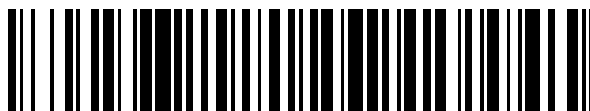


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 133**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 14/815 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2006 E 06709606 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1844074**

54 Título: **Anticuerpos y proteínas humanas**

30 Prioridad:

03.02.2005 GB 0502201

16.02.2005 GB 0503190

05.04.2005 GB 0506945

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2013

73 Titular/es:

**ANTITOPE LIMITED (100.0%)
BABRAHAM INSTITUTE BABRAHAM
CAMBRIDGE, GB**

72 Inventor/es:

**JONES, TIMOTHY DAVID y
BAKER, MATTHEW PAUL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 417 133 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

Anticuerpos y proteínas humanas.

5 La presente invención se refiere a métodos para escrutar regiones variables de anticuerpos compuestos o fragmentos que se unen a antígeno, para evitar epítomos de linfocitos T cooperadores. Los métodos comprenden escrutar genotecas que codifican regiones variables de anticuerpos compuestos. Tales métodos permiten la generación de anticuerpos y proteínas para uso como agentes farmacéuticos en humanos o como agentes de diagnóstico *in vivo*.

10 En los últimos 20 años se han visto grandes avances en la generación de anticuerpos monoclonales recombinantes para uso como potenciales agentes farmacéuticos en el hombre. Las técnicas de quimerización, humanización y clonación de anticuerpos humanos, ya sea por la presentación en fagos o en ratones transgénicos, han proporcionado anticuerpos que generalmente se toleran bien cuando se administran al hombre, con menos inmunogenicidad que con anticuerpos monoclonales no humanos. Sin embargo, se ha demostrado que diversos anticuerpos generados por estas técnicas inducen inmunogenicidad en pacientes, incluso cuando los orígenes genéticos de tales anticuerpos son humanos. Por ejemplo, el anticuerpo humano Humira® provoca inmunogenicidad en el 12% de los pacientes con artritis reumatoide y el anticuerpo humanizado CAMPATH® provoca inmunogenicidad en aproximadamente el 50% de los pacientes. Tal inducción de la inmunogenicidad es debida probablemente a la presencia, dentro de la región variable del anticuerpo, de tramos de secuencias de aminoácidos que no son propios que en algunos casos, pueden crear epítomos de linfocitos T que inducen respuestas de linfocitos T que dan como resultado una inmunogenicidad. Por lo tanto, existe una necesidad de mejorar las técnicas y las composiciones de anticuerpos que tienen un origen humano elevado, pero que evitan, tanto como sea posible, la creación de secuencias que puedan inducir respuestas de linfocitos T.

20 La presente invención proporciona un escrutinio mediante el cual se escrutan regiones variables de anticuerpos compuestos o fragmentos de las mismas que se unen a antígeno, que combinan dos o más péptidos de una secuencia de aminoácidos de 2 a 31 aminoácidos de longitud.

25 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para escrutar una región variable de un anticuerpo compuesto o un fragmento que se une a antígeno para evitar epítomos de linfocitos T cooperadores, en donde el método comprende las siguientes etapas:

30 generar una genoteca que codifica regiones variables de anticuerpos compuestos o fragmentos que se unen a antígeno obtenidos a partir de múltiples péptidos con una secuencia de aminoácidos de 2 a 31 aminoácidos de longitud, procedentes de otros anticuerpos o fragmentos que se unen a antígeno, en donde los dos o varios péptidos no son ni CDRs completas ni regiones estructurales completas;

escrutar la región variable del anticuerpo o de un fragmento que se une a antígeno para evitar epítomos de linfocitos T cooperadores; y

35 expresar y escrutar la genoteca de regiones variables de anticuerpos o fragmentos que se unen a antígeno para determinar la unión a uno o a varios antígenos de interés.

40 En el contexto de la presente invención, los péptidos son una secuencia de aminoácidos contiguos que se encuentra dentro de una molécula de anticuerpo, teniendo tales péptidos una longitud de 2 a 31 aminoácidos en donde tales péptidos no son ni CDRs completas ni regiones estructurales completas. Para uso terapéutico, las regiones variables de anticuerpos compuestos típicamente combinarán dos o varios péptidos de una secuencia de aminoácidos procedente de diferentes anticuerpos humanos, dentro de las regiones variables compuestas. En particular, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos compuestos (VH y VL, respectivamente), en donde cada VH y VL se compone enteramente de segmentos de secuencias procedentes de dos o varias regiones variables de anticuerpos humanos y en donde típicamente cada VH y VL compuesta incluye segmentos de posiciones de la secuencia de la región variable humana, correspondientes a sus posiciones en las VHs y VLs de los anticuerpos humanos originarios, por ejemplo, los aminoácidos 1 a 10 en la secuencia de VH compuesta se habrán obtenido a partir de los aminoácidos 1 a 10 de un anticuerpo humano. Como alternativa, los segmentos de la secuencia VH o VL humana en la región variable del anticuerpo compuesto pueden estar situados en cualquier posición de la secuencia, independientemente de la posición de la secuencia en la VH o VL del anticuerpo humano originario. Las VHs y VLs del anticuerpo humano originario pueden ser cualquier secuencia de aminoácidos de la región variable de un anticuerpo humano existente, por ejemplo, como las que se proporcionan en bases de datos de secuencias de regiones variables de anticuerpos monoclonales humanos, y pueden incluir secuencias procedentes de anticuerpos madurados por afinidad con mutaciones somáticas en la región variable y otras variaciones que difieren de la línea germinal, secuencias procedentes de regiones variables de la línea germinal, secuencias procedentes de regiones variables de anticuerpos contruidos de forma artificial, creadas a partir de segmentos de una secuencia procedente de anticuerpos de tipos tales como anticuerpos con un conjunto de estructuras fijas de la región variable pero con CDRs variables, secuencias seleccionadas a partir de genotecas de anticuerpos humanos, tales como genotecas de presentación en fagos, y secuencias de anticuerpos humanos obtenidos a partir de animales transgénicos que expresan genes que codifican anticuerpos humanos o fragmentos

de anticuerpo.

Los epítomos de linfocitos T humanos en el contexto de la presente invención son secuencias de aminoácidos que pueden unirse a moléculas del CMH de clase II humano y, a través de la presentación a linfocitos T CD4⁺, inducir una respuesta de los linfocitos T cooperadores. Los segmentos de la secuencia VH y VL humana y las combinaciones de los segmentos se pueden elegir para limitar o evitar epítomos de linfocitos T en la región variable final del anticuerpo compuesto. Esto se puede lograr mediante el uso de segmentos que no contienen epítomos de linfocitos T, tales como los procedentes de secuencias de la línea germinal humana, y mediante la unión de segmentos adyacentes para crear una nueva secuencia que no contiene epítomos de linfocitos T, por ejemplo, mediante la creación de una secuencia que no se une al CMH en la unión de dos segmentos, mediante la creación de otra secuencia de la línea germinal humana, o mediante la creación de una secuencia que no induce una respuesta de linfocitos T cooperadores, a pesar de ser una secuencia que no es de la línea germinal.

Como se ha descrito en este documento, la presente invención proporciona métodos para escrutar regiones variables de anticuerpos compuestos. Típicamente, tales métodos comprenden las etapas siguientes:

(1) preparar genes de la región variable de anticuerpos, combinando segmentos de una secuencia de aminoácidos procedentes de una gama de otras regiones variables de anticuerpos, con el fin de generar una genoteca de genes diferentes de regiones variables

(2) clonar la genoteca de genes de la región variable de anticuerpos en un vector de expresión

(3) escrutar la genoteca de regiones variables de anticuerpos y recuperar los miembros de la genoteca con propiedades deseables.

En un primer método preferido "A" de la presente invención, se genera una genoteca de regiones de anticuerpos humanos compuestos y se escruta en busca de anticuerpos con propiedades deseables, tales como la unión a un antígeno específico. Este método implica 6 etapas del modo siguiente:

(1) diseño de genes VH y VL compuestos

(2) clonación de los genes VH y VL compuestos

(3) expresión de los genes VH y VL compuestos

(4) escrutinio y selección de los anticuerpos compuestos con propiedades deseables

(5) optimización de los anticuerpos compuestos guías

(6) evitación de los epítomos de linfocitos T

Para la etapa (1), la genoteca de secuencias de VH y VL compuestas se diseña seleccionando segmentos de la secuencia de VH y VL procedentes de secuencias conocidas de la región V humana, tales como las disponibles en la base de datos de anticuerpos Kabat (www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html), la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y a partir de bases de datos de proteínas, tales como UniProt (www.ebi.uniprot.org) y PRF/SEQDB (www.prf.or.jp). Además, se pueden complementar mediante la recolección de secuencias VH y VL humanas y mediante la secuenciación directa de ARNm de VH y VL amplificado, procedente de uno o varios donantes individuales. Para el diseño de los genes VH y VL se pueden considerar diversas combinaciones de segmentos de secuencias. Un método utilizado es fijar la longitud de las secuencias de VH y VL compuestas y diseñarlas utilizando segmentos de secuencias de longitud fija procedentes de posiciones con numeración de Kabat correspondiente en diferentes regiones V humanas.

Por ejemplo, la genoteca podría comprender regiones VH y VL de 121 y 107 aminoácidos, respectivamente, y podría incluir, por ejemplo, un surtido de diferentes segmentos para los aminoácidos 1-27 de VH, utilizando la numeración de Kabat. Para VH con CDRs correspondientes a la numeración de Kabat CDR1:30-35, CDR2:50-66 y CDR3:95-106, los segmentos de secuencias para las siguientes posiciones de Kabat se utilizan como una opción: 1-27, 28-31, 32-36, 37-42, 43-50, 51-56, 57-60, 61-63, 64-69, 70-82a, 82b-96, 97-98, 99-101, 102-117. Para VL con CDRs correspondientes a la numeración de Kabat CDR1:24-34, CDR2:50-56, CDR3:89-97, los segmentos de secuencias para las siguientes posiciones Kabat se utilizan como una opción: 1-22, 23-27, 28-30, 31-33, 34-35, 36-47, 48-52, 53-55, 56-59, 60-87, 88-92, 93-94, 95-107. Por lo tanto, en este ejemplo, las VHs compuestas se componen de 14 segmentos humanos y las VLs compuestas se componen de 13 segmentos humanos. En la práctica, se utiliza un programa informático para generar combinaciones de estos segmentos. Preferiblemente, el programa incluye un algoritmo para evitar combinaciones no preferidas de ciertos segmentos que podrían, por ejemplo, evitar ciertas estructuras canónicas de CDRs o que podrían desorganizar el plegamiento de VH y/o VL o la interacción de VH/VL. Como una adición opcional, el programa podría incluir un algoritmo para limitar el número de epítomos de linfocitos T formados por la combinación de segmentos de secuencias (ver métodos *in silico* en la etapa (6) a continuación).

Para la etapa (2), después de haber diseñado una genoteca de secuencias humanas compuestas, se generan a

continuación genes VH y VL compuestos, preferiblemente usando oligonucleótidos sintéticos. Típicamente, los oligonucleótidos sintéticos que codifican segmentos más largos de una secuencia de la región variable se ligarán con una mezcla de oligonucleótidos que codifican dos o varios segmentos consecutivos de una secuencia de la región variable. Como alternativa, las regiones variables compuestas se podrían ensamblar por otros métodos tales como la PCR solapante u otras técnicas de amplificación que utilizan genes existentes de VH y VL humanas como moldes. Por ejemplo, utilizando PCR, se pueden amplificar por separado pequeños segmentos de regiones variables y luego unirlos mediante reacciones de PCR solapante.

En otros métodos, los oligonucleótidos sintéticos mixtos se pueden producir para crear una gama de segmentos de secuencias utilizando preferentemente métodos de dopaje para enriquecer las secuencias que codifican segmentos específicos de la región variable. Los genes de VH y VL humanas compuestas con una amplia variabilidad en la representación de segmentos de la región variable humana, se pueden ensamblar de diversas formas, utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; 3ª ed., vols. 1-3 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press y empleando métodos convencionales de PCR para inmunoglobulinas tales como los descritos en Orlandi *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA., 86 (1989) 3833-3837.

