) usando técnicas y procedimientos convencionales.

25

Para la construcción del dominio VL de 1F5 de FR corregida, el molde de N (SEQ ID no. 27, 129-mero), el molde de C (SEQ ID no. 30, 120-mero) y sus cebadores de 5' y 3' respectivos (SEQ ID no. 28 y 29 para el molde de N y SEQ ID no. 31 y 32 para el molde de C) se sintetizan en un sintetizador de ADN de Applied Biosystem 380B automatizado. Los oligonucleótidos se desalan pasando a través de una columna CHROMOSPIN-10™ (Clontech). Los oligonucleótidos se ajustan a una concentración final de 20 µM. Un µl de oligonucleótidos de molde a diversas diluciones (10X, 100X, 1000X y 10000X, etc.) se mezcla con 5 µl de sus cebadores flanqueantes correspondientes en presencia de 10 µl de 10x tampón de PCR (KCl 500 mM, tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) y 5 unidades de ADN polimerasa AMPLITAQ™ (Perkin Elmer). Esta mezcla de reacción se ajusta a un volumen final de 100 µl y se somete a 30 ciclos de reacción de PCR que consisten en desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 50°C durante 1,5 minutos y polimerización a 72°C durante 1 minuto. Las mezclas de reacción de PCR se analizan bajo electroforesis en 2% de gel de agarosa. La mayor dilución del molde que da lugar a producto suficientemente abundante del tamaño adecuado se elegirá para procesamiento adicional.

30

35

40

Los productos amplificados por PCR bicatenarios para los moldes de N y C se purifican en gel, se digieren con restricción con el sitio SpeI. El ADN bicatenario de N y C se ligan en el sitio BspEI, y se amplifican usando el cebador de 5' para el molde de N (SEQ ID no. 12) y el cebador de 3' para el molde de C (SEQ ID no. 16). El producto de PCR con un tamaño de ~ 320 se clona directamente en el vector de clonación TA (Invitrogen). La secuencia del fragmento clonado se confirma por el procedimiento de Sanger (Sanger y col., trabajo citado), que es idéntica a la secuencia de VL diseñada. La secuencia confirmada se usa para sustituir la secuencia de VL de un vector de expresión de la cadena ligera que contiene un promotor de IgH, un potenciador de Ig, una secuencia genómica de la región constante kappa humana y un marcador de selección, hyg. El vector de expresión de la cadena ligera final se designa hp1F5pSMk.

45

50

#### LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD:

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NATURALEZA DE LAS CADENAS: única  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (oligonucleótido) (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

5 RFB4 de FR corregida

VH:

10 Secuencia de ADNc de longitud completa (SEQ ID no. 1):

GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGA  
GGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAT  
CTATGACATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCACCGGGAAAGGGGCTGGA  
GTGGGTTCGCATACATTAGTAGTGGTGGTGGTACCACCTACTATCCA  
GACTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG  
AACTCCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGTGGAGGACACA  
GCCTTATATTACTGTGCAAGACATAGTGGCTACGGTAGTAGCTACG  
GGGTTTTGTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCT  
TCA

Secuencia de aminoácidos de longitud completa (SEQ ID no. 2):

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSIYDMSWVRQAPGKGLEW  
VAYISSGGGTYYPDYTKVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTALYY  
CARHSGYGSYGVLFAYWGQGTLVTVSS

Secuencia de ADN del molde de hebra codificante del extremo N (SEQ ID no. 3):

20 CCTGGAGGGTCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTT  
CAGTATCTATGACATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCACCGGGAAAGGG  
CTGGAGTGGGTCGCATAC

Cebador de 5' para el molde de N (SEQ ID no. 4)

25 GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGA  
GGGTCCCTGAGG

Cebador de 3' para el molde de N (SEQ ID no. 5)

