

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 886**

51 Int. Cl.:

C40B 50/06 (2006.01)

C40B 40/10 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2007 E 07863509 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2094728**

54 Título: **Métodos para la adaptación al ser humano de anticuerpos monoclonales**

30 Prioridad:

26.10.2006 US 863008 P

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

03.07.2013

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

CHEN, SHIZHONG y
ZHAO, SHANRONG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 410 886 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

Métodos para la adaptación al ser humano de anticuerpos monoclonales.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para seleccionar armazones de la región variable humana para la adaptación al ser humano de anticuerpos monoclonales no humanos, tales como anticuerpos de roedor.

10 **Antecedentes de la invención**

La adaptación de anticuerpos al ser humano es un término genérico que describe la obtención por ingeniería genética de anticuerpos monoclonales (AcMo) xenogénicos contra dianas terapéuticas humanas para reemplazar al máximo las secuencias xenogénicas con secuencias de anticuerpos humanos preservando al mismo tiempo sus especificidades de unión al antígeno. El objetivo es reducir la inmunogenicidad de estos anticuerpos para mejorar sus propiedades y valores terapéuticos. Los anticuerpos generados por ingeniería genética también son conocidos en la técnica como anticuerpos humanizados o con injerto de CDR.

El documento EE.UU. 2005/148001 da a conocer la construcción basada en la estructura de bibliotecas de anticuerpos humanos. Morea *et al.* (Biophysical Chemistry, 1997, volumen 68, páginas 9-16) se refiere a la estructura, predicción y rediseño de anticuerpos.

En la actualidad, la técnica más ampliamente utilizada para la adaptación de anticuerpos al ser humano se conoce como "injerto de CDR". La base científica de esta tecnología es que la especificidad de unión de un anticuerpo reside principalmente dentro de los tres bucles hipervariables conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR) de sus regiones variables de las cadenas pesada y ligera (regiones V), mientras que las regiones estructurales más conservadas (armazón, FW; región estructural, FR) proporcionan la función de soporte estructural. Al injertar las CDR en un FW seleccionado apropiadamente, parte o la totalidad de la actividad de unión al anticuerpo puede ser transferida al anticuerpo recombinante resultante. La primera demostración de la transferencia de la especificidad por el injerto de CDR fue para un nitrofenol hapteno (NP) (Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986)).

Dado que la metodología para definir las CDR ha sido bien establecida, la clave para el injerto de CDR es la selección del aceptor de anticuerpo humano más apropiado para el injerto. Se han desarrollado diversas estrategias para seleccionar aceptores de anticuerpos humanos con las similitudes más altas con las secuencias de aminoácidos de las CDR donadoras o del FW donador, o con las estructuras donadoras. Todas estas estrategias de "mejor ajuste", aunque parecen muy racionales, se basan, de hecho, en una suposición, es decir, que un anticuerpo recombinante resultante que es lo más similar posible (en la secuencia de aminoácidos o en la estructura) al anticuerpo original será el que mejor conserve la actividad de unión al antígeno original. Aunque todas estas estrategias se han aplicado con éxito para generar anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, Tempest *et al.*, Biotechnology 9:266-71 (1991), Gorman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185 (1991), Co *et al.*, J. Immunol. 152:2968-76 (1994)), la hipótesis subyacente nunca ha sido probada seriamente.

Un problema potencial de las estrategias de mejor ajuste es que los criterios de mejor ajuste son matemáticos, pero no necesariamente biológicos. El ajuste medido por el grado de homología, por ejemplo, es la suma de los valores numéricos asignados a restos de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos idénticos, homólogos y diferentes. Aunque estos valores asignados han sido validados en gran medida en muchos otros sistemas de evaluación de la homología, las sutiles diferencias que pueden no ser significativas para otros sistemas podrían ser importantes para calcular los mejores ajustes en la adaptación de anticuerpos al ser humano.

Un problema relacionado es, dados dos aceptores con grado de ajuste total idéntico o muy cercano para el donador, su ajuste local en las diferentes FR puede ser diferente. ¿Puede ser una región más importante que otra? ¿Cómo se va a determinar eso? En resumen, todavía no se ha validado un modelo matemático para satisfacer el requisito de calcular los mejores ajustes en la relación donador-aceptor en la obtención de anticuerpos por ingeniería genética.

Una complicación adicional se refiere a las interacciones entre las dos cadenas de un anticuerpo: un aceptor de cadena pesada de mejor ajuste y un aceptor de cadena ligera de mejor ajuste pueden no ajustarse entre sí para conservar del mejor modo la actividad de unión del donador. No hay ninguna herramienta disponible para evaluar el ajuste entre cadenas. Los investigadores han apareado las cadenas pesadas y ligeras de varios anticuerpos frente a un mismo epítipo para tratar de encontrar un mejor apareamiento. Sin embargo, esto no se ha intentado en la adaptación de anticuerpos al ser humano.

En teoría, se han secuenciado todas las secuencias de la línea germinal humana y están disponibles para la búsqueda de los FW de anticuerpo. Sin embargo, en la práctica, la mayoría de las regiones V humanas que se han utilizado hasta ahora en la humanización de anticuerpos son de genes de anticuerpos maduros, con frecuencia los

de las proteínas de mieloma. Es probable que contengan mutaciones somáticas. Estas mutaciones son únicas para el individuo del que provienen los genes reordenados, y por lo tanto serán vistos como extraños por otros individuos. Las secuencias de la base de datos de la línea germinal son más adecuadas para la humanización de anticuerpos desde esta perspectiva. Sin embargo, no están fácilmente disponibles secuencias de la base de datos de la línea germinal que codifiquen todo el FW para la humanización de anticuerpos, y sólo pueden generarse por combinación de secuencias puras de genes V y J.