Para la etapa (3), una vez que se han generado los genes de VH y VL humanas compuestas, estos se pueden clonar en una variedad de vectores de expresión para la producción de moléculas de anticuerpo completas o fragmentos que se unen a antígeno, tales como Fvs, Fabs, Fab2, SCAs, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, que comprenden solo VHs) y derivados multiméricos de cada uno de estos. Como alternativa, los genes de VH y VL se pueden fusionar con genes que codifican otras moléculas para generar proteínas de fusión. También se podrían incluir secuencias que codifican marcadores detectables, tales como etiquetas de polihistidina en el extremo C terminal de una cadena de un Fv o Fab. Los vectores de expresión incluyen aquellos que se expresan en células de mamífero, células bacterianas, bacteriófagos, levaduras, hongos y otros microorganismos. Tales vectores también incluyen los que se expresan *in vivo* a partir de animales transgénicos y los que se expresan utilizando sistemas *in vitro* tales como la traducción *in vitro* utilizando preparados de ribosomas.

Para la etapa (4), el escrutinio de genotecas de anticuerpos humanos compuestos es por lo general para determinar la unión a uno o a varios antígenos específicos de interés. Hay muchos métodos de escrutinio conocidos por los expertos en la técnica, cuya selección dependerá de la forma de expresión de los anticuerpos humanos compuestos y de la composición de las moléculas de anticuerpo, es decir, el anticuerpo completo o Fab, Fv, SCA, anticuerpo de dominio único, etc. En algunos casos en los que está disponible un anticuerpo existente, el cual se une al antígeno de interés, VH o VL de este anticuerpo se pueden combinar con la VL o VH humana compuesta, respectivamente, y someter a ensayo la unión.

Los métodos de escrutinio abarcarán desde la inmovilización de miembros individuales de la genoteca o de grupos de tales miembros sobre una fase sólida, hasta inmovilizar el antígeno de interés, individualmente o en grupos. Cuando se inmovilizan anticuerpos, a continuación, se añade el antígeno de interés y se puede detectar directa o indirectamente mediante la adición de uno o varios reactivos adicionales. Por ejemplo, si el antígeno es una proteína de fusión o un conjugado con una enzima tal como fosfatasa alcalina, la detección se puede lograr mediante una adición posterior de un sustrato entre una amplia gama de sustratos que producen señales de color, fluorescentes o quimioluminiscentes. Cuando los grupos de anticuerpos se inmovilizan en un lugar (por ejemplo, el pocillo de una placa de microtitulación) y una señal es el resultado de la adición de antígeno, a continuación este grupo se puede desreplicar antes de volver a escrutar cualquiera de los miembros individuales del grupo o de grupos más pequeños. Cuando el antígeno de interés se inmoviliza, la genoteca de anticuerpos compuestos se puede escrutar de varias formas que van desde la adición de anticuerpos individuales al antígeno de interés que está inmovilizado en una posición específica, a la adición de grupos de anticuerpos, hasta la adición de toda la genoteca compuesta y la recuperación posterior de los anticuerpos unidos al antígeno de interés. En el último caso, una estrategia común es inmovilizar el antígeno sobre una fase sólida, tal como en una columna o perlas, añadir la genoteca, lavar posteriormente la fase sólida, por ejemplo, con un tampón bajo en sales (para separar los miembros poco asociados de la genoteca), y a continuación eluir los anticuerpos que se unen al antígeno utilizando, por ejemplo, un tampón de alta concentración en sales. Los formatos comunes para expresar los miembros de la genoteca para este fin son la presentación en fagos, presentación en levaduras, presentación en ribosomas y presentación en perlas, en cada caso cuando el ácido nucleico que codifica las cadenas VH y VL compuestas permanece unido a la región V compuesta que se une al antígeno.

Los métodos de escrutinio también incluirán ensayos funcionales o biológicos que se pueden sustituir por ensayos de unión directa del antígeno, en donde una actividad funcional o biológica se mide en ensayos tales como *in vitro* que implican crecimiento celular, inhibición del crecimiento celular, diferenciación celular o migración celular, o como alternativa, en ensayos *in vivo* que implican la medición de respuestas frente el antígeno a nivel de todo el organismo, por ejemplo, cambios en los recuentos de las células sanguíneas en un ratón o inhibición del crecimiento de un tumor trasplantado.

Para la etapa (5), después de la selección de uno o varios anticuerpos humanos compuestos "guías", con propiedades deseables, tales como la unión a un antígeno de interés, opcionalmente, las propiedades del anticuerpo guía se pueden mejorar, por ejemplo incrementando la afinidad de la unión con el antígeno o fusionando el

anticuerpo con un resto adicional. El aumento de la afinidad se puede conseguir mediante mutagénesis de secuencias de la región variable compuesta, con el fin de seleccionar mutaciones en las secuencias de la región V compuesta seleccionadas que incrementan o alteran la unión de una manera deseable. La presente invención incluye nuevos métodos para la mutagénesis de una secuencia de la región variable sustituyendo uno o varios segmentos de la secuencia de la región variable individual procedentes del anticuerpo guía, con segmentos de secuencias correspondientes procedentes de una o varias secuencias de anticuerpo humano. En particular, los segmentos que se solapan con la región CDR o que están dentro de ella, se pueden sustituir por uno o varios segmentos alternativos procedentes de otros anticuerpos humanos, incluidos segmentos de longitudes diferentes. Dentro del alcance de la invención, los segmentos específicos pueden estar incluidos en anticuerpos humanos con propiedades relacionadas con el anticuerpo guía seleccionado, por ejemplo, anticuerpos que se unen al mismo antígeno, o anticuerpos no humanos con propiedades relacionadas, o anticuerpos humanos con segmentos de secuencias que conservan ciertos aminoácidos clave que parecen ser importantes para una función en un anticuerpo no humano con una secuencia relacionada. Uno o varios anticuerpos humanos compuestos, objetos de tal mutagénesis, se pueden escrutar a continuación en busca de propiedades mejoradas.

Para la etapa (6), después de la selección de un anticuerpo humano compuesto guía, los epítomos de linfocitos T se limitan o se evitan mediante, en caso necesario, el intercambio de segmentos de la región variable que contribuyen a un epítomo de linfocitos T o que lo codifican, con segmentos alternativos que evitan los epítomos de linfocitos T. Tales epítomos de linfocitos T se pueden detectar a través de una variedad de métodos. Por ejemplo, los péptidos que se corresponden a uno o varios loci en la secuencia de la región V compuesta se pueden sintetizar y someter a ensayos de linfocitos T para determinar la presencia de epítomos de linfocitos T. Típicamente, tales péptidos tendrán 15 aminoácidos de longitud y, cuando sea deseable someter a ensayo una secuencia de una región variable contigua más larga, se emplearán péptidos solapantes procedentes de la secuencia, tales como 15 meros con 12 aminoácidos solapados. Para la detección de epítomos de linfocitos T, se puede emplear una variedad de diferentes ensayos de linfocitos T para medir la activación o la proliferación de linfocitos T CD4+, tales como los que miden la liberación de citocinas, la proliferación (por ejemplo, mediante la captación de 3H-timidina), el flujo de Ca²⁺, la expresión de marcadores de superficie, la transcripción de genes, etc.

Como alternativa, los péptidos solapantes que se corresponden con las secuencias de la región variable compuesta se analizan para estudiar la unión a moléculas del CMH de clase II humanas, usando métodos *in vitro* o métodos *in silico*, en cada caso, para determinar epítomos de linfocitos T potenciales, es decir, péptidos que se unen al CMH que pueden inducir una respuesta de los linfocitos T. Los métodos *in silico* incluirán métodos que implican modelar interacciones de la unión entre péptido-CMH de clase II, métodos que implican la identificación de motivos comunes para la unión al CMH de clase II y métodos que utilizan bases de datos de péptidos o de aminoácidos específicos dentro de péptidos con propiedades de unión al CMH *in vitro* conocidas. Se pueden utilizar otros métodos, tales como producir péptidos más largos a partir de secuencias de la región variable compuesta o de anticuerpos completos que contienen secuencias de la región variable compuesta y someter estos a ensayos de linfocitos T o a ensayos de unión al CMH, por ejemplo, mediante el análisis de tetrámeros de CMH-péptido, o mediante la búsqueda de las secuencias propuestas o construidas en una base de datos de epítomos de linfocitos T humanos conocidos. La evitación de los epítomos de linfocitos T en las regiones V humanas compuestas también se puede facilitar evitando motivos que se unen al CMH de clase II o evitando ciertos aminoácidos que fijan la unión de péptidos al CMH de clase II. En el método preferido para evitar epítomos de linfocitos T en uno o varios anticuerpos humanos compuestos guía, los métodos *in silico* se aplican inicialmente para analizar las regiones variables de anticuerpos humanos compuestos en busca de epítomos de linfocitos T potenciales y, cuando estos se han identificado, se introducen nuevos segmentos de secuencia de VH o VL humana para evitar estos epítomos y para evitar la introducción de nuevos epítomos de linfocitos T.

Después de cualquier introducción de este tipo de nuevos segmentos de la región variable humana y un escrutinio de nuevo de tales anticuerpos humanos compuestos guía modificados para detectar propiedades deseables, una o varias de las regiones variables humanas compuestas guía finales se pueden volver a someter a ensayo, a continuación, en ensayos de linfocitos T humanos, ya sea analizando péptidos solapantes típicamente de 15 a 45 aminoácidos de longitud, por ejemplo, péptidos de 15 meros con 12 aminoácidos solapados procedentes de las secuencias de la región variable humana compuesta (regiones variables completas o partes de las mismas) o sometiendo a ensayo anticuerpos humanos compuestos completos, directamente en ensayos de linfocitos T humanos. Se prefiere un análisis final empleando ensayos de linfocitos T para analizar el anticuerpo humano compuesto completo, permitiendo el análisis directo de la activación de linfocitos T contra el anticuerpo completo.

En un segundo método "B" preferido de la presente invención, se genera una genoteca de anticuerpos humanos compuestos para incluir aminoácidos deseables procedentes de uno o varios anticuerpos de referencia con propiedades deseables. Este método implica 7 etapas del modo siguiente:

- (1) análisis de la secuencia de uno o varios anticuerpos de referencia
- (2) diseño de genes VH y VL compuestos
- (3) evitación de epítomos de linfocitos T

- (4) clonación de los genes VH y VL compuestos
- (5) expresión de los genes VH y VL compuestos
- (6) escrutinio y selección de los anticuerpos compuestos con propiedades deseables
- (7) optimización de los anticuerpos compuestos guías incluida la evitación de epítomos de linfocitos T

5 En la etapa (1), los anticuerpos de referencia típicos serán de roedores, especialmente de ratón, con propiedades y/o especificidades de la unión que son deseables en una forma humana de anticuerpo. Cuando una o varias secuencias de la región variable del anticuerpo de referencia están disponibles, estas se analizan para determinar secuencias de las CDRs y para identificar aminoácidos que podrían ser importantes para las propiedades deseadas del anticuerpo, tales como la especificidad de la unión. Para un anticuerpo de referencia, tal análisis se realiza, por ejemplo, alineando las secuencias de la región variable de referencia con otras secuencias de la misma especie y también, si el anticuerpo de referencia no es humano, con secuencias de la región V humana. Tales alineaciones se realizan, por ejemplo, utilizando el programa CLUSTAL (Thompson *et al.*, Nucleic Acids Res. 22 (1994) págs. 4673-80). Tales alineaciones pueden identificar aminoácidos inusuales o raros en la región V del anticuerpo de referencia y las familias de regiones variables homólogas. Además, las estructuras conservadas de regiones variables, tales como las estructuras canónicas de las CDRs, se pueden identificar usando, por ejemplo, el Banco de Datos de Proteínas (Berman *et al.*: The Protein Data Bank, Nucleic Acids Research, 28 (2000) 235-242). Además, las regiones variables del anticuerpo de referencia se pueden crear, cuando no se conoce una estructura, usando un programa informático para crear modelos tal como MODELLER (Sali y Blundell, J. Mol. Biol. 234 (1993) págs. 779-815) y, en algunos casos, se pueden generar modelos de interacciones antígeno-anticuerpo. Estos análisis de las regiones variables del anticuerpo de referencia se utilizan como guía en la selección de segmentos de la secuencia de la región variable humana para el anticuerpo humano compuesto.