GTAGGTGGTACCACCACCTACTAATGTATGCGACCCACTCCAGC  
CC

30 Secuencia de ADN del molde de hebra codificante del extremo C (SEQ ID no. 6):

TTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAAA  
TGAACAGTCTGAGGGTGGAGGACACAGCCTTATATTACTGTGCAAG  
ACATAGTGGCTACGGTAGTAGCTACGGGGTTTTGTTGCT

Cebador de 5' para el molde de C (SEQ ID no. 7)

35 GGTGGTACCACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCA  
TCTCCAGAGACAAT

Cebador de 3' para el molde de C (SEQ ID no. 8)

**TGAAGAGACAGTGACCAGAGTCCCTTGGCCCCAGTAAGCAAACAA  
AACCCCGTAGCT**

Sitio de unión: Kpnl

5 VK:

Secuencia de ADN de longitud completa (SEQ ID no. 9)

**GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGG  
AGACAGAGTCACCATTAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAA  
TTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGTAAGGCTCCGAAACTC  
CTGATCTACTACACTAGTATATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGT  
TCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAATTTACTCTCACCATTAGCTC  
CCTGCAGCCAGAAGATTTTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAAT  
ACGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGGTGAAAATCAA**

10

Secuencia de aminoácidos de longitud completa (SEQ ID no. 10)

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTISCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIY  
YTSILHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFG  
GGTKVEIK**

15 Secuencia de ADN del molde de hebra codificante del extremo N (SEQ ID no. 11)

**CTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTCACCATTAGTTGCAGGGCAA  
GTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGG  
TAAGGCTCCGAAACTC**

Cebador de 5' para el molde de N (SEQ ID no. 12)

20

**GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGG  
AGAC**

Cebador de 3' para el molde de N (SEQ ID no. 13)

**ATATACTAGTGTAGTAGATCAGGAGTTTCGGAGCCTTACC**

25

Secuencia de ADN del molde de hebra codificante del extremo C (SEQ ID no. 14)

**CCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAATTTACTCTCA  
CCATTAGCTCCCTGCAGCCAGAAGATTTTGCCACTTACTTTTGCCAA  
CAGGGTAATAÇGCTTCCGTGGACGTTT**

30 Cebador de 5' para el molde de C (SEQ ID no. 15)

**CTACACTAGTTATATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGC  
AGT**

Cebador de 3' para el molde de C (SEQ ID no. 16)

35

**TTTGATTTCACCTTGGTGCCTCCACCGAACGTCCACGGAAGCGTA  
TT**

Sitio de unión: Spel A∇CTAGΔT

1F5 quimérica de FR corregida

VH:

Secuencia de ADN de longitud completa (SEQ ID no. 17):

5  
CAGGTGCAACTGGTGGCTTCCGGGGCTGAGGTAAATAAGCCTGGG  
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCA  
GTTACAATATGCACTGGGTACGGCAGCCTCCTGGAAGGGGCCTGGA  
ATGGATTGGAGCTATTTATCCAGGAAATGGTGATACTAGTTACAAT  
CAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCC  
AGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGTCTGACATCTGAGGACTCTG  
CGGTCTATTACTGTGCAAGATCGCACTACGGTAGTAACCTACGTAGA  
CTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTGTTACAGTCTCCTCT  
GATCA

Secuencia de aminoácidos de longitud completa (SEQ ID no. 18):

10  
QVQLVASGAEVNKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQPPGRGLE  
WIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY  
YCARSHYGSNYVDYFDYWGQGTITVTVSSD

Secuencia de ADN del molde de hebra codificante del extremo N (SEQ ID no. 19):

15  
AATAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCT  
ACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTACGGCAGCCTCCTGG  
AAGGGCCTGGAATGGATTGGA

Cebador de 5' para el molde de N (SEQ ID no. 20)

CAGGTGCAACTGGTGGCTTCCGGGGCTGAGGTAAATAAGCCTGGG  
GCCTCAGTGAAG

20 Cebador de 3' para el molde de N (SEQ ID no. 21)

TGTAACTAGTATCACCATTTCTGGATAAATAGCTCCAATCCATTCC  
AGGCCCT

Secuencia de ADN del molde de hebra codificante del extremo C (SEQ ID no. 22):