Otro problema de la utilización de genes de anticuerpos maduros para el FW aceptor es que no todas las posibles combinaciones de V-J para la cadena ligera o las combinaciones V-D-J para la cadena pesada están representadas en los genes maduros. Por lo tanto, pueden surgir situaciones en las que un gen V muy coincidente esté unido a un segmento J que coincide mal. La humanización del anticuerpo monoclonal anti-Tac de ratón descrita por Queen *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)) es un ejemplo. La comparación de la región V_H de anti-Tac con la base de datos NBRF-PIR (<http://www.psc.edu/general/software/packages/nbrfpir/nbrf.html>) indicaba que la región V_H de la proteína de mieloma humano Eu tenía el grado más alto de homología (57% de identidad frente a VDJ_H). Sin embargo, el armazón 4 de la región V_H de Eu tiene varios aminoácidos, presumiblemente codificados por el segmento J_H de Eu, que son atípicos de los segmentos J_H humanos. Esto dio como resultado una mala coincidencia entre el armazón 4 de Eu y el de anti-Tac (figura 1). La comparación separada de la región J_H de anti-Tac (armazón 4 y el extremo proximal al armazón 4 de CDR3) con las secuencias de aminoácidos de los segmentos J_H humanos funcionales conocidos (de los cuales existen 6; véase la figura 2) indica que la J_H4 humana es una coincidencia mucho mejor que la J_H de Eu. Este ejemplo sugiere que las comparaciones separadas de los elementos V y J son más ventajosas que la comparación de todas las regiones variables entre las secuencias de anticuerpos de roedor y de ser humano. Actualmente, no está fácilmente disponible una herramienta para este tipo de comparación separada.

No todos los aminoácidos en las CDR están implicados en la unión al antígeno. Por lo tanto, se ha propuesto que el injerto de sólo aquellos restos que sean críticos en la interacción antígeno-anticuerpo - el llamado injerto de restos determinantes de especificidad (injerto de SDR) - aumentará adicionalmente el contenido de secuencias de anticuerpo humano en el anticuerpo recombinante resultante (Kashmiri *et al.*, Methods 36:25-34 (2005); Gonzales *et al.*, Mol. Immunol. 40:337-49 (2004)). La aplicación de esta estrategia requiere información sobre la estructura del anticuerpo, así como sobre los restos de contacto del anticuerpo-antígeno, que con frecuencia no está disponible. Aun cuando esta información esté disponible, no hay un método sistemático para identificar de forma fiable los SDR, y el injerto de SDR permanece hasta ahora en su mayor parte en el nivel de investigación básica.

Recientemente se ha desarrollado una estrategia novedosa llamada "barajado de armazón humano", (Dall'Acqua *et al.*, Methods 36:43-60 (2005)). Esta técnica funciona por ligación de fragmentos de ADN que codifican las CDR a fragmentos de ADN que codifican FR1, FR2, FR3, y FR4 humanas, generando así una biblioteca de todas las combinaciones entre las CDR donadoras y las FR humanas. Aunque esta estrategia se ha aplicado con éxito, existen dos problemas potenciales. En primer lugar, es probable que las FR del anticuerpo resultante, aun siendo todas de fuentes humanas, sean de FW no contiguos, y por lo tanto no naturales. Queda por ver si estos FW no naturales serán inmunogénicos en los seres humanos. En segundo lugar, la biblioteca, en teoría, puede ser prohibitivamente grande, e impone una alta demanda de recursos de ensayo y cribado.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos mejorados para preparar anticuerpos adaptados al ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las comparaciones de la región JH de anti-Tac.

La figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos del segmento JH humano.

La figura 3 muestra el diagrama de flujo del algoritmo de la biblioteca de armazones.

La figura 4 muestra desde el fragmento génico V, D, J hasta la FR/CDR variable.

La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada y las correspondientes FR/CDR para el AcMo anti-TLR3 murino 1068.

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera de 1068 y las correspondientes FR/CDR para el AcMo anti-TLR3 murino 1068.

La figura 7 muestra un alineamiento de las secuencias de la biblioteca de FW de la cadena pesada.

La figura 8 muestra un alineamiento de las secuencias de la biblioteca de FW de la cadena ligera.

La figura 9A, B, C y D muestra la unión de los AcMo anti-TLR3 adaptados al ser humano al hTLR3 en ensayos ELISA.

Resumen de la invención

Un aspecto de la invención es un método de selección de armazones de anticuerpos humanos para su uso en la preparación de un anticuerpo adaptado al ser humano, que comprende las etapas de:

a. obtener una secuencia peptídica de una región variable de un anticuerpo no humano;

- b. delimitar las secuencias peptídicas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y las regiones estructurales de la región variable no humana;
- c. construir una biblioteca de secuencias peptídicas para las regiones estructurales 1, 2, 3 y 4 del anticuerpo humano codificadas por los genes de la línea germinal humana;
- 5 d. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas humanas miembros de la biblioteca que tengan una longitud idéntica a las regiones estructurales del anticuerpo maduro no humano;
- e. comparar la similitud de secuencia de la región estructural de las secuencias peptídicas humanas seleccionadas con las secuencias peptídicas de las regiones estructurales no humanas;
- 10 f. comparar la compatibilidad de longitud de CDR1 y CDR2 entre las secuencias peptídicas humanas seleccionadas y las secuencias peptídicas de las regiones estructurales no humanas;
- g. seleccionar un segundo subconjunto de las secuencias peptídicas humanas seleccionadas, en el que las secuencias peptídicas seleccionadas tienen una similitud de región estructural superior a un valor "identity_threshold" y la suma de la diferencia de longitud de CDR1 y CDR2 es inferior o igual a un valor "CDR12_length_compatibility_threshold"; y
- 15 h. seleccionar armazones representativos del segundo subconjunto de la etapa g) en base a un valor "library_size" y un valor "framework_region_redundancy".