Para la etapa (2), después de haber determinado los aminoácidos que podrían ser importantes para las propiedades deseables del anticuerpo humano compuesto, se seleccionan segmentos de secuencias de la región variable humana para incluir algunos o todos estos aminoácidos. De este modo, se diseña una genoteca de secuencias de la región variable humana compuesta para que incluya segmentos seleccionados, típicamente con uno o varios segmentos alternativos de la región variable humana, en loci particulares, en donde el efecto de tales segmentos sobre propiedades del anticuerpo humano compuesto es incierto. Tales secuencias de anticuerpos humanos compuestos se pueden analizar adicionalmente como con el(los) anticuerpo(s) de referencia, alineándolas con otras secuencias de anticuerpos humanos y estructuras conservadas y, además, se puede crear un modelo adicional de la estructura de las regiones variables de anticuerpos humanos compuestos con el fin de perfeccionar, según sea necesario, las combinaciones de segmentos de la región variable humana utilizados en los anticuerpos humanos compuestos para evitar defectos en la estructura proteica, interacciones intermoleculares e intramoleculares dentro de las regiones variables compuestas y orientaciones estructurales incorrectas de aminoácidos importantes.

Para la etapa (3), como criterio adicional para la selección de segmentos, se seleccionan los segmentos o combinaciones de segmentos que limitan o evitan los epítomos de linfocitos T en las regiones variables compuestas humanas finales. Los epítomos de linfocitos T se analizan por los métodos descritos en el método A, etapa (6) anterior, usando métodos *in silico* o *in vitro*, preferiblemente mediante el uso de métodos *in silico* en la etapa de diseño de secuencias de la región variable humana compuesta.

Para la etapa (4), después de haber diseñado una genoteca de secuencias humanas compuestas, los genes VH y VL compuestos se generan a continuación, usando preferiblemente oligonucleótidos sintéticos. Típicamente, los oligonucleótidos sintéticos que codifican segmentos más largos de la secuencia de la región variable se ligarán a una mezcla de oligonucleótidos que codifican segmentos alternativos de la secuencia para generar diferentes miembros de la genoteca de regiones variables humanas compuestas. Como alternativa, cada miembro de la genoteca de regiones V humanas compuestas se generará de forma independiente, usando los oligonucleótidos que codifican la secuencia de la región variable humana específica. Como alternativa, las regiones variables compuestas se pueden ensamblar por otros métodos tales como la PCR solapante u otras técnicas de amplificación que utilizan genes de VH y VL humanos existentes como moldes, o emplean uno o varios genes de regiones variables de anticuerpos de referencia como molde.

Las etapas (5) y (6) del método B son tal y como se describen en el método A, etapas (4) y (5).

La etapa (7) se empleará como en el método A, etapa (6), en donde se requiere evitar adicionalmente los epítomos de linfocitos T en el(los) anticuerpo(s) humano(s) compuesto(s) guías. Se prefiere un análisis final empleando ensayos de linfocitos T para someter a ensayo anticuerpos humanos compuestos completos, permitiendo someter a ensayo directamente la activación de linfocitos T a partir del anticuerpo completo.

Los expertos en la técnica entenderán que, además de los métodos A y B, habrá otros métodos para escrutar y someter a ensayo regiones variables de anticuerpos humanos compuestos y para la optimización de sus propiedades. Las regiones variables de los anticuerpos que se han escrutado de acuerdo con la presente invención son nuevas y, como resultado del origen humano de las regiones variables y de evitar los epítomos de linfocitos B

cooperadores, deberían ser menos inmunogénicas en los seres humanos que otras regiones variables de anticuerpos que contienen secuencias no humanas. Los expertos en la técnica entenderán que el objetivo de una menor inmunogenicidad se puede conseguir usando anticuerpos compuestos menos preferidos que contienen regiones variables sin todos los segmentos de secuencias humanas, por ejemplo, regiones variables de anticuerpos humanos compuestos que incluyen segmentos en posiciones en la secuencia de la región variable del anticuerpo compuesto que son diferentes de sus posiciones en la secuencia del anticuerpo humano de origen, regiones variables de anticuerpos compuestos con solo una incorporación parcial de segmentos de la secuencia de la región variable humana, regiones variables de anticuerpos compuestos con segmentos de secuencia no humana, o regiones variables de anticuerpos compuestos con una secuencia humana que se ha mutado, por ejemplo, para aumentar la afinidad de la unión a un antígeno o para evitar un epítipo de linfocitos T.

Los expertos en la técnica entenderán que, además de las regiones variables humanas, las regiones variables de anticuerpos compuestos con segmentos de la región variable que se obtienen a partir de otras especies se pueden generar totalmente o en parte y se deben considerar dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, para estudios en ratones, las regiones variables de anticuerpos de ratón compuestos se pueden generar de forma que comprendan segmentos de secuencias de la región variable que sean total o parcialmente originarios de ratón.

Tal y como se describe en esta memoria, las regiones variables de anticuerpos compuestos descritas en esta memoria son útiles en el tratamiento de enfermedades y muestran menos inmunogenicidad. Por lo tanto se pueden utilizar en una formulación farmacéutica que comprende una región variable de anticuerpo compuesto o un fragmento que se une a antígeno tal y como se ha definido en esta memoria, opcionalmente junto con uno o varios excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Estas composiciones se pueden presentar en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de cada ingrediente activo por dosis. Dicha unidad se puede adaptar para proporcionar 5-100 mg/día del compuesto, preferiblemente 5-15 mg/día, 10-30 mg/día, 25-50 mg/día, 40-80 mg/día o 60-100 mg/día. Para los compuestos de fórmula I, se proporcionan dosis en el intervalo de 100-1000 mg/día, preferiblemente 100-400 mg/día, 300-600 mg/día o 500-1000 mg/día. Tales dosis se pueden proporcionar en una dosis única o como una variedad de dosis discretas. La dosis final dependerá, por supuesto, de la afección que se va a tratar, la vía de administración y la edad, el peso y el estado del paciente y será según el criterio del médico.

Las composiciones se pueden adaptar para la administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por la vía oral (incluida la bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluida la bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluida la subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales formulaciones se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica farmacéutica, por ejemplo, asociando el ingrediente activo con el(los) vehículo(s) o excipiente(s).

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas comestibles o batidos; o emulsiones líquidas de aceite-en-agua o emulsiones líquidas de agua-en-aceite.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica se pueden presentar como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede suministrar desde el parche mediante iontoforesis, tal y como se describe en general en *Pharmaceutical Research*, 3(6), 318 (1986).

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites.

Para aplicaciones en los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferiblemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formulan en forma de pomada, el ingrediente activo se puede emplear con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el ingrediente activo se puede formular en forma de crema con una base cremosa de aceite-en-agua o una base de agua-en-aceite.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en el ojo incluyen gotas para los ojos en donde el ingrediente activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen grageas, pastillas y colutorios.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal se pueden presentar en forma de supositorios o enemas.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros que se administra de la misma forma que se esnifa el tabaco, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal

desde un recipiente con el polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para la administración como una pulverización nasal o gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo.

5 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración por inhalación incluyen polvos o nebulizaciones de partículas finas que se pueden generar por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados con dosis medidas.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal pueden presentarse como óvulos, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

10 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en dosis unitarias o en recipientes de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

15 Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una dosis de un ingrediente activo o una subdosis diaria, tal y como se ha indicado anteriormente, o una fracción apropiada de la misma.

20 Debe entenderse que, además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones también pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Los siguientes ejemplos no deben considerarse limitantes del alcance de la invención. Las figuras y las tablas se refieren a los ejemplos a continuación y son las siguientes:

25 Figura 1/2 - Secuencia de los genes de VH (figura 1) y VL (figura 2) utilizados para el anticuerpo anti-HER2 Humano Compuesto.

Figura 3 - Inhibición de la proliferación de las células SK-BR-3 humanas después de 8 días de incubación con anticuerpo 4D5 IgG1/kappa quimérico, anticuerpo anti-HER2 Humano Compuesto y "EACHAB" anti-HER2 con epítipo evitado, con testigo quimérico anti-IgE (véase el ejemplo 4).

30 Figuras 4/5 - Secuencia de los genes de VH (figura 4) y VL (figura 5) utilizados para el anticuerpo anti-Lewis Y Humano Compuesto.

Figuras 6/7 - Secuencia de los genes de VH (figura 6) y VL (figura 7) utilizados para el anticuerpo anti-IgE humana Humano Compuesto.

Figura 8 - Secuencia de los genes VH y VL utilizados para el anticuerpo anti-TNF α humano de Ratón Compuesto que incluye la evitación de epítopos de linfocitos T humanos.

35 Figura 9 - ELISA para la unión a TNF α humano mediante el anticuerpo de Ratón Compuesto y anti-TNF α humano quimérico.

Figura 10 - Secuencias de la región V del anticuerpo anti-TNF α A2.

Figura 11 - Secuencias de variantes de VH anti-TNF α humanas compuestas.

Figura 12 - Secuencias de variantes de VL anti-TNF α humanas compuestas.

40 Figuras 13/14 - Oligonucleótidos para la construcción de VH anti-TNF α quimérica de ratón:humana (figura 13) y VL anti-TNF α quimérica de ratón:humana (figura 14).

Figuras 15/16 - Oligonucleótidos para la construcción de VH anti-TNF α humana compuesta primaria (figura 15; correspondiente a SEQ ID NO: 3, figura 11) y VL anti-TNF α humana compuesta primaria (figura 16; correspondiente a SEQ ID NO 4, figura 12).

45 Figura 17 - Oligonucleótidos para la construcción de variantes de VH y VL anti-TNF α humanas compuestas secundarias.

Figura 18 - Ensayo de protección WEHI-164 para anticuerpos anti-TNF α humanos compuestos.

Figura 19 - Ensayo del curso temporal de linfocitos T humanos en anticuerpos anti-TNF α humanos compuestos guías.

Tablas 1-3 - CDRs utilizadas en la genoteca de scFv de anticuerpos Humanos Compuestos que comprenden CDR3s de VH de 186 x 9 residuos de longitud (tabla 1), CDR3s de VL de 77 x 8 residuos de longitud (tabla 2) y CDR3s de VL de 153 x 10 residuos de longitud (tabla 3).

5 Tabla 4 – Segmentos de secuencias humanas utilizados para las variantes de VH y VL anti-TNF α humanas compuestas primarias.

Tabla 5 - Actividad de las variantes anti-TNF α humanas compuestas.

Ejemplo 1 – Construcción del anticuerpo anti-HER2 Humano Compuesto

10 Para la creación de una genoteca de segmentos de secuencias de la región variable humana, se recolectaron secuencias de aminoácidos de una amplia gama de inmunoglobulinas humanas en una sola base de datos que comprendía la genoteca de secuencias de la región variable humana *in silico* que incluía secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH) y ligera (VL). Las fuentes de las secuencias incluían la base de datos Igblast de NCBI (www.ncbi.nih.gov), las bases de datos Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, publicación del NIH 91-3242, 5ª ed. (1991) (y actualizaciones posteriores)), Vbase (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt.doc), GenBank (Benson *et al.*, Nucl. Acids Res. 25 (1997) págs. 1-6, o a través de las bases de datos www.bioinf.org.uk/abs). Las secuencias de la región variable del anticuerpo de referencia utilizadas eran un anticuerpo anti-HER2 humanizado conocido como Herceptin[®] (Carter *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 89 (1992) pág. 4285, documento US5821337). Los segmentos procedentes de la genoteca de secuencias de la región variable humana *in silico* se seleccionaron por identidad con los aminoácidos correspondientes en la secuencia de la región variable de Herceptin[®] y se combinaron para producir las secuencias VH y VL humanas compuestas, tal y como se muestra en las figuras 1 y 2, respectivamente.

15 Las técnicas de ADN recombinante se realizaron utilizando métodos bien conocidos en la técnica y, en su caso, las instrucciones del proveedor para el uso de las enzimas utilizadas en estos métodos. Las fuentes de métodos generales incluyen "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3.ª edición, vols. 1-3, compiladores Sambrook y Russel (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press y "Current Protocols in Molecular Biology", compilador Ausubel, John Wiley and Sons. Los métodos detallados de laboratorio también se describen en el ejemplo 7 a continuación. Las secuencias de VH y VL humanas compuestas correspondientes a Herceptin[®] se crearon usando, para cada cadena, ocho oligonucleótidos sintéticos de 30-60 aminoácidos de longitud que codificaban las secuencias completas de VH y VL humanas compuestas. En paralelo, como reactivo testigo, también se creó una forma quimérica del anticuerpo monoclonal de ratón 4D5 (Hudziak *et al.*, Mol. Cell. Biol., (Marzo de 1989) págs. 1165-1172)), usando ocho oligonucleótidos sintéticos por cadena. Los oligonucleótidos de VH y VL por separado se fosforilaron en primer lugar, se mezclaron en proporciones molares iguales, se calentaron a 94°C durante 5 minutos en un termociclador seguido de enfriamiento a 65°C e incubación a 65°C durante 2 min. Las incubaciones se continuaron a 45°C durante 2 min, 35°C durante 2 min, 25°C durante 2 min y 4°C durante 30 min. Los oligonucleótidos se ligaron a continuación usando la ligasa de ADN de T4 (Life Technologies, Paisley Reino Unido) a 14°C durante 18 horas.