25  
TTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCA  
GTCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGCA  
CTACGGTAGTAACCTACGTAGACTACTTTGACTAC

Cebador de 5' para el molde de C (SEQ ID no. 23)

30  
TGATACTAGTTACAATCAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACT  
GCAGACAAATCCTCC

Cebador de 3' para el molde de C (SEQ ID no. 24)

35  
TGATCAGAGGAGACTGTAACAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTAGTCAA  
AGTAGTCTACGTA

Sitio de unión: Spel

VK:

Secuencia de ADNc de longitud completa (SEQ ID no. 25):

GATATTCAACTCACACAGTCTCCATCAAGTCTTTCTGCATCTGTGGG  
GGACAGAGTCACAATTACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAGTTTC  
ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGGA  
TTTATGCCACATCCAACCTGGCTCCGGAGTCCCTAGTCGCTTCAGT  
GGCAGTGGGTCTGGGACCGAGTTCACTCTCACAATCAGCAGTTTGC  
AGCCTGAAGATTTGCGCACTTATTTCTGCCATCAGTGGAGTAGTAA  
CCCCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGACCGTTCTACGG

5

Secuencia de aminoácidos de longitud completa (SEQ ID no. 26):

DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASSLSFMHWYQQKPGSSPKPWIYA  
TSNLAGVPSRFRSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYFCHQWSSNPLTFGA  
GTKLTVLR

10 Secuencia de ADN del molde de hebra codificante del extremo N (SEQ ID no. 27):

TCAAGTCTTTCTGCATCTGTGGGGGACAGAGTCACAATTACTTGCA  
GGGCCAGCTCAAGTTTAAGTTTCATGCACTGGTACCAGCAGAAGCC  
AGGATCCTCCCCAAACCCTGGATTTATGCCACATCC

Cebador de 5' para el molde de N (SEQ ID no. 28):

15 GATATTCAACTCACACAGTCTCCATCAAGTCTTTCTGCATCTGTG

Cebador de 3' para el molde de N (SEQ ID no. 29):

GGACTCCGGAAGCCAGGTTGGATGTGGCATAAATCCAGGG

20 Secuencia de ADN del molde de hebra codificante del extremo C (SEQ ID no. 30):

TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCGAGTTCACTCTCACAATCAGCA  
GTTTGCAGCCTGAAGATTTGCGCACTTATTTCTGCCATCAGTGGAGT  
AGTAACCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGG

Cebador de 5' para el molde de C (SEQ ID no. 31):

25 GGCTCCGGAGTCCCTAGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG

Cebador de 3' para el molde de C (SEQ ID no. 32):