Otro aspecto de la invención es un método de preparación de un anticuerpo adaptado al ser humano, que comprende las etapas de:

- 20 a. obtener una secuencia peptídica de una región variable de un anticuerpo no humano;
- b. delimitar las secuencias peptídicas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y las regiones estructurales de la región variable no humana;
- 25 c. construir una biblioteca de secuencias peptídicas para las regiones estructurales 1, 2, 3 y 4 del anticuerpo humano codificadas por los genes de la línea germinal humana;
- d. seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas humanas miembros de la biblioteca que tengan una longitud idéntica a las regiones estructurales del anticuerpo maduro no humano;
- e. comparar la similitud de secuencia de la región estructural de las secuencias peptídicas humanas seleccionadas con las secuencias peptídicas de las regiones estructurales no humanas;
- 30 f. comparar la compatibilidad de longitud de CDR1 y CDR2 entre las secuencias peptídicas humanas seleccionadas y las secuencias peptídicas de las regiones estructurales no humanas;
- g. seleccionar un segundo subconjunto de las secuencias peptídicas humanas seleccionados en el que las secuencias peptídicas seleccionadas tienen una similitud de región estructural superior a un valor "identity_threshold" y la suma de la diferencia de longitud de CDR1 y CDR2 es inferior o igual a un valor "CDR12_length_compatibility_threshold";
- 35 h. seleccionar armazones representativos del segundo subconjunto de la etapa g) en base a un valor "library_size" y un valor "framework_region_redundancy"; y
- 40 i. construir una molécula quimérica que incluya cada una de las regiones CDR de la región variable no humana y las regiones estructurales de al menos un miembro de los armazones representativos de cadena pesada y ligera humanas seleccionados en la etapa h), en el que la molécula quimérica es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo adaptado al ser humano que se une al mismo antígeno que aquel al que se une el anticuerpo no humano.

45 Descripción detallada de la invención

Tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una cadena peptídica" es una referencia a una o más cadenas peptídicas e incluye sus equivalentes conocidos por los expertos en la materia.

50 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o el ensayo de la invención pueden utilizarse métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen los métodos ejemplares.

60 El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de anticuerpo o inmunoglobulina y a fragmentos de anticuerpo. En general, los anticuerpos son proteínas o polipéptidos que presentan especificidad de unión para un antígeno específico. Los anticuerpos intactos son glicoproteínas heterotetraméricas, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Por lo general, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro regularmente separados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena

pesada. Las cadenas ligeras del anticuerpo de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, a saber, kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

5 Las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales, a saber, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. IgA e IgG se subclasifican adicionalmente como los isotipos IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

10 Los anticuerpos son proteínas secretadas expresadas constitutivamente y secretadas por las células plasmáticas. Los anticuerpos también pueden producirse utilizando células plasmáticas inmortalizadas mediante métodos convencionales, tales como la generación de hibridomas o mediante transfección de los genes de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo en un linfocito B inmortalizado tal como una célula de mieloma o de otros tipos de células, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células vegetales y células de insecto.

15 La expresión "fragmentos de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias, tales como moléculas scFv en las que las cadenas ligera variable y pesada variable están conectadas como una sola cadena polipeptídica por un enlazador y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos.

20 Los anticuerpos humanizados, adaptados al ser humano y con injerto de CDR son anticuerpos monoclonales quiméricos que contienen las CDR de una especie no humana y regiones estructurales de la región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano.

25 La presente invención proporciona un método novedoso de adaptación de anticuerpos al ser humano. El método utiliza genes V y J de la línea germinal humana como fuente de secuencias de FW aceptoras, clasifica todas las FW aceptoras en base a la similitud de FW y otros criterios entre el anticuerpo no humano y las secuencias de la línea germinal humana, y genera una biblioteca de anticuerpos adaptados al ser humanos representativos (véase el diagrama de flujo de la figura 3). Más adelante se describen los algoritmos utilizados en el proceso de la invención.

1. Creación de la base de datos de FW humano virtual

35 Las secuencias génicas V y J de la línea germinal se descargaron de la base de datos VBase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). VBase es un directorio completo de todas las secuencias de la región variable de la línea germinal humana compiladas a partir de más de mil secuencias publicadas, incluidas las de las versiones actuales de las bibliotecas de datos de GenBank y EMBL. La base de datos se ha desarrollado durante varios años en el MRC Centre for Protein Engineering como una extensión del trabajo en la secuenciación y el mapeo de genes de anticuerpos humanos.

40 Un FW consiste en 4 regiones estructurales cortas (FR). Como se ve en la figura 4, FR1, FR2 y FR3 son codificadas por el fragmento génico V de la línea germinal, mientras que FR4 es codificada por el fragmento génico J de la línea germinal. En la base de datos VBase, cada gen V de la línea germinal se ha delimitado a las regiones FR y CDR. Con el fin de poner en práctica la estrategia de biblioteca de armazones de la invención, se creó una base de datos de FW virtual a partir de las secuencias génicas V y J. Cada registro de la base de datos de FW virtual consiste en 4 campos, es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4, y se genera por la combinación exhaustiva V/J de las FR. Por ejemplo, en la cadena pesada hay 6 fragmentos JH, pero codifican sólo 4 únicos fragmentos FR4 (debido a que JH1, JH4 y JH5 codifican la misma FR4), véase la figura 2. Los últimos 11 restos de cada secuencia JH corresponden a FR4. El apareamiento de todas las FR1-FR2-FR3 de los genes V de la línea germinal pesada con estas 4 únicas FR4 genera la base de datos de FW para la cadena pesada. La base de datos de FW para las cadenas ligeras kappa y lambda se generó de manera similar.

50 Existe un total de 666 registros en la base de datos de FW resultante, de los cuales 260 se generan a partir de las cadenas pesadas de la línea germinal, y 190 y 216 son de las cadenas ligeras kappa y lambda, respectivamente. No hay entradas redundantes en la base de datos de FW y cada registro FW es único.

2. Delimitación de una secuencia de anticuerpo a las FR y las CDR

60 La definición de CDR de Kabat, que se basa en la variabilidad de secuencia del anticuerpo, se utiliza comúnmente en la delimitación de secuencias. Por lo general también se aplican otras normas o patrones conocidos (<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>) para encontrar las CDR en una secuencia de anticuerpo, pero no es raro que muchas CDR de anticuerpo no se ajusten a los patrones. En comparación con las CDR, las FR están mucho más conservadas en términos de longitud y homología. En lugar de encontrar directamente las CDR, el método de la invención utiliza el algoritmo que se describe más adelante para identificar las FR y, en consecuencia, se deducen las CDR correspondientes (véase la figura 4 para la descomposición del anticuerpo en FR/CDR).