20 A cada una de las mezclas de oligonucleótidos de VH y VL, se añadieron oligonucleótidos adicionales que codificaban una secuencia 5' flanqueante, que incluía una secuencia Kozak, la secuencia del péptido señal líder y el intrón líder, y una secuencia 3' flanqueante que incluía el sitio de corte y empalme y la secuencia del intrón, y se aparearon como anteriormente. Las casetes de expresión de V_H y V_K Humanas Compuestas y de 4D5 producidas, se clonaron como fragmentos HindIII a BamHI en el vector plasmídico pUC19 y se confirmó la secuencia de ADN completa. Estas se transfirieron a los vectores de expresión pSVgpt y pSVhyg que incluían las regiones constantes humanas de IgG1 (V_H) o Kappa (V_K), respectivamente, y marcadores para la selección en células de mamífero. Se confirmó que la secuencia de ADN era correcta para V_H and V_K Humana Compuesta y V_H and V_K de 4D5 en los vectores de expresión.

25 La línea de células hospedadoras para la expresión del anticuerpo era NS0, un mieloma de ratón que no producía inmunoglobulinas, obtenido a partir de la Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Porton, Reino Unido (ECACC n° 85110503). Los vectores de expresión de la cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células NS0 mediante electroporación. Las colonias que expresaban el gen gpt se seleccionaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero bovino fetal al 10%, 0,8 g/ml de ácido micofenólico y 250 g/ml de xantina. Los clones de las células transfectadas se escrutaron para estudiar la producción de anticuerpo humano mediante ELISA para IgG humana. Las líneas celulares que secretaban anticuerpos se expandieron y los mayores productores se seleccionaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Los anticuerpos modificados se purificaron usando Prosep-A (Bioprocessing Ltd., Northumberland, Reino Unido). La concentración se determinó mediante ELISA para anticuerpo IgG humano.

30 En el anticuerpo Humano Compuesto y los anticuerpos 4D5 quiméricos se sometió a ensayo la inhibición de la proliferación de la línea celular de tumor de mama humana HER2+, SK-BR-3 junto con un testigo negativo de anticuerpo IgG1/Kappa humano que no se unía a HER-2, exactamente como han descrito Hudziak *et al.* (ibid). Los resultados (figura 3) muestran que el anticuerpo Humano Compuesto y los anticuerpos 4D5 quiméricos tienen una potencia equivalente para inhibir el crecimiento de las células SK-BR-3. La figura 3 también muestra los datos para

un anticuerpo Humano Compuesto alternativo con "epítipo evitado", producido de la siguiente manera.

Con el fin de someter a ensayo la opción de evitar epítipos en la invención, las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera Humanas Compuestas se analizaron en busca de ligandos ajenos de la clase II del CMH humano, usando el reconocimiento del plegamiento de péptidos (www.csd.abdn.ac.uk/gjlk/MHC-thread). Este programa predice interacciones favorables entre cadenas laterales de aminoácidos del péptido y sitios de unión específicos dentro del surco de unión del CMH de clase II. Todos los 13 meros solapantes procedentes de las secuencias variables de la cadena pesada y ligera Humanas Compuestas, se hicieron pasar a través de una base de datos de alotipos del CMH de clase II y se puntuaron basándose en su ajuste y sus interacciones con las moléculas del CMH de clase II. Los péptidos previstos para unirse al CMH de clase II eran 13 meros que comenzaban en los residuos 16 y 67 en VH, y 9 y 44 en VL. Como resultado, se eligieron nuevos segmentos de la genoteca de secuencias de la región variable humana, en lugar de los utilizados en las secuencias Humanas Compuestas de la figura 1, con el fin de introducir los cambios de aminoácidos en VH 18L-A / 69I-G; VL 11L-A, 46L-A. Un anticuerpo Humano Compuesto con un "epítipo evitado" correspondiente ("EACHAB" = anticuerpo humano compuesto con un epítipo evitado, del inglés Epitope Avoided Composite Human AntiBody) se preparó sustituyendo algunos de los oligonucleótidos utilizados para preparar el anticuerpo correspondiente a la secuencia en la figura 1 y el EACHAB se preparó como en el método descrito anteriormente y se sometió a ensayo para mostrar inhibición de la proliferación de SK-BR-5, equivalente a la del anticuerpo Humano Compuesto convencional (figura 3). Estos datos muestran que los anticuerpos Humanos Compuestos se pueden construir satisfactoriamente con la misma potencia que un anticuerpo anti-Her-2 quimérico testigo, y que una versión EACHAB del anticuerpo Humano Compuesto se puede generar sin pérdida de potencia.

Ejemplo 2 - Inmunogenicidad del anticuerpo anti-HER2 Humano Compuesto

Los ensayos de proliferación de linfocitos T se llevaron a cabo para comparar la inmunogenicidad del anticuerpo anti-HER2 Humano Compuesto, la variante EACHAB y el anticuerpo 4D5 quimérico (véase el ejemplo 1). Estos anticuerpos se prepararon a partir de células NS0 cultivadas en medio exento de suero, exento de componentes obtenidos a partir de animales y exento de proteínas, HyClone HyQ@ADCF-Mab™ (nº de cat. de Hyclone: SH30349), suplementado con Suplemento de lípidos HyQ@LS1000 (nº de cat. de Hyclone: SH30554) y piruvato de sodio (nº de cat. de Gibco: 11360-039). Después de un intercambio del tampón en MES 50 mM pH 6 en Sephadex G25 (columna PD10), cada uno de los anticuerpos pasó a través de una columna de intercambio catiónico (Mono-S 10/10) y se eluyeron con un gradiente de cloruro de sodio (0 a 0,5 M). Las fracciones que contenían el anticuerpo se aplicaron después a una columna preparativa de Superdex 200 (XK16/60) que migraba con los péptidos del ensayo con los picos se agruparon y se almacenaron a 4°C. Las concentraciones de anticuerpo se determinaron mediante ELISA para IgG humana. El análisis de la inmunogenicidad se realizó usando CMSPs (células mononucleares de sangre periférica) que fueron aisladas a partir de sangre de donantes sanos humanos y se crioconservaron en nitrógeno líquido. Cada donante fue tipificado para el tejido empleando un kit para la tipificación de tejido basado en PCR Allset™ (DynaL, Wirral, Reino Unido) y 20 donantes sanos fueron seleccionados según los haplotipos individuales del CMH. Cultivos en masa de 2 ml que contenían 4×10^6 CMSP en medio AIM V (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) se incubaron en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos con los péptidos del ensayo (concentración final 5 M) y se determinó la proliferación los días 5, 6, 7 y 8 resuspendiendo suavemente los cultivos en masa y transfiriendo por triplicado 100 μ l muestras de CMSP a una placa de 96 pocillos con fondo en U. Los cultivos se recogieron sobre esterillas de filtro de fibra de vidrio usando un recogedor de placas de Tomtec Mach III (Receptor Technologies, Reino Unido) y los valores de las cuentas por minuto (cpm) se determinaron por recuento de centelleo, utilizando un lector de placas Wallac Microbeta TriLux (usando un protocolo de recuento de alto rendimiento de Paralux). Para cada anticuerpo del ensayo, se calculó el índice de estimulación (IE) como la relación de cuentas por minuto (cpm) del anticuerpo del ensayo: cpm del testigo negativo, considerando IE > 2 una respuesta significativa de epítipos de linfocitos T. Los resultados mostraron que el anticuerpo 4D5 quimérico inducía respuestas proliferativas significativas en al menos uno de los cuatro días en que se sometió a ensayo la proliferación (IE mayor que 2), en cinco de los veinte donantes sanos analizados (25%), el anticuerpo anti-HER2 Humano Compuesto inducía un IE > 2 en tres de los veinte donantes (15%), mientras que el anticuerpo anti-HER2 EACHAB no inducía un IE > 2 en ninguno de los veinte donantes (0%). Estos resultados indicaban un orden en la inmunogenicidad de 4D5 quimérico > anti-HER2 Humano Compuesto > anti-HER2 EACHAB, no mostrando este último ninguna evidencia de inmunogenicidad en ninguna muestra de sangre de donantes sometidas a ensayo.

Ejemplo 3 - Construcción del anticuerpo anti-Lewis Y Humano Compuesto

Un anticuerpo Humano Compuesto específico del antígeno Lewis Y sializado se construyó tal y como se ha descrito en el ejemplo 1 utilizando, como secuencias de referencia de la región variable del anticuerpo, el anticuerpo 3S193 humanizado (Scott *et al.*, Cancer Res., 60 (2000) págs. 3254-3261, documento US5874060). Los segmentos procedentes de la genoteca de secuencias de la región variable humana *in silico* se seleccionaron por identidad con los aminoácidos correspondientes en la secuencia de la región variable de 3S193 humanizada y se combinaron para producir las secuencias de VH y VL Humanas Compuestas, tal y como se muestra en las figuras 4 y 5, respectivamente. De forma paralela, un anticuerpo de referencia anti-Lewis Y quimérico se preparó a partir de secuencias de la región V de referencia. Las regiones constantes de IgG1 humana (VH) y Kappa (VK) se utilizaron en el anticuerpo anti-Lewis Y Humano Compuesto y en el anticuerpo quimérico de referencia, y los anticuerpos se

sometieron a ensayo mediante ELISA frente a un conjugado sintético de Lewis Y-HSA, tal y como se describe en el documento US5874060. Los datos mostraron una concentración mínima de 0,1 µg/ml de anticuerpo quimérico para proporcionar una señal de unión en el ensayo, en comparación con 0,15 µg/ml de anticuerpo Humano Compuesto, lo que es coherente con los datos del documento US5874060.

5 Ejemplo 4 - Construcción del anticuerpo anti-IgE Humano Compuesto

Un anticuerpo anti-IgE Humano Compuesto se construyó tal y como se ha descrito en el ejemplo 1, utilizando como secuencias de referencia de la región variable del anticuerpo, el anticuerpo anti-IgE humanizado conocido como Xolair® (Presta *et al.*, J. Immunol., 151(5) (1993) págs. 2623-2632). Segmentos procedentes de la genoteca de secuencias de la región variable humana *in silico* se seleccionaron por identidad con los aminoácidos correspondientes en la secuencia de la región variable de Xolair® y se combinaron para producir las secuencias de VH y VL Humanas Compuestas, tal y como se muestra en las figuras 6 y 7, respectivamente. Paralelamente, se preparó un anticuerpo anti-IgE quimérico de referencia a partir de secuencias de la región V de referencia. Las regiones constantes de IgG1 humana (VH) y Kappa (VK) se utilizaron tanto en el anticuerpo anti-IgE Humano Compuesto como en el anticuerpo quimérico de referencia.

15 La especificidad de los Fabs se caracterizó adicionalmente mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore 2000, Biacore AB, Uppsala, Suecia). El Fab de IgE humano recombinante se produjo como describen Flicker *et al.*, J. Immunol., 165 (2000) págs. 3849-3859. Los anticuerpos del ensayo se purificaron y se inmovilizaron sobre celdas de flujo de un chip de CM, usando un kit de NHS/EDC (Biacore) para obtener 2010 UR para el anti-IgE quimérico y 2029 UR para el anti-IgE Humano Compuesto. Fab humano recombinante de IgE 10 y 25 nM en solución salina tamponada con Hepes (Hepes 10 mM, EDTA 3,4 mM, NaCl 150 mM, 0,05% (v/v) de tensioactivo P20, pH 7,4) se hizo pasar a través de los anticuerpos del ensayo con un caudal de 5 µl/min durante 10 minutos. Los resultados mostraron que para ambos Fab de IgE 10 y 25 nM, se detectó una curva de RPS equivalente (resonancia de plasmón superficial) para los anticuerpos anti-IgE quimérico y anti-IgE Humano Compuesto, mostrando que este último había logrado con éxito una eficacia de la unión, equivalente a la del anticuerpo de referencia anti-IgE.