CCGTAGAACGGTCAGCTTGGTCCCAGCACCGAACGTGAGCGG

30 Sitio de unión: BspEI

## REIVINDICACIONES

1. Una inmunoglobulina que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 10, o una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 18 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 26.
2. La inmunoglobulina de la reivindicación 1, que comprende además una región constante de IgG1 humana y una región constante kappa humana.
3. Una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina según la reivindicación 1 ó 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un procedimiento para producir cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina anti-CD22 re-manipuladas o de región estructural (FR) corregida que tienen las secuencias de aminoácidos que se exponen en SEQ ID NOs: 2 y 10, respectivamente, como se define en la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- (a) dividir las secuencias de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina parental anti-CD22 y de inmunoglobulinas anti-CD22 humanas o de primate en subregiones compartimentalizadas de FR1, FR2, FR3, y FR4 según la clasificación de Kabat,
- (b) comparar las secuencias de aminoácidos de las secuencias de subregiones de la región estructural (FR) individuales en lugar de la región estructural completa de la inmunoglobulina parental anti-CD22 con las secuencias de la región estructural (FR) correspondientes seleccionadas de cadenas de inmunoglobulina humana o de primate;
- (c) seleccionar las secuencias de la región estructural (FR) humana o de primate para sustituir secuencias de la región estructural originales de subregiones FR1, FR2, FR3, FR4 de dicha inmunoglobulina parental, en el que la inmunoglobulina resultante comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que se expone en SEQ ID NO: y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que se expone en SEQ ID NO: 9,
- (d) ensamblar las secuencias de la región estructural seleccionada en la etapa (c),
- (e) subclonar las secuencias de la región estructural ensambladas de la etapa (d) en vectores de expresión de la cadena pesada y ligera que contienen secuencias de nucleótidos apropiadas de la cadena pesada y ligera constante de inmunoglobulina,
- (f) cotransfectar líneas celulares de producción con los vectores de expresión de la etapa (e),
- (g) cultivar las líneas celulares de la etapa (f) en condiciones que permiten la expresión y secreción de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina anti-CD22 re-manipulada o de regiones estructurales (FR) corregidas.
5. Un procedimiento para producir cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina anti-CD20 re-manipulada o de regiones estructurales (FR) corregidas que tienen las secuencias de aminoácidos que se exponen en SEQ ID NOs: 18 y 26, respectivamente, como se define en la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- (a) dividir las secuencias de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina parental anti-CD20 y de inmunoglobulinas anti-CD20 humanas o de primate en subregiones compartimentalizadas de FR1, FR2, FR3, y FR4 según la clasificación de Kabat,
- (b) comparar las secuencias de aminoácidos de las secuencias de subregiones de la región estructural (FR) individuales en lugar de la región estructural completa de la inmunoglobulina parental anti-CD20 con las secuencias de la región estructural (FR) correspondientes seleccionadas de cadenas de inmunoglobulina humana o de primate;
- (c) seleccionar las secuencias de la región estructural (FR) humana o de primate para sustituir secuencias de la región estructural originales de subregiones FR1, FR2, FR3, FR4 de dicha inmunoglobulina parental, en el que la

inmunoglobulina resultante comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que se expone en SEQ ID NO: 17 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que se expone en SEQ ID NO: 25,

5

(d) ensamblar las secuencias de la región estructural seleccionada en la etapa (c),

(e) subclonar las secuencias de la región estructural ensambladas de la etapa (d) en vectores de expresión de la cadena pesada y ligera que contienen secuencias de nucleótidos apropiadas de la cadena pesada y ligera constante de inmunoglobulina,

10

(f) cotransfectar líneas celulares de producción con los vectores de expresión de la etapa (e),

(g) cultivar las líneas celulares de la etapa (f) en condiciones que permiten la expresión y secreción de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina anti-CD20 re-manipulada o de regiones estructurales (FR) corregidas.

15

6. El procedimiento de la reivindicación 4 ó 5, en el que las líneas celulares de producción son células Sp2/0 de ratón.

20 7. El procedimiento de la reivindicación 4, 5 ó 6, en el que las secuencias de nucleótidos de la cadena pesada y ligera constantes de inmunoglobulina son la IgG1 humana y las secuencias de la región constante kappa humana, respectivamente.



**Figura 1. Las secuencias de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada (VH) (A) y la cadena ligera (VL) (B). Las CDR están recuadradas.**