La base de datos de FW construida como se ha descrito anteriormente contiene las secuencias FR1, FR2, FR3 y FR4 para cada FW. Para obtener una determinada secuencia de anticuerpo y su FW de la línea germinal compatible, el algoritmo identifica las regiones estructurales (es decir, las secuencias FR1, FR2, FR3 y FR4) de la siguiente manera. Tomando FR2 como ejemplo, una ventana FR2 deducida a partir de la secuencia de la línea germinal humana se mueve a lo largo de la secuencia de anticuerpo empezando desde el primer resto, y se calcula la similitud de las secuencias en la ventana en cada posición de resto. Cuando la secuencia de la ventana FR2 coincide con su secuencia homóloga del anticuerpo, se observará un pico de alta similitud, identificándose así FR2. Del mismo modo, FR1, FR3 y FR4 se pueden encontrar en una manera similar. Este algoritmo es muy eficaz en la identificación de las regiones estructurales y es universalmente aplicable a cualquier secuencia de anticuerpo.

3. Homología basada en fragmentos y filtrado de base de datos de armazones novedosos

En el injerto de CDR, se sustituye un FW de anticuerpo donador de roedor con uno humano, y las CDR siguen siendo las mismas. Sin embargo, la longitud de cada FR en el anticuerpo de roedor debe ser compatible con la de la FR humana. Después de delimitar una secuencia de anticuerpo donadora a las regiones FR y CDR, se comparan sus FR con cada FW en la base de datos creada anteriormente. Esto genera una lista de FW clasificados por sus similitudes con el anticuerpo donador. El algoritmo de comparación de homología de la invención se detalla como se presenta a continuación.

En primer lugar, se comprueba la compatibilidad de longitud de FR entre las FR del anticuerpo no humano y las FR humanas y se selecciona un subconjunto de secuencias humanas que tienen una longitud idéntica a las FR no humanas. Por ejemplo, en FR1, siempre hay 30 restos en esta región de la cadena pesada, mientras que los números son siempre 22 y 23 para las cadenas lambda y kappa, respectivamente. Si un determinado anticuerpo es una cadena ligera kappa, sólo se pueden elegir los FW kappa en la base de datos; no es posible seleccionar un FW lambda puesto que las longitudes de FR1 entre el donador y el aceptor no son idénticas, a pesar de que es muy probable que la secuencia kappa donadora sea muy similar a una línea germinal lambda en su conjunto. Se espera que este novedoso algoritmo de comparación de homología reduzca significativamente los falsos positivos en la elección de los FW.

A continuación, si un FW aceptor pasa la comprobación de compatibilidad de longitud de FR, se cuenta el número de diferencias de resto entre los FW donadores y aceptores, y a continuación se calcula la similitud de secuencia global entre las secuencias de FW donadoras y aceptoras. Si la similitud es inferior a un valor umbral denominado valor "identity_threshold", el FW correspondiente se salta/omite. El "identity_threshold" es un parámetro especificado por el usuario, y los valores por defecto son de al menos un 60% para la cadena pesada y para la ligera. El fin de este parámetro es reducir el número de candidatos FW de manera que sólo los FW con una similitud razonable con el donador puedan ser seleccionados para el injerto de CDR.

A continuación, se comparan la compatibilidad de longitud de CDR1 y CDR2 entre las secuencias peptídicas humanas seleccionadas y las secuencias peptídicas de las regiones estructurales no humanas. Concretamente, se compara la longitud de CDR1 y se genera un valor que refleja el número de restos que difieren. Del mismo modo, se compara la longitud de CDR2 y se genera un valor similar. Los valores de la diferencia de longitud de CDR1 y CDR2 se suman para generar un valor de compatibilidad de longitud de CDR12. Se elimina el armazón que tiene su valor "CDR12_length_compatibility" superior a un valor "CDR12_length_compatibility_threshold". El valor "CDR12_length_compatibility_threshold" recomendado es de 0 ó 1.

Por último, se clasifican todos los FW candidatos identificados a partir de la comparación de longitud, la homología de secuencia y la comparación de longitud de CDR12 de la base de datos de FW virtual en base a la identidad de secuencia de FW de manera que el FW más homólogo ocupe el primer lugar.

4. Selección de FW representativos para el cribado

En determinadas circunstancias, puede resultar deseable cribar una biblioteca representativa más pequeña de FW candidatos en lugar de todo el conjunto de candidatos. En primer lugar, algunos FW son demasiado similares entre sí, incluso con una diferencia de un solo resto debido a la estrecha similitud intrínseca entre algunas secuencias de la línea germinal. En estas circunstancias, es razonable y beneficioso no incluir todos estos FW para el cribado, y elegir en cambio un FW representativo. En segundo lugar, los laboratorios húmedos pueden no tener la capacidad para cribar todos los FW combinados si la biblioteca resultante es demasiado grande. Por ejemplo, si se establecen los umbrales de similitud de FW en un 60% por defecto (para la cadena pesada) y un 70% por defecto (para la cadena ligera), se obtienen 75 y 80 FW candidatos para las cadenas pesada y ligera del AcMo anti-TLR3 de ratón, respectivamente (véanse las figuras 5 y 6 y el Ejemplo 1, *infra*). El número total de combinaciones de FW de HC/LC es 6.000, lo que plantea un gran desafío para el cribado en el laboratorio húmedo.

En la presente invención, se ha desarrollado un algoritmo para automatizar la selección de FW representativos, y generar una biblioteca de FW mucho más pequeña y menos redundante para el cribado. El usuario puede introducir el tamaño de la biblioteca de FW (número de miembros) y el criterio redundante de FW (Redundant_Threshold), y el

algoritmo compara automáticamente todos los FW candidatos y crea la biblioteca de FW acorde. La elección del criterio redundante de FW depende del número total de FW candidatos después de la comparación de homología y el tamaño deseado de la biblioteca de FW para el cribado. En la práctica, se recomienda una diferencia de 1 a 3 restos. El tamaño de la biblioteca de FW puede ser cualquier número entero, por ejemplo, de 4 a 20. A continuación se detallan los parámetros y las etapas del algoritmo.