25 Ejemplo 5 - Generación y escrutinio de genotecas de scFv Humano Compuesto

La estrategia para la construcción inicial de la genoteca de scFv humano (Fv de cadena sencilla) fue construir siete genes de consenso de VH humana y cuatro genes de consenso de VL (kappa) humana, tal y como se detalla en Knappik *et al.*, J. Mol. Biol., 296 (2000) 57-86 y clonar dentro de ellos un gran número de segmentos de CDR3s de VH y VL procedentes de bases de datos de regiones variables humanas. Esta lista de CDR3s se muestra en la tabla 1 para CDR3s de VH, en la tabla 2 para CDR3s de VL de 8 aminoácidos y en la tabla 3 para CDR3s de VL de 10 aminoácidos. Para la construcción principal de VH y VL, 6 oligonucleótidos sintéticos solapantes que codificaban VH y VL hasta el extremo de la región estructural 3, se sintetizaron tal y como se detalla en Knappik *et al.*, *ibid.*, y se sometieron a PCR recursiva (Prodromou y Pearl, Protein Engineering, 5 (1992) 827-829). Estos se ligaron en el vector pZero-1 digerido con EcoRV (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Para la adición de CH1 y kappa C, ambas inicialmente con CDR3s de 4D5 (Carter *et al.*, Bio/Technology, 10 (1992) 163-167), se siguió el protocolo de Knappik *et al.*, *ibid.*, excepto que los fragmentos SapI-EcoRI de VH-CH1 y NsiI-SphI de VL-C kappa se clonaron ambos con extremos romos en pZero-1 digerido con EcoRV.

Tabla 1

Nombre	H3	Longitud-H3	Subgrupo (H)
MUC1-1'CL	DFLSGYLDY	9	I
ALL1-1'CL	VRGSGSFDY	9	III
ALL7-1'CL	DRGGNYFDY	9	III
L36'CL	MYNWNFFDY	9	I
5.M13'CL	AGLGMIFDY	9	I
Au2.1'CL	RGFNGQLIF	9	I
M71'CL	ALTGDAFDI	9	II
VH6.N1'CL	TKLDWYFDL	9	II
E55 6.X'CL	RYGGFYFDY	9	II
E55 6.11'CL	GYSNEGMDV	9	II
VH6.A5'CL	SWDGYSYIY	9	II
VH6-EX8'CL	QMGAEIFQHQ	9	III
E54 4.2'CL	DMSLDAFDI	9	II
RF-SJ4'CL	GSVATLGE	9	II

ES 2 417 133 T3

Nombre	H3	Longitud-H3	Subgrupo (H)
3.A290'CL	YGDYHYFDY	9	III
A95	GVGSSGWDH	9	III
60P2'CL	KGSLYYFDY	9	III
E55 3.6'CL	PNWNDAFDI	9	III
E55 3.16'CL	RGIPHAFDI	9	III
333'CL	PPEVESLRS	9	III
1H1'CL	PPEVESLRS	9	III
126'CL	PPEVESLRS	9	III
1B11'CL	PPEVESLRS	9	III
115'CL	PPEVESLRS	9	III
112'CL	PPEVESLRS	9	III
2C12'CL	PPEVESLRS	9	III
2A12'CL	PPEVESLRS	9	III
BUT	DLAAARLF?	9	III
KOL-based resh.	QGTIAGIRH	9	III
CAMPATH-9			
L2E8'CL	EDYYYGMDV	9	III
s5D4'CL	DPINWYFDL	9	III
ss4'CL	DRAAGDRDY	9	III
P2-57'CL	HQMYSNSDY	9	I
HuHMF1'CL	SYDFAWFAY	9	I
NEW-based resh.	QGTIAGIRH	9	II
CAMPATH-9			
TR1.10'CL	VLGIIAADH	9	I
L3B2'CL	DLTGDAFDI	9	I
DAW	SCGSQYFDY	9	II
ss7'CL	LWNWDAFDI	9	I
ss6'CL	DIMTWGFDY	9	I
s5A9'CL	SNWYWYFDL	9	III
NEWM	NLIAGCIDV	9	II
L2A12'CL	GGKGGEFDD	9	I
B5G10H'CL	DSGNYRIDY	9	II
E55 3.9'CL	DPRLDAFDI	9	III
SpAI-29'CL	GYSYPVWGR	9	III
AM28'CL	LVGNSWLDY	9	III
BM2'CL	DL?GLVVEY	9	III
CM29'CL	KVSLSAFDI	9	III
B-B10 M0'CL	RGDAMYFDV	9	I
HSVCBM8'CL	DPNPWYFDL	9	III
HSVCD53'CL	DYGDYAFDI	9	III
HSVCBG6'CL	SAHSDAFDM	9	III
MICA 4'CL	LEGLGWFP	9	I
1/11'CL	RSDYGAIDY	9	III
5/8'CL	NLGFYHMDV	9	III
B6204'CL	EARGGGGEY	9	III

ES 2 417 133 T3

Nombre	H3	Longitud-H3	Subgrupo (H)
VH CLONE 1'CL	EGWISALNG	9	III
VH CLONE 32'CL	EGEGEYFDY	9	III
MG6-1'CL	ERTSGDFDF	9	III
MG6-3'CL	NSPGATFES	9	III
Daudi'CL	GNGQKCFDY	9	III
IE4'CL	RGSLQYLDY	9	I
IF10'CL	NNGSYYFDY	9	I
hsighvm148'C L	GSDYSNFAY	9	III
E3-MPO'CL	STHRSAFDV	9	II
rev9Fd'CL	EGVHKNFHD	9	III
NANUC-1'CL	LSRAGGFDI	9	III
Paciente 14'CL	RMPAVAFDY	9	II
14G1'CL	RMPAVAFDY	9	II
14G2'CL	RMRAVAFDY	9	II
14G3'CL	RMPAVAFDY	9	II
A15'CL	DYGGNPAEL	9	I
G15'CL	GPTCSGGSC	9	I
M11'CL	RKGAAHFDY	9	I
RF-DI1'CL	EEVGGYFQH	9	III
AC-18'CL	DFDGGSFYD	9	III
AC-29'CL	DFDGGSLDY	9	III
AC-40'CL	DFDGGSFYD	9	III
TR35'CL	KVPSHGMDY	9	III
TR36'CL	KVPSHGMDY	9	III
TR37'CL	KVPSHGMDY	9	III
TR38'CL	KVPSHGMDY	9	III
L34'CL	QPLARHFDP	9	III
L100'CL	GPLMRWFDD	9	III
WG1'CL	VAVAGGFDP	9	III
RF-ET5'CL	GVEVAGTAS	9	I
RF-ET10'CL	YYESSAGPP	9	III
EW-D1'CL	EIPRGGSCY	9	III
EW-D3'CL	EIPRGGSCY	9	III
KN-D6'CL	KEKWDSSRC	9	III
HH-M2'CL	GSAAAGTQG	9	III
AK-D8'CL	DFSWAGPHF	9	III
BALL-1'CL	GTHYYDIRV	9	III
YJ	DGSGSYEGN	9	III
K2.2	GGAVAAFDY	9	III
E2.5	KPVTGGEDY	9	III
MSL5	DYDGAWFAY	9	I
Hb-2	WDGRLLVDY	9	III
b4'CL	HKGLRYFDY	9	III
b3'CL	HKGLRYFDY	9	III

ES 2 417 133 T3

Nombre	H3	Longitud-H3	Subgrupo (H)
b2'CL	HKGLRYFDY	9	III
b5'CL	HKGLRYFDY	9	III
b17'CL	HKGLRYFDY	9	III
b19'CL	HKGLRYFDY	9	III
A3-H2'CL	YRGDTYDYS	9	III
A3-M9'CL	WVGATTSDY	9	III
Tmu69'CL	EDMDYGMDV	9	III
Amu1d4-3'CL	GGRDRYLVY	9	III
1946'CL	VRVSYGMDV	9	V
GN901v1.0	MRKGYAMDY	9	III
GN901v1.1	MRKGYAMDY	9	III
N901H/KOL	MRKGYAMDY	9	III
N901H/G36005	MRKGYAMDY	9	III
N901H/PLO123	MRKGYAMDY	9	III
Paciente 14'CL	RMPAVAFDY	9	II
14G1(2)'CL	RMPAVAFDY	9	II
14G2'CL	RMRAVAFDY	9	II
14G3'CL	RMPAVAFDY	9	II
CLL-8'CL	TSIVRGFGP	9	II
BA-1F'CL	DFFRDYFDY	9	I
BA-2P'CL	DFFRDYFDY	9	III
L3055 4.6'CL	GGTQPFDIR	9	II
15'CL	SQASGPFDY	9	I
CL-G'CL	GLYQLLFDY	9	III
CL-O'CL	AGGRTSFDP	9	I
BA3'CL	EGNTKAPDY	9	III
PS'CL	NGTSGDFDY	9	II
HNK20 hu7	YGTSYWFPY	9	I
HNK20 hu10	YGTSYWFPY	9	I
Amu1d4-3'CL	GGRDRYLVY	9	III
Amu1e10-3'CL	LRYQLLYNY	9	I
1e8-3'CL	YIAYDAFDI	9	I
1f7-3'CL	ITPRNAVDI	9	III
Agamma41-3'CL	DGLLAATDY	9	III
Agamma8-3'CL	DRAYLDFWG	9	III
Amu10-3'CL	DKEPAYFDY	9	I
Amu2-1'CL	RGFNGQLIF	9	I
Amu40-2'CL	LSVVVPAAL	9	III
Amu70-1'CL	LADDDPEDF	9	I
Tmu69'CL	EDMDYGMDV	9	III
B7-g2B01'CL	SAGGSAWST	9	III
B8-g3C11'CL	DRSYYGMDV	9	III
B8-g3F05'CL	DKGTRYSDQ	9	III
BF1N-g3C12'CL	WLVEGSFDY	9	III
BF1N-g3H05'CL	GYVGSSLDY	9	III

ES 2 417 133 T3

Nombre	H3	Longitud-H3	Subgrupo (H)
BF1P-g2A11'CL	WHQLRGPDY	9	III
BF2P1-g3D10'CL	ENSDYYFDY	9	III
BF2P1-g3E12'CL	DGTYGSGVR	9	III
BF2P2-g3C10'CL	GGSMVPFDY	9	III
BF2P2-g3D05'CL	RGWNYFDS	9	III
BF2P2-g3D12'CL	DAYYYGLDV	9	III
BF2P3-g3C10'CL	DGRYDPIDY	9	III
BF2P1-g7B02'CL	VGSSGWYDY	9	I
BF2N1-g1C10'CL	DLYDYYDEP	9	I
BF2N2-g1A11'CL	DGAAASFDY	9	I
BF2N2-g1E01'CL	WGADYFDY	9	I
BF2N1-g3F03'CL	DQNWGYFDY	9	III
BF2N2-g3B07'CL	GVLRFDAFDI	9	III
BF2N2-g3C03'CL	ASDGYGMDV	9	III
BF2N2-g3F07'CL	GVLRRHALDI	9	III
BF2N1-g4A03'CL	GGCGWYKNY	9	III
BF2N1-g4B10'CL	GSNYAKTGY	9	III
BF2N1-g4C11'CL	GKFQLLFDY	9	III
BF2N1-g6A07'CL	ALHGGGMDV	9	III
BF2N1-g6F07'CL	ALHGGGMDV	9	II
BF2N2-g6D09'CL	VYPPDAFDL	9	III
mAbRWL1'CL	PWDYWFFDL	9	II
SV-10	DRVAAAGDY	9	III
SV-7	DKGTRYSDQ	9	III
SV-9	DRVATIPDY	9	III
DN6'CL	ERGITLMDV	9	I
DN7'CL	ERGITLMDV	9	I
SC12'CL	LDWLLPIDY	9	I
SC13'CL	LDWLLPIDY	9	I
D11'CL	DDGDRAFGY	9	III
JON'CL	DPWPAAFDI	9	III
DEZ'CL	VRGSWSGDS	9	III
BAR	RHSSDWYPY	9	III
KC13H'CL	SSPYGALDY	9	III
clone 15'CL	GLDQYKTGH	9	II
B22'CL	GAGAAPHDY	9	III
P13'CL	GAGAAPHDY	9	III
PS'CL	NGTSGDFDY	9	II
Paciente 2	ALRPATFDF	9	III

Tabla 2

Nombre	L3	Longitud-L3	Clase
HIV-s8'CL	QQYADLIT	8	IGG1-KAPPA
FOG1-A4'CL	QQYYSTPT	8	-KAPPA
SA-4B'CL	QQYNTYPT	8	IGG-KAPPA