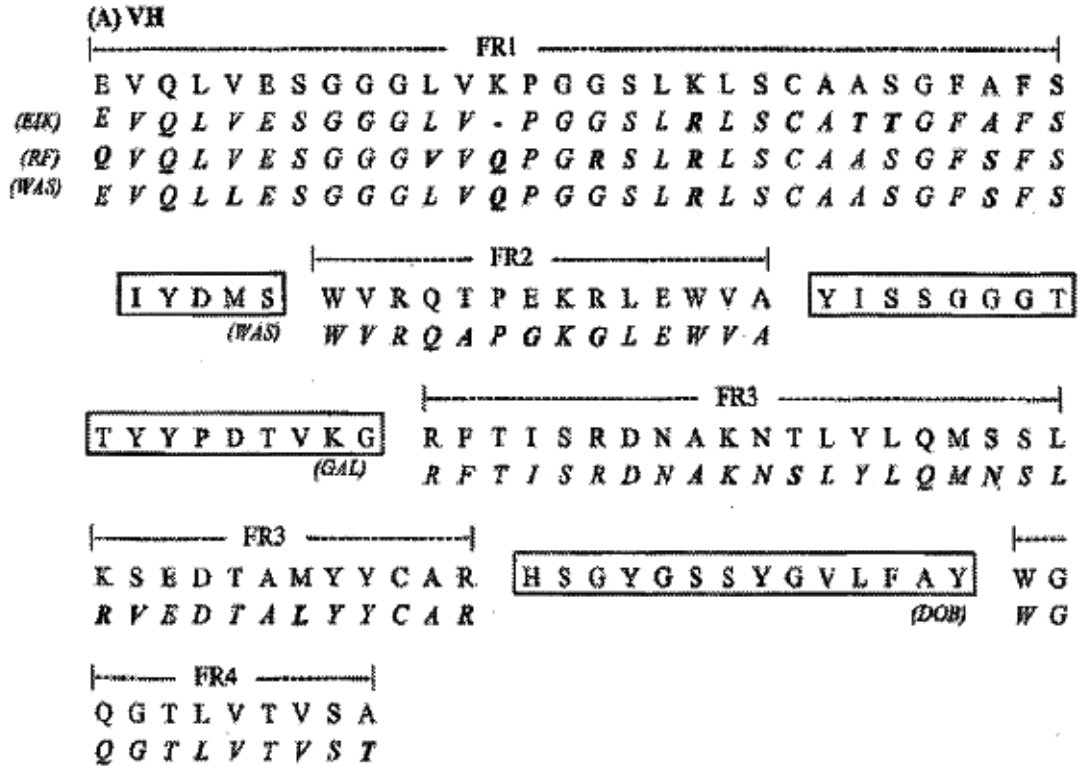
**(A) Secuencia de VH de RFB4**

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

**(B) Secuencia de VL de RFB4**

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

**Figura 2.** Se muestra una comparación de diferentes secuencias de la región estructural humana con las de RFB4. La fuente de la región estructural humana está indicada entre paréntesis a la izquierda de cada región estructural. Las CDR están recuadradas.



(B) VL

FR1

(JOH) D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I  
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I S C

FR2

S N Y L N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y T S I L H S  
(Vd'Cl) W Y Q Q K P G K A P K L L I Y

FR3

(WBS) G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D F A T Y  
G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y

FR4

F C Q Q G N T L P W T F G G G T K L E I K  
F C (R2) F G G G T K V E I K

**Figura 3. La secuencia de aminoácidos completa de la inmunoglobulina de RFB4 de FR corregida. Las CDR están recuadradas. Los aminoácidos de la región estructural humana que se diferencian de los de las regiones estructurales murinas correspondientes están en negrita.**