Parámetros del algoritmo:

Candidate_FW_List: todos los FW candidatos después de la comparación de homología;

Output_FW_List: la lista de la secuencia de la biblioteca de FW;

Library_Size: el tamaño de la biblioteca de FW;

Redundant_Threshold: el criterio para considerar que dos FW son redundantes;

Active_FW: el FW elegido actual del diagrama de flujo *Candidate_FW_List*.

a. Compruebe el tamaño de *Candidate_FW_List*, vaya a la etapa f) si la lista está vacía;

b. Seleccione el primer FW de *Candidate_FW_List*,

i. establezca este FW a *Active_FW*;

ii. elimínelo de *Candidate_FW_List*;

iii. póngalo en *Output_FW_List*;

c. Compruebe el tamaño de *Output_FW_List*, vaya a la etapa f) si se alcanza *Library_Size*;

d. Cuento la diferencia de restos entre cada FW en *Candidate_FW_List* con *Active_FW*, elimine este FW de *Candidate_FW_List* si la diferencia es inferior a *Redundant_Threshold*;

e. Vaya a la etapa a)

f. Injerte las CDR del anticuerpo de roedor en cada FW en *Output_FW_List*, y deténgase.

Salida:

Una biblioteca de anticuerpos humanizados representativos.

Puede modificarse el algoritmo definido anteriormente para cambiar el tamaño de la biblioteca de FW para que coincida con la capacidad de cribado del laboratorio húmedo. Para las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos de roedor, se generarán respectivamente las correspondientes bibliotecas de FW, y se combinarán todas las cadenas pesadas y ligeras adaptadas al ser humano para su cribado. Por lo tanto, el algoritmo de la estrategia de biblioteca de FW global de la invención aumenta la probabilidad de encontrar pares favorables de las cadenas pesada y ligera humanas con las interacciones óptimas entre cadenas que son probablemente importantes para conservar la afinidad.

Un experto habitual en la técnica podría automatizar las etapas clave del algoritmo a través de la programación informática, tal como por ejemplo en el lenguaje Java orientado a objetos. Las funciones de importación/exportación útiles incluyen la capacidad de leer las secuencias de los anticuerpos de roedor en diversos formatos y escribir conjuntos de bibliotecas de FW en archivos FASTA planos o exportarlos a un archivo HTML u hoja de cálculo.

Después de la selección de pares favorables de armazones de las cadenas pesada y ligera humanas mediante los métodos de la invención, puede construirse una molécula quimérica que incluya cada una de las regiones CDR de la región variable no humana y las regiones estructurales de al menos un miembro de los armazones representativos de las cadenas pesada y ligera humanas seleccionados, en la que la molécula quimérica es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo adaptado al ser humano que se une al mismo antígeno que aquel al que se une el anticuerpo no humano. Para construir las moléculas quiméricas pueden utilizarse las técnicas de ADN recombinante bien conocidas por los expertos en la materia. A continuación pueden seleccionarse las moléculas quiméricas cribando cada molécula para detectar la afinidad de unión al antígeno y seleccionar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo óptimo adaptado al ser humano.

El método de la invención proporciona varias ventajas frente a las actuales técnicas de adaptación al ser humano. Por ejemplo, a diferencia de todas las demás estrategias basadas en la estructura, tales como el injerto de SDR, el método de la invención no requiere información detallada sobre la estructura de los anticuerpos o de los complejos antígeno-anticuerpo. Otra ventaja del método de la invención es que puede proporcionar varios anticuerpos humanizados comparables y sin embargo distintos, para el mismo donador de CDR. Esto resulta especialmente útil para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, que permite a los investigadores seleccionar un candidato principal y tener uno o más candidatos de seguimiento o de reserva.

Otra ventaja relacionada del método de la invención es que estos candidatos comparables, con sus distintas secuencias, pueden tener diferentes propiedades químicas, fisiológicas y farmacéuticas. Esto puede utilizarse en otros aspectos de la mejora terapéutica de anticuerpos. Por ejemplo, las CDR del anticuerpo con baja solubilidad pueden ajustarse a una biblioteca de armazones humanos, y puede seleccionarse entre los anticuerpos resultantes un buen ligante con solubilidad mejorada.

A continuación se describirá la presente invención con respecto a los siguientes ejemplos específicos no limitativos.

Ejemplo 1

5 Adaptación al ser humano de un anticuerpo monoclonal murino

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada (HC) y ligera (LC) del AcMo anti-TLR3 murino C1068 se enumeran en las figuras 5 y 6, respectivamente. La aplicación del algoritmo de la estrategia de humanización de la biblioteca de armazones de la invención analizado al AcMo C1068 generó un conjunto de bibliotecas de FW de 8 HC y 12 LC. Para el cribado inicial se escogieron 4 HC y 4 LC .

La similitud entre cada FW y AcMo C1068 se presenta en la Tabla 1. Los resultados indican que las 4 HC y las 4 LC son comparables en términos de similitud de secuencia global. El alineamiento de secuencias múltiples de las 4 HC demuestra que estos 4 FW son muy similares entre sí (figura 7), y esto también es cierto para las 4 FW de LC (véase la figura 8 para el alineamiento de secuencias de FW múltiples).