ES 2 417 133 T3

Nombre	L3	Longitud-L3	Clase
HIV-b5'CL	QQGNSFPK	8	IGG1-KAPPA
HIV-loop8'CL	QQYGYSLT	8	IGG1-KAPPA
Reg-A'CL	QQFGGSFT	8	KAPPA
9F12Fab'CL	QQSSNTVT	8	KAPPA
GP68'CL	QQYNSLIT	8	IGG1-KAPPA
C471'CL	QQYNNWPT	8	IGM-KAPPA
B8807'CL	LQHNSYPF	8	IGM-KAPPA
B122'CL	QQYNSQYT	8	IGM-KAPPA
B6204'CL	QQYGSLWT	8	IGM-KAPPA
IM-9'CL	QHYNRPWT	8	IGG-KAPPA
T48.16-G8'CL	QQYGSRLT	8	KAPPA
7F'CL	QHYGTPRT	8	IGG1-KAPPA
1A6'CL	QQYNNWPT	8	IGM-KAPPA
1.69'CL	MQATQFPT	8	IGM-KAPPA
antiTac	HQASTYPL	8	KAPPA
WE	QQYGRSPR	8	KAPPA
D1.1	QQDDLPLYT	8	KAPPA
K2.2	QNDNLPLT	8	KAPPA
E1.1	QQESLPLT	8	KAPPA
E2.4	QQDNLPLT	8	KAPPA
E2.5	QQESLPCG	8	KAPPA
E2.11	QQDSLPLT	8	KAPPA
SSaPB	QQYGSSRS	8	IGM-KAPPA
SEGaBM	QQYGSSRT	8	IGM-KAPPA
SELcLN	QQYCGSLS	8	IGM-KAPPA
mAb5.G3'CL	QQSYSTLT	8	IGM
P7'CL	QLYGSSLT	8	KAPPA
PA	QQYNNLWT	8	KAPPA
CAR	QQYNTFFT	8	KAPPA
Taykv322'CL	QQYGSSPT	8	KAPPA
Taykv310'CL	QQYGSSLT	8	KAPPA
Taykv320'CL	QQYGSSLT	8	KAPPA
slkv22'CL	QQYGSSKT	8	KAPPA
LES	QQYNNWPP	8	KAPPA
RF-TMC1'CL	QHRNNWPP	8	IGM-KAPPA-III
slkv4'CL	QQRSNWPS	8	KAPPA
MD3.13'CL	QQYGSSPT	8	KAPPA
VJI'CL	QQYDTIPT	8	KAPPA
rsv13L'CL	QASINTPL	8	IGG1-KAPPA
II.2'CL	MQALQPWT	8	KAPPA
I.75'CL	QQGFSDRS	8	KAPPA
II.14'CL	MQATQFVT	8	KAPPA
III.7'CL	QRCKGMFS	8	KAPPA
SPA3-16'CL	QQYGGSPW	8	KAPPA
VL CLONE 52'CL	CRSHWPYT	8	KAPPA

ES 2 417 133 T3

Nombre	L3	Longitud-L3	Clase
6F5-01'CL	QQYYSTPP	8	KAPPA
6F7-42'CL	QQCNTNPP	8	KAPPA
6F8-01'CL	QQYYSTPP	8	KAPPA
6F9-31'CL	QQYYSVPP	8	KAPPA
D7'CL	QQYDSLVT	8	IGG1-KAPPA
HuVK'CL	HQYLSSWT	8	KAPPA
BC-26'CL	MQGIHLLT	8	KAPPA
VkLaE34'CL	QHYYGTPH	8	KAPPA
FL9-K	QQYNTYPT	8	KAPPA
HSC7	QEFGDSGT	8	IGG
HSC28	QQYGGSPW	8	IGG
SEGcPB	QQYGSSRT	8	IGM-KAPPA
P3'CL	QQYDSLPT	8	KAPPA
A5K3'CL	QQYGSVFT	8	IGM
BZ1K1'CL	QQYNSYCS	8	IGM
BZ2K1'CL	QQYYSTPL	8	IGM
D11K3'CL	QQYNDWPT	8	IGM
D17K2'CL	MQNIQFPT	8	IGM
F21K1'CL	QQYDNLPP	8	IGM
F22K3'CL	QLLR?LRT	8	IGM
SCFV198'CL	YQYNNGYT	8	KAPPA
KC25L'CL	QQRSNWPT	8	KAPPA
ASSYN13'CL	QQYGTSHT	8	KAPPA
BCPBL1'CL	QQYNHWPS	8	KAPPA
BCPBL4'CL	QQYGSLYT	8	KAPPA
BCPBL6'CL	QQNKDWPL	8	KAPPA
BCSYN6'CL	QQFGTSLT	8	KAPPA
ITPBL14'CL	QQRSNWWT	8	KAPPA
ITPBL2'CL	QQCSNWPT	8	KAPPA
SP10'CL	QQYGSSPT	8	KAPPA

Tabla 3

Nombre	L3	Longitud-L3	Clase
8E10'CL	QQYGSSPSIT	10	IGM-KAPPA
III-2R'CL	QKYNSAPPST	10	IGM-KAPPA
II-1'CL	QEYNNWPLWT	10	KAPPA
35G6'CL	QQYGGSPPW	10	IGM-KAPPA
GF4/1.1'CL	HEYNGWPPWT	10	IGG3-KAPPA
RF-TS5'CL	QQYNSYSPLT	10	IGM-KAPPA
O-81'CL	MQHTHWSPIT	10	IGM-KAPPA
mAb114'CL	QHYNWPPWT	10	IGM-KAPPA
HIV-B8'CL	QQSYNTPPWT	10	IGG1-KAPPA
HIV-b8'CL	QQSYNTPPWT	10	IGG1-KAPPA
TT117'CL	QHYGSSPPWT	10	IGG1-KAPPA

ES 2 417 133 T3

Nombre	L3	Longitud-L3	Clase
HIV- loop13'CL	QQHNNWPPLT	10	IGG1-KAPPA
HIV-s3'CL	QVYGQSPVFT	10	IGG1-KAPPA
1-185-37'CL	QQYGSSPMYT	10	IGM-KAPPA
1-187-29'CL	QQYGSSPMYT	10	IGM-KAPPA
HIV-s5'CL	QRFGTSPLYT	10	IGG1-KAPPA
HIV-b3'CL	QQYGDSPLYS	10	IGG1-KAPPA
GER	QQYDDWPPIT	10	IGG-KAPPA
BLI'CL	QQLNSYPPYT	10	IGM-KAPPA
2A4'CL	QQSYSTPPDT	10	IGG
0-16'CL	QHYNWPPSS	10	KAPPA
mAb48'CL	QHYNRLPPWT	10	IGG3-KAPPA
447.8H'CL	QQYDRSVPLT	10	KAPPA
GP13'CL	QQYYTTPTYT	10	IGG1-KAPPA
M37GO37'CL	QQYYTTPPLT	10	IGG-KAPPA
9500'CL	QQLYSYPHLT	10	IGM-KAPPA
9702'CL	CQQYGSSRWT	10	IGG-KAPPA
GSD2B5B10'CL	MQALQTPMST	10	KAPPA
MD2F4'CL	QQRSEWPLT	10	KAPPA
GAN4B.5'CL	QQYDTSPAWT	10	KAPPA
NANUC-2'CL	QQYGSSQGFT	10	IgG1-kappa
SOL10'CL	MQSIQLPRWT	10	KAPPA
AB1/2'CL	QHYGLSPFIT	10	IGG1-KAPPA
AB4'CL	QEYGSSPPRT	10	IGG1-KAPPA
RH-14'CL	SSYRSSSTRV	10	IGG1-LAMBDA
AB1/2'CL	QHYGLSPFIT	10	IGG1-KAPPA
AB4'CL	QEYGSSPPRT	10	IGG1-KAPPA
L55-81'CL	QQYYTTLPLT	10	IGM-KAPPA
B3	SSYSSTTRVW	10	IGG
HUL-mRF'CL	QQYGSSPQTF	10	IGM-KAPPA
25C1'CL	FCQYNRYPYT	10	KAPPA
LC4aPB	LQRSNWGEVT	10	IGM-KAPPA
LC4bPB	QQRSNWGEVT	10	IGM-KAPPA
LC4cPB	QQRSNWGEVT	10	IGM-KAPPA
mAb3.B6'CL	QQYGSSPLFT	10	IGM
mAb1.C8'CL	CSYTSSSTLV	10	IGM
P9'CL	QQRSNWPPIT	10	KAPPA
21H9'CL	QQSYNTLSLT	10	IGG1-KAPPA
19A5'CL	QHYGNSPPYT	10	IGG1-KAPPA
43F10'CL	QQSHKTLAWT	10	IGG1-KAPPA
FON'CL	MQGTYWPPYT	10	IGM-KAPPA
Hu PR1A3	HQYYTYPLFT	10	KAPPA
hu PR1A3	HQYYTYPLFT	10	KAPPA
CLL-412'CL	QQSYSTPPWT	10	IGG-KAPPA
MEV	QQSYTNPEVT	10	KAPPA
SON	QQYGSSPPYT	10	IGM-KAPPA

ES 2 417 133 T3

Nombre	L3	Longitud-L3	Clase
HEW"CL	QQYGSSPRYT	10	KAPPA
HEW'CL	QQYGSSPRYT	10	KAPPA
JH'	QQFGNSPPL?	10	IGG2-KAPPA
HG2B10K'CL	QQYAGSPPV	10	IGG-KAPPA
CLL'CL	QQYNNWPPWT	10	IGM-KAPPA
slkv12'CL	QQYNNWPPWT	10	KAPPA
bkv6'CL	QQRSNCSGLT	10	KAPPA
slkv11'CL	QQYNNWPPWT	10	KAPPA
slkv13'CL	QQYNNWPPWT	10	KAPPA
bkv7'CL	QQYNNWPPCT	10	KAPPA
bkv22'CL	QQYNNWPPWT	10	KAPPA
bkv35'CL	QQRSEWPPPLT	10	KAPPA
MD3.3'CL	QQRSNWPSIT	10	KAPPA
MD3.1'CL	QQRSNWPPPLT	10	KAPPA
GA3.6'CL	QQRNTWPIFT	10	KAPPA
M3.5N'CL	QQRSNWPPGT	10	KAPPA
MD3.4'CL	QQYNNWPPPLT	10	KAPPA
M3.1N'CL	QQYNNWPTWT	10	KAPPA
GA3.4'CL	QQRMRWPPPLT	10	KAPPA
MD3.7'CL	QQYGSSPKWT	10	KAPPA
MD3.9'CL	QQYGSSPQYT	10	KAPPA
GA3.1'CL	QQYGSSPPYT	10	KAPPA
bkv32'CL	QQYDRSLPRT	10	KAPPA
GA3.5'CL	QQYGN SPLFS	10	KAPPA
GA3.8'CL	QQYGG SPLFS	10	KAPPA
E29.1 KAPPA'CL	QQYNNWPTWT	10	IGM-KAPPA
R5A3K'CL	MQALQTLGLT	10	IGM-KAPPA
R1C8K'CL	MQALQTLGLT	10	IGG-KAPPA
I.24'CL	QQSHSAPPYT	10	KAPPA
III.12'CL	QQYGSSPLFT	10	KAPPA
III.5'CL	QQYNDWPPWT	10	KAPPA
I.18'CL	QQYNGNSPLT	10	KAPPA
I.67'CL	QQLNTYPPWT	10	KAPPA
III.6'CL	HKYGGSPPYT	10	KAPPA
II.65'CL	MQDTHWPPWT	10	KAPPA
III.14'CL	QHYGRSPPLT	10	KAPPA
424.F6.24'CL	QQYGN SPPIYT	10	KAPPA
T33-5'CL	QQYGSSPPYT	10	IGM-KAPPA
AL-MH	QQYFNVPVVT	10	KAPPA
AL-Es305	QHYHNLPPPT	10	KAPPA
L47'CL	IQGTHWPQYT	10	IGM-KAPPA Y LAMBDA
F29'CL	QQYGSSRALT	10	IGM-KAPPA Y LAMBDA
G28'CL	QQYYSTPSYT	10	IGM-KAPPA Y LAMBDA
G21'CL	MQALQTLMCS	10	IGM-KAPPA Y LAMBDA
CLON DE VL 45'CL	QQSYSTPPLT	10	KAPPA