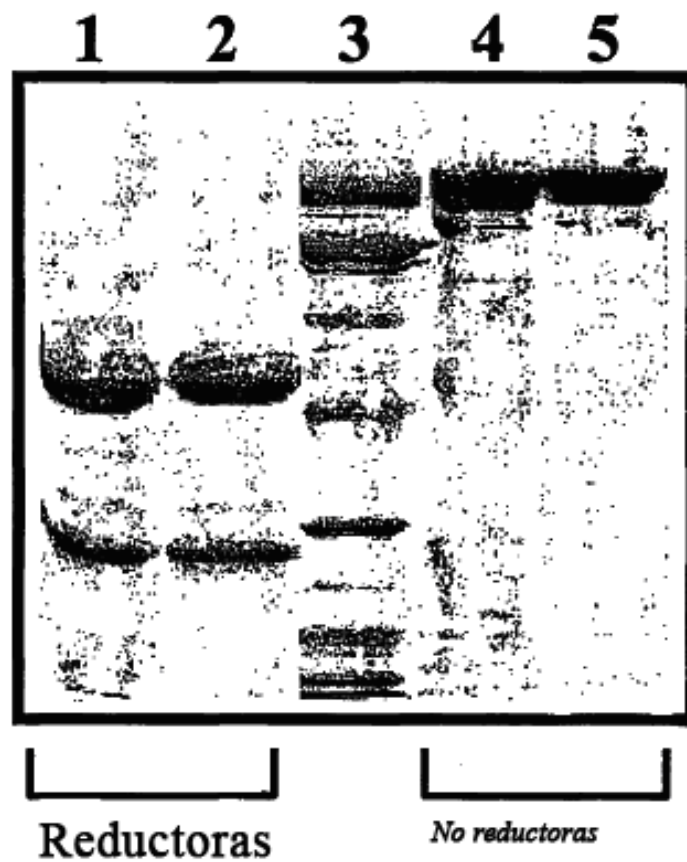
**(A) VH**

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

**(B) VL**

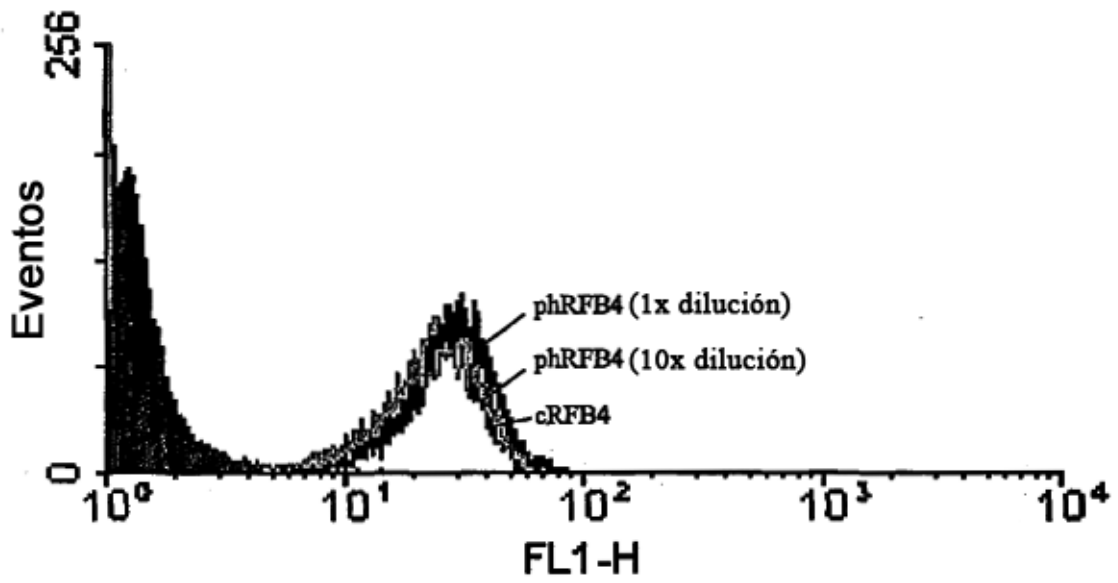
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I S C **R A S Q D I**  
**S N Y L N** W Y Q Q K P G K A P K L L I Y **Y T S I L H S**  
 G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y  
 P C **Q Q G N T L P W T** F G G G T K V E I K

**Figura 4. Análisis de SDS-PAGE de cRFB4 y hpRFB4 purificados bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras.**