Tabla 1: Biblioteca de armazones para AcMo anti-TLR3 murino C1068

Biblioteca de FW de cadena pesada			Biblioteca de FW de cadena ligera		
Abr.	FW	Identidad (%)	Abr.	FW	Identidad (%)
HV1	VB_1-03/JH1	72	LV1	VB_O12/JK2	78
HV4	VB_1-02/JH1	71	LV3	VB_A30/JK2	77
HV5	VB_1-08/JH1	71	LV5	VB_A20/JK4	76
HV7	VB_1-69/JH2	71	LV7	VB_L1/JK2	76

Se expresaron dieciséis AcMo que representaban todas las posibles combinaciones de los constructos de la región variable de las cuatro cadenas pesadas y las cuatro cadenas ligeras. Todos los armazones de la región variable de la cadena pesada se expresaron con una región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana que tenía una sustitución de Ser por Pro en el resto 108 y sustituciones Phe114 y Leu115 por Ala; S228P, F234A y L235A en la cadena pesada de longitud completa. Todos los armazones de la región variable de la cadena ligera se expresaron utilizando una región constante K humana. Los anticuerpos se expresaron de manera transitoria en células de mamífero mediante la co-transfección de plásmidos que contenían las cadenas pesada y ligera apropiadas. Se purificaron los anticuerpos mediante purificación con proteína A convencional y se dializaron en PBS para la caracterización.

Se evaluaron los 16 AcMo para detectar la unión al dominio extracelular de TLR3 humano utilizando un formato ELISA en comparación con el AcMo murino parental C1068. En resumen, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos con dominio extracelular de TLR3 humano soluble y se incubaron los AcMo candidatos a diversas concentraciones (de 10-3 ng/ml a 103 ng/ml) y el anticuerpo unido se detectó con IgG-HRP anti-ratón de conejo para los isotipos IgG1 murina (Zymed, South San Francisco, CA) o IgG anti-humano marcado con HRP (Jackson 109-036-088) para los isotipos IgG4 humana. Se determinaron los valores de CE₅₀ y los resultados del cribado se muestran en la figura 9 y en la Tabla 2 que se presenta a continuación.

Tabla 2: Valores de CE₅₀ calculados para 16 AcMo combinatorios

CE ₅₀ ng/ml	HV1	HV4	HV5	HV7
LV1	29,2	29,1	15,5	1474,0
LV3	117,7	60,2	28,9	> 5000
LV5	27,7	18,7	13,7	1820,0
LV7	288,8	182,9	78,6	4258,0

La CE₅₀ calculada para C1068 fue 8 ng/ml; los resultados indicaban que 12 de los AcMo adaptados al ser humano presentaban una reducción 40 veces inferior de la EC₅₀ calculada en relación con el AcMo parental murino 1068. Los pares LV5/HV5, LV5/HV4 y LV1/HV5 son mejores que el par LV1/HV1 más homólogo en términos de afinidad.

Los datos sobre afinidad de la Tabla 2 y la figura 9 demuestran claramente que, al menos en el caso del anticuerpo anti-TLR3, la elección del mejor ajuste no es el mejor aceptor, y que las interacciones entre cadenas contribuyen a la afinidad del anticuerpo. Por lo tanto, el novedoso algoritmo y estrategia de biblioteca de armazones humanos de los solicitantes, desafía fundamentalmente el enfoque de mejor ajuste tradicional, y al mismo tiempo proporciona un enfoque experimental muy prometedor para la selección de aceptores para la humanización de anticuerpos.

Ahora que la presente invención ha sido descrita en su totalidad, resultará evidente para un experto habitual en la técnica que pueden realizarse a la misma muchos cambios y modificaciones sin alejarse de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTOCOR, INC.

5 <120> MÉTODOS PARA LA ADAPTACIÓN AL SER HUMANO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

<130> CEN5164PCT

<140> A CEDER

10 <141> 2007-10-25

<140> 60/863008

<141> 2006-10-26

15 <160> 10

<170> FastSEQ para Windows Versión 4. 0

<210> 1

20 <211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25

```

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

<210> 2

45 <211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

50

```

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50          55          60
Ser Glu Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65          70          75          80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe
 85          90          95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100          105
    
```

65

ES 2 410 886 T3

<210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Cadena pesada adaptada al ser humano HV1

<400> 3

10

```

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

30

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Cadena pesada adaptada al ser humano HV4

<400> 4

40

```

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

60

<210> 5
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65

<220>
 <223> Cadena pesada adaptada al ser humano HV5

ES 2 410 886 T3

<400> 5

```

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

```

25 <210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cadena pesada adaptada al ser humano HV7

<400> 6

```

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

```

55 <210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Cadena pesada adaptada al ser humano LV1

<400> 7

ES 2 410 886 T3

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

15
 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> Cadena pesada adaptada al ser humano LV3

25
 <400> 8

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

40
 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <223> Cadena pesada adaptada al ser humano LV5

50
 <400> 9

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

ES 2 410 886 T3

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Cadena pesada adaptada al ser humano LV7

<400> 10

10