ES 2 417 133 T3

Nombre	L3	Longitud-L3	Clase
CLON DE VL 48'CL	QQSYSTPPIT	10	KAPPA
CLON DE VL 56'CL	QQYGGSLPIT	10	KAPPA
C9'CL	QQYGSSTPLT	10	IGG1-KAPPA
ITC88'CL	QQRSSWPPLT	10	KAPPA
AC18'CL	QQRYSWPPLT	10	KAPPA
AC31'CL	QQRYNWPPLT	10	KAPPA
AC32'CL	QQRSNWPPLT	10	KAPPA
AC37'CL	QQRSSWPPLT	10	KAPPA
B'20	QQYNNWPPWT	10	IgM-VkIIIa
(Humkv328-Jk1)'CL			
B9601 (Vg-Jk2)'CL	QQRSNWPPYT	10	IgM-VkIIIa
MF8	QQYNNWPPWT	10	IgM-VkIIIa
(Humkv328-Jk1)'CL			
B'2	QQYNNWPPWT	10	IgM-VkIIIa
(Humkv328-Jk1)'CL			
kappa1'CL	QQYGSSPPIT	10	IGG2-KAPPA
kappa2'CL	QQYNNWPPIT	10	IGG2-KAPPA
kappa3'CL	QQRSSWPPIIT	10	IGG2-KAPPA
kappa4'CL	QQYGSSPRVT	10	IGG2-KAPPA
kappa5'CL	QQYNTNSPIS	10	IGG2-KAPPA
kappa7'CL	QNYGSSPRIT	10	IGG2-KAPPA
kappa8'CL	QQYGSSPPIT	10	IGG2-KAPPA
ToP218'CL	MQSIQLPRFT	10	KAPPA
ToP241'CL	MQSVQLPRFT	10	KAPPA
ToP309'CL	MQSVQLPRFT	10	KAPPA
L1236K3'CL	QQYDKWPPVT	10	KAPPA
SOL1'CL	MQSIQFPRWT	10	KAPPA
BC-2'CL	MQGIHLPPYI	10	KAPPA
P3'CL	NQGTQWLLYT	10	KAPPA
P5'CL	QQYNSYAPYT	10	KAPPA
AB1/2'CL	QHYGLSPPIT	10	IGG-KAPPA
AB4'CL	QEYGSSPPRT	10	IGG-KAPPA
MH	QQYFNVPPVT	10	KAPPA
FL6-K	QQLTSYPPWT	10	KAPPA
FL2-K	QQVNSYPGLT	10	KAPPA
FL4-K	QQVFSYPGIT	10	KAPPA
FL1-K	QQYTSLPGIT	10	KAPPA
MM4-K	QHSYSTLPLT	10	KAPPA
MM9-K	QQYYNIPYIT	10	KAPPA
HSC4	QLYGSSPRVT	10	IGG
HSC11	QQYANWPPIT	10	IGG
HSC13	QQYNISPRDT	10	IGG
HSC23	QQFGSSPLIT	10	IGG
HSC35	QQYGDFFRVT	10	IGG
REV	QQYGDWPPYT	10	KAPPA

Nombre	L3	Longitud-L3	Clase
BLU	QQYYTTLSTW	10	KAPPA
BK2'CL	QQYNKWPLT	10	KAPPA
GK6'CL	MQGTHWLPVT	10	IGG-KAPPA
L1236K3'CL	QQYDKWPPVT	10	KAPPA
P1'CL	QQYDNLPIH	10	KAPPA
H01'CL	QLNYPFFT	10	KAPPA
I01'CL	QSYSTPPYT	10	KAPPA
I10'CL	QSYSTPPYS	10	KAPPA
I12'CL	QSYSTPPYT	10	KAPPA
126TP14K'CL	QQYNNWLPFT	10	IGG-KAPPA
L32'CL	AAWDDSLTLM	10	IGM-KAPPA

5 Para la inserción de las CDR3s, oligonucleótidos individuales que codifican cada una de las CDR3s de la tabla H procedentes de la hebra positiva, fueron sintetizados con 12 nucleótidos homólogos añadidos a cada extremo para aparearlos con los genes VH y VL de consenso. Además de estas secuencias CDRs, se incluyeron CDRs procedentes del anticuerpo E25 (véase el ejemplo 4). Estos cebadores se extendieron y se añadieron cebadores secundarios para introducir directamente de forma adyacente a los extremos N y C terminales de los genes VH y VL (sin las regiones C), sitios 5'NotI-3'XbaI para VH y 5'SpeI-3'BamHI para VL. Antes de la clonación, se utilizó una pareja adicional de cebadores complementarios para insertar la secuencia enlazadora (Gly4Ser)₃ entre VH y VL, mientras que se mantenían los sitios XbaI y SpeI. Fragmentos VH-enlazador-VL de tamaño completo fueron digeridos con NotI y BamHI y se clonaron en pBluescript II KS(+/-) digerido con NotI-BamHI (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos).

15 Los clones individuales de Bluescript se recogieron, el ADN plasmídico se purificó y se distribuyó de forma automatizada en placas de 96 pocillos, tal y como se describe en el documento WO99/11777. Los ADNs se sometieron a continuación a IVTT incluyendo ARNt-biotinil-lisina y se distribuyeron adicionalmente de forma automatizada en una matriz sobre una superficie de estreptavidina, tal y como se describe en el documento WO99/11777. La genoteca de scFv inicial inmovilizada de 10.000 clones independientes se escrutó a continuación incubando con Fab de IgE recombinante humano (véase el ejemplo 4). Los pocillos se bloquearon con PBS/BSA al 3% a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron tres veces en PBS y se trataron con 5 µg/ml de Fab de IgE humana en PBS/BSA al 3% durante 1 hora. Los pocillos se lavaron a continuación, tres veces más en PBS y se trataron con 5 µg/ml de anti-IgE quimérica marcada con fosfatasa alcalina (ejemplo 4) en PBS/BSA al 3% durante 1,5 h. Los pocillos se lavaron cinco veces más en PBS y se manifestó el color empleando los sustratos 5-bromo-1-cloro-3-indolil fosfato y nitro azul tetrazolio (Roche Molecular) para la visualización. Se observó que una fuerte señal observada con una frecuencia de 1 entre 9600 pocillos, se obtenía a partir de una pareja de VH y VL en la que ambas contenían CDR3 de E25.

25 Ejemplo 6 - Construcción de un anticuerpo anti-TNFα de Ratón Compuesto

Una genoteca de secuencias de la región variable de ratón se creó tal y como se describe en el ejemplo 1 para la genoteca humana, usando las bases de datos NCBI Igbblast, Kabat y Genbank. Las secuencias de referencia de la región variable del anticuerpo utilizadas eran un anticuerpo anti-TNFα quimérico conocido como Remicade[®] (Le et al., documento US6277969), utilizando las regiones variables del anticuerpo de ratón cA2. Segmentos procedentes de la genoteca de secuencias *in silico* de la región variable de ratón se seleccionaron de modo que se correspondieran parcialmente con los aminoácidos en la región variable de Remicade[®], pero incluyendo variaciones diseñadas para evitar epítopos de linfocitos T humanos en la secuencia, en forma de ligandos que no eran propios del CMH de clase II humano, medidos como en el ejemplo 1. Las secuencias de VH y VL de ratón compuestas comparadas con secuencias utilizadas en el anticuerpo quimérico, se muestran en la figura 8 indicando diferencias de 9 y 16 aminoácidos en VH y VL, respectivamente, entre los dos anticuerpos como resultado de la selección de segmentos para evitar epítopos en el anticuerpo de Ratón Compuesto.

40 Los anticuerpos de Ratón Compuesto y anti-TNFα quiméricos se generaron tal y como se ha descrito en el ejemplo 1. La comparación de los anticuerpos purificados en la unión a TNFα humano inmovilizado en un ELISA convencional (descrito en el documento WO 03/042247A2) mostró que el anticuerpo de Ratón Compuesto conservaba la capacidad de unión total del anticuerpo anti-TNFα quimérico (figura 9). La inmunogenicidad de estos anticuerpos se comparó a continuación, tal como se describe en el ejemplo 2, usando 24 muestras de sangre humana tipificadas para HLA-DR, en ensayos de linfocitos T. Los resultados mostraron que el anticuerpo anti-TNFα quimérico inducía respuestas proliferativas significativas (IE mayor que 2) en nueve de los veinticuatro donantes sanos analizados (37,5%), en comparación con el anticuerpo anti-TNFα de Ratón Compuesto, en donde ninguno de

los veinticuatro donantes (0%) inducían IE> 2. Estos resultados indicaban que un anticuerpo de Ratón Compuesto que comprende segmentos de la secuencia de la región variable obtenida totalmente a partir de regiones V de ratón, con selección de segmentos tales que evitan los epítomos de linfocitos T humanos, podría eliminar la inmunogenicidad en ensayos con linfocitos T humanos, mostrada por el anticuerpo quimérico correspondiente, sin ninguna medida para evitar los epítomos.

Ejemplo 7: Construcción de un anticuerpo anti-TNF α Humano Compuesto

Las secuencias de referencia de la cadena pesada y ligera de la región variable de ratón del anticuerpo A2 dirigido contra TNF α humano, se obtuvieron a partir del documento de patente de EE.UU. 5.656.272 (Fig. 10, SEQ. ID NO 1 y NO 2, respectivamente). Se preparó un modelo estructural con las regiones variables de referencia de ratón y se identificaron los aminoácidos decisivos para la conformación de las CDRs basándose en su distancia a las CDRs (<3Å) y su empaquetamiento probablemente cerca de las CDRs. Se identificaron residuos importantes, pero menos decisivos basándose en su distancia a las CDRs (>3Å <6Å) y su influencia probable sobre residuos más decisivos que se empaquetan más cerca de las CDRs. Se identificó un conjunto adicional de residuos basándose en su frecuencia de aparición en secuencias de anticuerpo de ratón, es decir, aminoácidos que se encontraban en un lugar determinado con una frecuencia inferior a 1%.

Los segmentos de la secuencia de la región V humana que incluían el mayor número posible de estos residuos (tabla 4) se seleccionaron para crear secuencias de VH y VL de longitud completa. Se realizaron alteraciones de estas secuencias para incluir todos los residuos identificados estructuralmente importantes para crear secuencias que servían como molde para evitar epítomos y para el diseño de Anticuerpos Humanos Compuestos. Una secuencia preferida para cada VH y VL compuesta, se diseñó para incluir residuos importantes a partir del anticuerpo de ratón de referencia. Estas secuencias de aminoácidos de cadena variable pesada y ligera se muestran en las figuras. 11 y 12. SEQ ID NO 3 y NO 4, respectivamente.

Tabla 4: Derivación de segmentos de secuencias de bases de datos de anticuerpos humanos para variantes CHAB primarias

(a) Cadena pesada

<u>Nº de orden de Genbank</u>	<u>Segmento de la secuencia</u>
CAA61442	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC
CAD88676	LSCVASGFIFS
CAB37182	FSNHWM
AAS86088	HWMNWVRQAPGKGLEWVA
CAC43592	AEI
ABB54411	IRSKS
AAL96548	SIN
AAK51359	NSA
CAA67405	SAT
CAB87447	ATHYA
AAD30769	HYAESVKGRFTISR
CAC 15703	RFTISRDDSKSI
AAQ05509	IVYLQM
AAT96742	YLQMTDLR
AAD20526	LRTEDTGVYYC
CAB44788	VYYCSRNY
AA038724	NYYGS
AAK14004	GSTY
AAD20470	TYDYWGQGT
AAB32435	DYWGQGTTVTVSS

(b) Cadena ligera

<u>Nº de orden de Genbank</u>	<u>Segmento de la secuencia</u>
CAC06686	DILLTQ
AAX57564	LTQSPAILSLSPGERATLSC
X72820	LSLSPGERATLSCRASQ

ES 2 417 133 T3

AAC15439	QFV
AAZ09058	VGSS
Z84907	SSI
AAL10835	IHWYQQK
AAQ21835	QQKPNQSPKLLIK
M27751	LLIKYAS
AAY16612	YASE
AAR89591	ES
AAD19534	SM
AAV71416	MSG
AAZ09098	GIP
CAG27043	PSRFSGSGSGTDFLTINSLE
AAQ21937	SLESEDA
AAC41988	ADYYCQQ
AAY33370	YYCQSHS
AAD19457	HSWP
AAQ55271	WPFTFGQGT
AAW69118	TFGQGTNLEIK

5 Las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera compuestas se rastrearon en busca de la presencia de posibles epítomos de linfocitos T, usando una variedad de métodos *in silico* (por ejemplo, Propred [<http://imtech.res.in/raghava/propred/index.html>], reconocimiento del plegamiento de péptidos [www.csd.abdn.ac.uk/gjlk/MHC-thread], SYFPEITHI (www.syfpeithi.de), CMHpred (www.jenner.ac.uk/MHCPred/), y se compararon con secuencias homólogas de la región estructural de la línea germinal humana junto con CDRs de referencia de ratón.