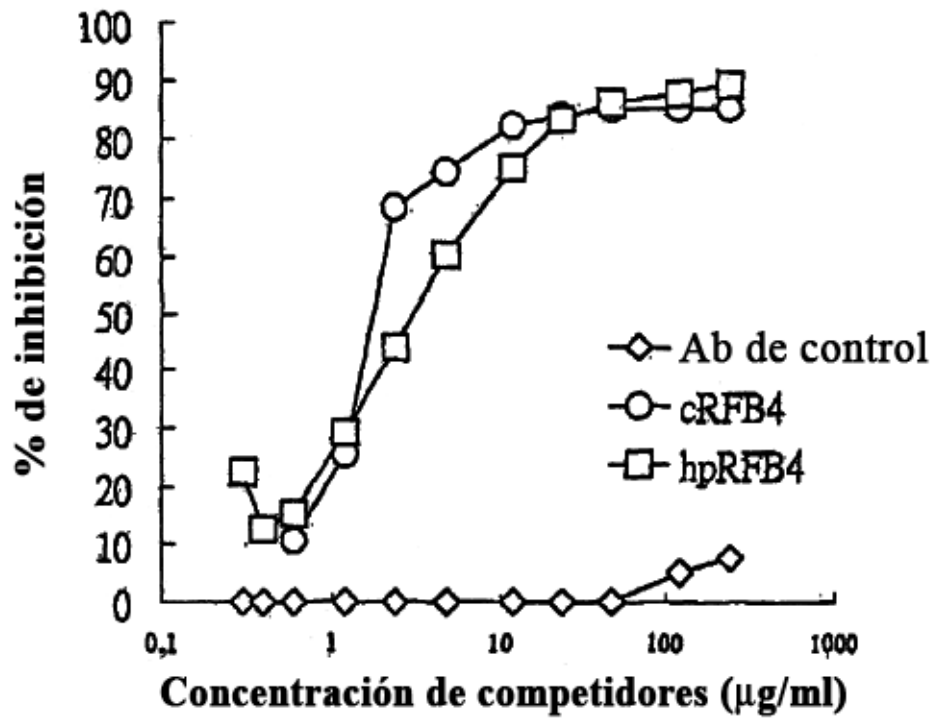


- 1. cRFB4 (reductoras)**
- 2. hpRFB4 (reductoras)**
- 3. Marcador de tamaño**
- 4. cRFB4 (no reductoras)**
- 5. hpRFB4 (no reductoras)**

**Figura 5. Análisis de citometría de flujo sobre la unión específica de cRFB4 y hpRFB4 a línea de células de linfoma de Burkitt humano, células Raji.**



**Figura 6. Un ensayo de comparación por competencia que compara la especificidad y afinidades de cRFB4 y hpRFB4. Como control se usó un anticuerpo irrelevante.**



**Figura 7. Las secuencias de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada (VH) (A) y la cadena ligera (VL) (B) del anticuerpo anti-CD20, 1F5. Las CDR están recuadradas.**