```

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

20

25

```

           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100           105
    
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de selección de armazones de anticuerpos humanos para su uso en la preparación de un anticuerpo adaptado al ser humano, que comprende las etapas de:
- 6 a) obtener una secuencia peptídica para una región variable de un anticuerpo no humano;
 - 7 b) delimitar las secuencias peptídicas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y las regiones estructurales de la región variable no humana;
 - 8 c) construir una biblioteca de secuencias peptídicas para las regiones estructurales 1, 2, 3 y 4 del anticuerpo humano, codificadas por los genes de la línea germinal humana;
 - 9 d) seleccionar un subconjunto de secuencias peptídicas humanas miembros de la biblioteca que tengan una longitud idéntica a la de las regiones estructurales del anticuerpo maduro no humano;
 - 10 e) comparar la similitud de secuencia de las regiones estructurales de las secuencias peptídicas humanas seleccionadas con las secuencias peptídicas de las regiones estructurales no humanas;
 - 11 f) comparar la compatibilidad de longitud de CDR1 y CDR2 entre las secuencias peptídicas humanas seleccionadas y las secuencias peptídicas de las regiones estructurales no humanas;
 - 12 g) seleccionar un segundo subconjunto del subconjunto de secuencias peptídicas humanas seleccionadas de la etapa d); en la que las secuencias peptídicas seleccionadas tienen una similitud de secuencia de las regiones estructurales superior a un valor "identity_threshold", y la suma de la diferencia de longitud de CDR1 y CDR2 es inferior o igual a un valor "CDR12_length_compatibility_threshold", en el que dicho valor "CDR12_length_compatibility_threshold" es 0 ó 1; y
 - 13 h) seleccionar los armazones representativos del segundo subconjunto de la etapa g) en base a un valor "library_size" y un valor "framework_region_redundancy", en el que dicho valor "framework_region_redundancy" es de 1 a 3.
- 14 2. Método de preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo adaptado al ser humano, que comprende el método según la reivindicación 1 y que comprende adicionalmente la etapa de:
- 15 i) construir una molécula quimérica que incluya cada una de las regiones CDR de la región variable no humana y las regiones estructurales de al menos un miembro de los armazones representativos de la cadena pesada y ligera humanas seleccionados en la etapa h), en el que la molécula quimérica es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo adaptado al ser humano que se une al mismo antígeno que aquel al que se une el anticuerpo no humano.