## (A) VH

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

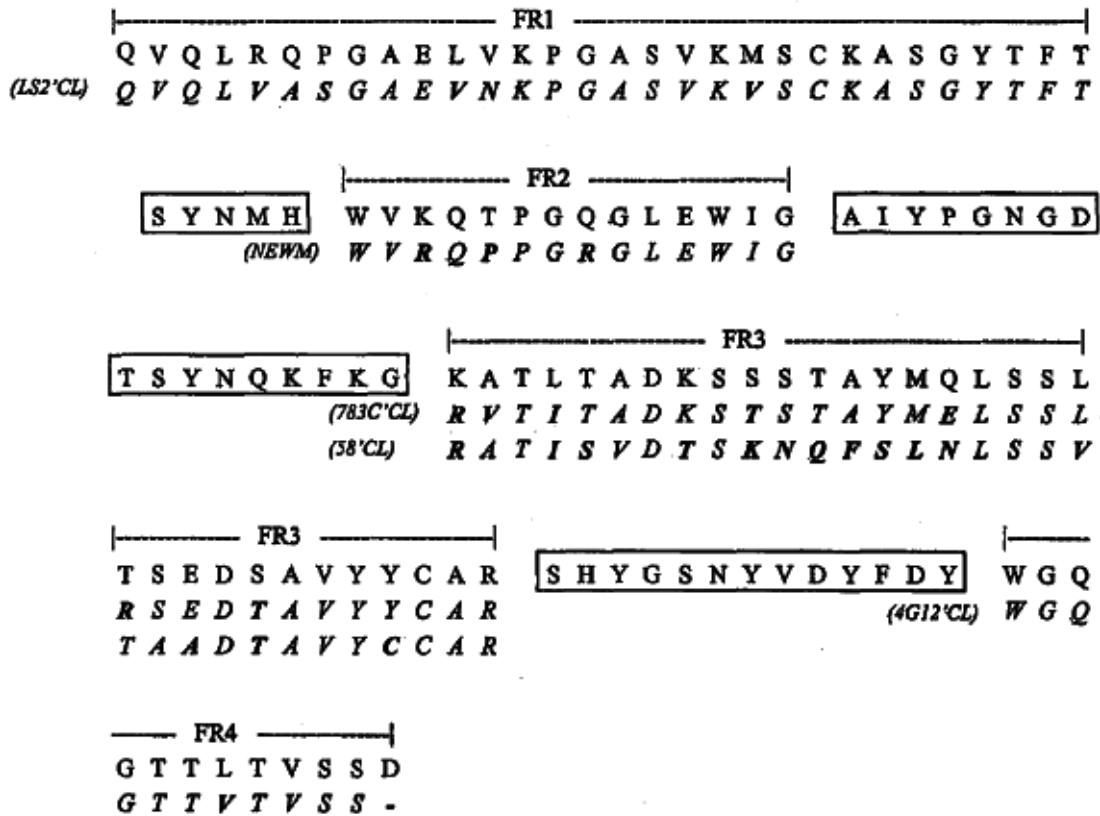
## (B) VL

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



Figura 8. Una comparación de diferentes secuencias de la región estructural con las de 1F5. El aminoácido que se diferencia de la región estructural parenteral se muestra en negrita. La fuente de la región estructural humana está indicada entre paréntesis a la izquierda de cada región estructural. Las CDR están recuadradas.

(A) VH



(B) VL

	----- FR1 -----	
	Q I V L S Q S P A I L S A S P G E K V T M T C	R A S S S L
(BJ19)	D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	
(6N1G)	N L M L I Q P P S - V S E S P G K T V T M T C	

	----- FR2 -----		
S F M H	W Y Q Q K P G S S P K P W I Y	A T S N L A S	G
(MOT)	W Y Q Q K P G Q A P V P V I Y		(WES) G
			(AND#) G
			(RZ) G
			(NOT) G

	----- FR3 -----
	V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R V E A B D A A T Y F
(WES)	V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y F
(AND#)	V P S R F S G S G S G T D F T L T I T S L Q P E D F A A Y F
(RZ)	V P S R F T G S G S G T D F F L T I S S L R P E D V A T Y F
(NOT)	V P A R F S G Y N S G N S A F L T I N R V E A G D E A D Y F

	----- FR4 -----	
C	H Q W S S N P L T	FGAGTKLELKR
C	(LS1'CL)	FGGGTKVEIKR
C	(NI)	FGVGSKVESKR
C	(NIG-58)	FGAGTKLTVLR
C		

**Figura 9. Las secuencias de aminoácidos para la región variable de FR corregida de la cadena pesada (VH) (A) y la cadena ligera (VL) (B) de 1F5. Las CDR están recuadradas. Los aminoácidos de la región estructural humana que se diferencian de los de las regiones estructurales murinas correspondientes están en negrita. Las regiones estructurales murinas que se retienen en las secuencias de FR corregida están subrayadas.**

**(A) VH**

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

**(B) VL**

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

**Figura 10. Secuencias de aminoácidos de un diseño alternativo de regiones variables de FR corregida para 1F5 (Diseño alternativo). Las CDR están recuadradas. Los aminoácidos de la región estructural humana que se diferencian de los de las regiones estructurales murinas correspondientes están en negrita.**

**(A) VH**

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

**(B) VL**

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