- 16 3. Método según la reivindicación 2, que comprende adicionalmente la etapa de:
- 17 j) cribar cada combinación para detectar la afinidad de unión al antígeno y seleccionar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo óptimo adaptado al ser humano.
- 18 4. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el valor "identity_threshold" es de al menos un 60% para los armazones de la cadena pesada y ligera.
- 19 5. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el valor "library_size" es de 4 a 20.

Fig. 1

	Eu	SPE	EYNGGLVTVSS
anti-Tac de ratón	FDY	WGQGTTLTVSS	
J _H 4 humana	FDY	WGQGTTLVTVSS	
anti-Tac humanizada	FDY	WGQGTTLVTVSS	
	CDR3		FW4

Fig. 2

J_H1	AEYFQHWGQGTLVTVSS
J_H2	YWYFDLWGRGTLVTVSS
J_H3	AFDVWGQGTMTVTVSS
J_H4	YFDYWGQGTTLVTVSS
J_H5	NWFDSWGQGTTLVTVSS
J_H6	YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS

Fig. 3

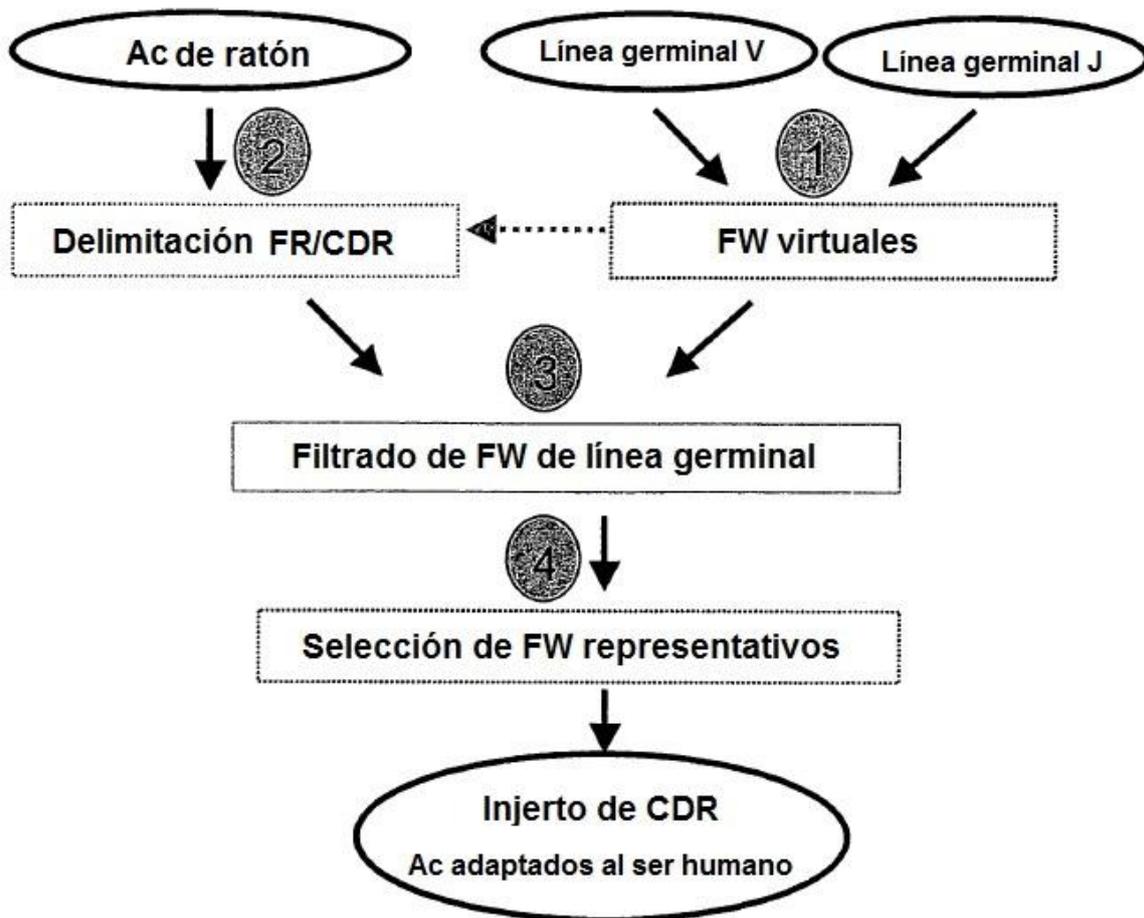


Fig. 4

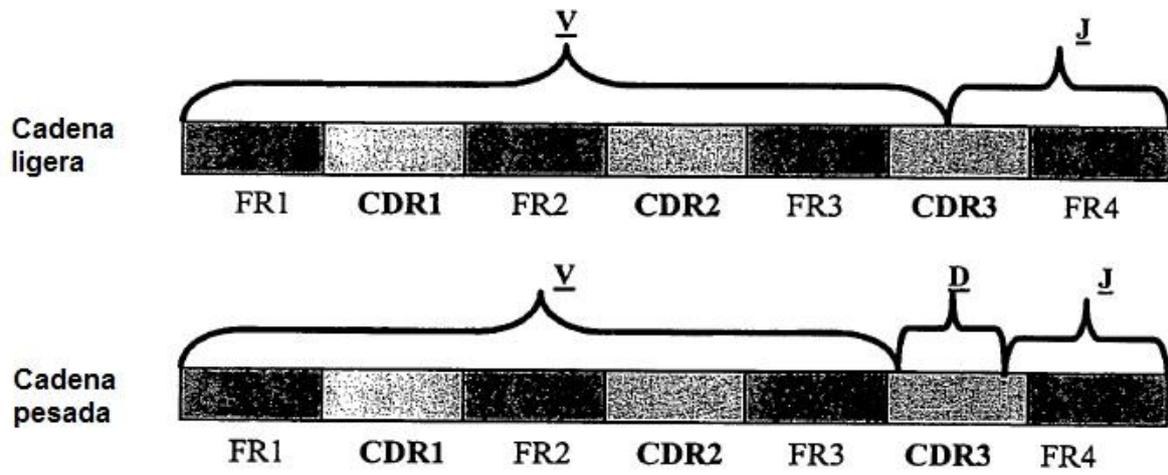


Fig. 5

Secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena pesada de 1068

MGWSYIILFLVATATDVHSQVQLQQPGAELVQPGTSVRLSCKASGYIFTTYWIHWVKQRPGQGLEWIG
INPNNGRINYNEKFKTKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRVGVMITTFPYWGQGLTVTSA

FR1: QVQLQQPGAELVQPGTSVRLSCKASGYIFT

CDR1: TYWIH

FR2: WVKQRPGQGLEWIG

CDR2: EINPNNGRINYNEKFKT

FR3: KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTR

CDR3: VGVMITTFPY

FR4: WGQGLTVTSA

Fig. 6

Secuencia de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera de 1068
MSVLTQVLALLLLWLTGARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQGKSPQLLVY
NAKTLADGVPSRFGSGSESGTQYSLKINSLQPEDFGSYYCQHFWSPTFTFGSGTKLELK

FR1: DIQMTQSPASLSASVGETVTITC
CDR1: RASGNIHNYLA
FR2: WYQQKQGKSPQLLVY
CDR2: NAKTLAD
FR3: GVPSRFGSGSESGTQYSLKINSLQPEDFGSYYC
CDR3: QHFWSPTFT
FR4: FGSGTKLELK

Fig. 7

	----- FR1 -----	----- FR2 -----
HV1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	WVRQAPGQRLEWVG
HV4G.....
HV5T..G.....
HV7S.....G..SG.....
	----- FR3 -----	----- FR4 -----
HV1	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	WGQGTLLTVSS
HV4	...M....I.....R..D.....
HV5	...M..N..I.....
HV7A.E.T.....	..R.....

Fig. 8

	----- FR1 -----	----- FR2 -----
LV1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	WYQQKPGKAPKLLIY
LV3R...
LV5V.....
LV7F.....S...
	----- FR3 -----	----- FR4 -----
LV1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	FGQGTKLEIK
LV3E.....
LV5V.....	..G..V...
LV7

Fig. 9A

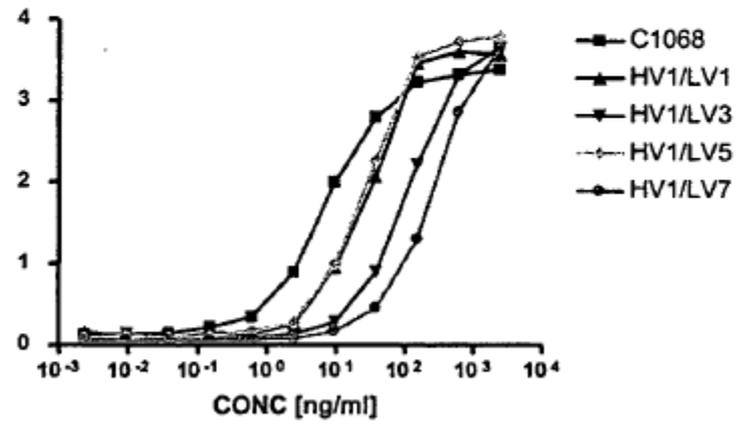


Fig. 9B

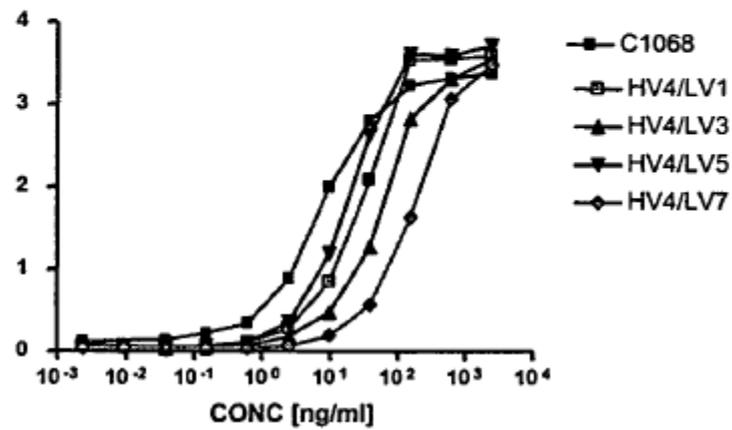


Fig. 9C

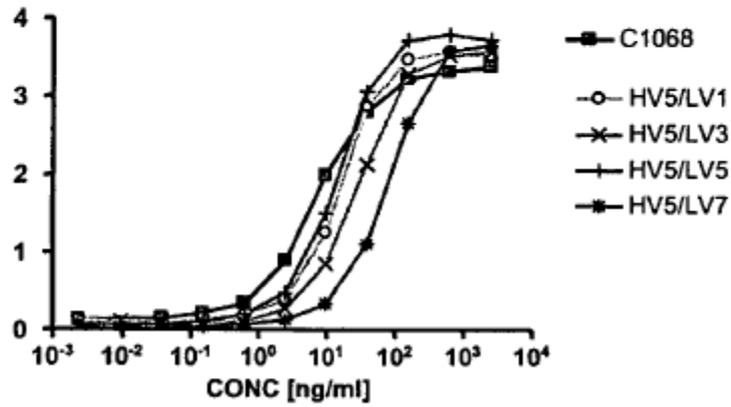


Fig. 9D