Se prepararon las siguientes variantes de la región variable de la cadena pesada (véase la Fig. 11):

SEQ. ID. NO. 5 contiene los siguientes cambios en relación con SEQ. ID. NO. 3: T82aN + R83K.

SEQ. ID. NO. 6 contiene los siguientes cambios en relación con SEQ. ID. NO. 3: T82aN + R83K + D82bS.

10 SEQ. ID. NO. 7 contiene los siguientes cambios en relación con SEQ. ID. NO. 3: T82aN + R83K + D82bS + V23A.

SEQ. ID. NO. 8 contiene los siguientes cambios en relación con SEQ. ID. NO. 3: T82aN + R83K + D82bS + V23A + V78A.

Se prepararon las siguientes variantes de la región variable de la cadena ligera (véase la Fig. 12):

15 SEQ. ID. NO. 9 contiene los siguientes cambios en relación con SEQ. ID. NO. 4: I10T + N103R.

SEQ. ID. NO. 10 contiene los siguientes cambios en relación con SEQ. ID. NO. 4: I10T + N103R + S80A.

SEQ. ID. NO. 11 contiene los siguientes cambios en relación con SEQ. ID. NO. 4: I10T + N103R + S80A + N41D.

20 Para la construcción de un anticuerpo quimérico testigo, las secuencias de nucleótidos que se traducen para proporcionar SEQ ID NO 1 y 2, se construyeron empleando una serie de oligonucleótidos sintéticos de 40 meros solapantes. Las secuencias de la región V estaban flanqueadas por secuencias 5' y 3' adicionales para facilitar la clonación en vectores de expresión de mamífero. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Figura 13 y la Figura 14. Los oligonucleótidos fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Poole, Reino Unido) y se resuspendieron con una concentración de 100 µM. Un µl de cada uno de los oligonucleótidos de hebra codificadora de la cadena pesada, excepto el oligonucleótido más 5', se mezclaron entre sí y 1,5 µl (aprox. 1 µg) de la mezcla se trató con cinasa de polinucleótido (PNK, Invitrogen, Paisley Reino Unido) en una reacción de 20 µl que contenía

5 adicionalmente: 2 μ l de tampón PNK 10x, 2 μ l de ATP 10 mM, 14 μ l de H₂O, 0,5 μ l (5 unidades) de PNK. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min y la enzima se termoinactivó a 70°C durante 20 min. Los oligonucleótidos no codificantes de la cadena pesada y los oligonucleótidos codificantes y no codificantes de la cadena ligera se fosforilaron de forma similar. El oligonucleótido 5' de cada grupo se diluyó 1 a 9 con H₂O y se añadieron 1,5 μ l a la mezcla de reacción apropiada. A continuación, cada reacción se diluyó hasta 0,5 ml y se dializó con rotación en un concentrador Amicon Microcon YM3 durante 90 min a 8000 rpm hasta que el volumen no era superior a 44 μ l.

10 Las mezclas codificantes y no codificantes de la cadena pesada, y las de la cadena ligera, se combinaron y se prepararon hasta 88 μ l con H₂O. Diez μ l de tampón de la reacción en cadena de la ligasa 10x (LCR) y 2 μ l de ligasa de Pfu (8 unidades, Stratagene, Cambridge, Reino Unido) se añadieron a cada reacción y se incubaron del modo siguiente en un bloque de calentamiento programable: 94°C durante 4 min, luego 60°C durante 3 min durante 1 ciclo, seguido por 20 ciclos a 94°C durante 39 s, a continuación, 60°C durante 2 min. Finalmente las reacciones se incubaron durante 5 min a 60°C. Diez μ l de cada LCR migraron a través de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se compararon con marcadores de escala de 1 Kb (Invitrogen). Se observó una mancha de ADN ligado en cada pista, en torno a una banda específica borrosa de aproximadamente 400 pb.

15 Las LCRs de la cadena pesada y ligera se amplificaron mediante PCR utilizando como cebadores SEQ ID NOs. 12 y 22 para la cadena pesada y SEQ ID NOs. 33 y 43 para la cadena ligera. En cada reacción se incluyó lo siguiente: 5 μ l de LCR, 5 μ l de 10x tampón Expand HiFi (Roche, Lewes Reino Unido), 1 μ l de una mezcla de NTPs 10 mM, 0,25 μ l de cada cebador (a partir de una reserva 100 μ M), 0,5 μ l de polimerasa Expand HiFi (3 unidades, Roche) y 38 μ l de H₂O. Las reacciones se ciclaron de la siguiente manera: 94°C 2 min seguido de 20 ciclos a 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s. Por último la reacción se incubó durante 5 min a 72°C. El rendimiento y la especificidad de la reacción se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa, como anteriormente. Se observaron, bandas nítidas específicas de aproximadamente 400 pb para cada reacción.

25 Los productos de la reacción se purificaron usando un kit de purificación de PCR de Qiagen y cada uno se eluyó en 30 μ l de H₂O. El producto de cadena pesada se digirió en una reacción convencional con las enzimas de restricción *Mlu* I y *Hind* III y el producto de la cadena ligera se digirió con *Bss*H II y *Bam*H I. Los productos de la reacción se purificaron otra vez usando un kit de purificación de PCR de Qiagen y cada uno se eluyó en 30 μ l de H₂O.

30 El vector de expresión de la cadena ligera pANT08 se basaba en una cadena principal de pAT153 y contiene, en el orden siguiente: un promotor CMV inmediato/potenciador temprano -590 a +7, una UTR 5' de 30 nt obtenida a partir de un ARN de la cadena ligera de un anticuerpo de ratón altamente expresado, una secuencia señal de consenso de la cadena ligera de de ratón que incorpora un sitio de restricción para *Bss*H II, cerca del codón de iniciación de la región variable, un enlazador corto (en lugar de una región variable) de un intrón compuesto humano que contiene 33 nt procedentes del sitio de corte y empalme de la región variable, con un sitio de restricción de *Bam*H I seguido por un fragmento de ADN genómico humano que contiene 343 nt del intrón que precede al gen de la región Kappa constante (CK) humana, el gen de CK y CK polIA.

35 El vector de expresión de la cadena pesada pANT09 era similar a pANT08 a lo largo de la región del promotor, que está seguida por: una UTR 5' de 62 nt obtenida a partir de la cadena pesada equivalente a la descrita anteriormente, una secuencia señal de consenso de la cadena pesada de ratón que incorpora un sitio de restricción de *Mlu* I cerca del codón de iniciación de la región variable, un enlazador corto (en lugar de una región variable) del sitio de corte y empalme de la región variable seguido inmediatamente por un fragmento de ADN genómico humano procedente de un sitio de restricción *Hind* III situado en el intrón 211 nt aguas arriba del gen de CH1, con el final del sitio poli A de la región CH. Este fragmento incluye intrones y exones de CH1, bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana. Este vector también incluía un gen de la dihidrofolato reductasa, controlado por un promotor SV40 y una señal poliA, para la resistencia al metotrexato.

45 Se digirieron 2 μ g de cada vector con las enzimas de restricción relevantes en reacciones convencionales en un volumen total de 30 μ l. Cada reacción se realizó en un gel de agarosa al 1%, como anteriormente, y las bandas específicas del vector (cadena pesada 6,0 Kpb y cadena ligera 4,2 Kpb) se escindieron del gel y se purificaron usando un kit de extracción en gel de Qiagen y se eluyeron en 30 μ l de H₂O.

50 Un μ l de cada vector digerido se ligó con 3 μ l del producto correspondiente de la PCR del gen variable digerido, utilizando un kit Ligafast (Promega, Southampton Reino Unido). Se transformaron 2,5 μ l de cada reacción de ligación en XL1-blue competente eficaz para la subclonación (Stratagene), según las instrucciones del fabricante, y se extendieron en placas de agar LB que contenían 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron durante una noche a 37°C. Diez colonias bacterianas de cada ligación se inocularon en 10 ml de 2x caldo YT que contenía 100 μ g/ml de ampicilina y se cultivaron durante una noche a 37°C con agitación. El plásmido se purificó a partir de 1,5 ml de cada cultivo realizado durante una noche, utilizando un kit de preparación de plásmidos de Qiagen y cada uno se eluyó en 50 μ l de H₂O. Los plásmidos fueron enviados a un centro de secuenciación contratado y se secuenciaron con un cebador promotor de CMV convencional y se identificaron los clones con la secuencia correcta del gen de la región V.

Para la construcción de Anticuerpos Humanos Compuestos, las secuencias de nucleótidos que se traducen para proporcionar SEQ. ID NO 3 y NO 4, se construyeron utilizando una serie de oligonucleótidos sintéticos solapantes de

40 meros. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Figura 15 y la Figura 16. La secuencia de nucleótidos que se traduce para proporcionar SEQ ID NO 5 se construyó a través de PCR solapante utilizando los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NOs. 94 y 95 (Figura 17), junto con los oligonucleótidos SEQ ID NOs. 53 y 63 y el ADN plasmídico de la variante primaria de la cadena pesada del Anticuerpo Humano Compuesto como molde. Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando como cebadores las parejas SEQ ID NOs. 53 y 95 o SEQ ID NOs. 94 y 63. A continuación se especifican los componentes incluidos en cada reacción: 1 µl (100 ng) de molde plasmídico, 5 µl de 10x tampón Expand HiFi (Roche), 1 µl de mezcla de NTPs 10 mM, 0,25 µl de cada cebador (procedentes de reservas 100 µM), 0,5 µl de polimerasa Expand HiFi (3 unidades, Roche) y 42 µl de H₂O. Las reacciones se ciclaron del modo siguiente: 94°C 2 min seguido de 20 ciclos a 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s. Por último, la reacción se incubó durante 5 min a 72°C. Las reacciones completadas se sometieron a electroforesis a través de un gel de agarosa al 1% y las bandas específicas de 295 pb y 126 pb se escindieron y se purificaron utilizando un kit de extracción en gel de Qiagen. Los ADNs se eluyeron en 30 µl de H₂O.

Los dos fragmentos purificados se unieron en una reacción de PCR usando los cebadores de oligonucleótido SEQ ID NOs. 53 y 63, utilizando condiciones de PCR tal y como se han descrito anteriormente, excepto que el molde utilizado era 1 µl del producto de 295 pb y 1 µl del producto de 126 pb, por lo tanto, la cantidad de H₂O se redujo a 41 µl. El producto de la PCR reunido de 396 pb se purificó usando un kit de purificación de PCR de Qiagen y se eluyó en 30 µl de H₂O.

La secuencia de nucleótidos que se traduce para proporcionar SEQ ID NO 6, se construyó mediante PCR solapante, utilizando los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NOs. 96 y 97 (Figura 17), junto con los oligonucleótidos SEQ ID NOs. 53 y 63 y el ADN plasmídico de la variante primaria de la cadena pesada del Anticuerpo Humano Compuesto como molde. Las dos reacciones de PCR se realizaron utilizando como cebadores parejas de SEQ ID NOs. 53 y 97 o de SEQ ID. NOs. 96 y 63. Las PCRs de las primeras etapas se realizaron tal y como se han descrito anteriormente y produjeron fragmentos de 295 pb y 126 pb. Estos fragmentos se purificaron, se unieron entre sí y se purificaron de nuevo, también como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de nucleótidos que se traduce para proporcionar SEQ ID NO 7, se construyó mediante PCR solapante utilizando los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NOs. 98 y 99 (Figura 17), junto con los oligonucleótidos SEQ ID NOs. 53 y 63, y el producto de PCR de SEQ ID NO 6 como molde. Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando como cebadores parejas de SEQ ID NOs. 53 y 99 o de SEQ ID NOs. 98 y 63. Las PCRs de las primeras etapas se realizaron tal y como se han descrito anteriormente y se produjeron fragmentos de 318 pb y 98 pb. Estos fragmentos se purificaron, se unieron entre sí y se purificaron de nuevo, también tal y como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de nucleótidos que se traduce para proporcionar SEQ ID NO 8, se construyó mediante PCR solapante utilizando los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NOs. 100 y 101 (Figura 17), junto con los oligonucleótidos SEQ ID NOs. 53 y 63, y el producto de la PCR de SEQ ID NO 7 como molde. Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando como cebadores parejas de SEQ ID NOs. 53 y 101 o de SEQ ID NOs. 100 y 63. Las PCRs de las primeras etapas se realizaron tal y como se han descrito anteriormente y se produjeron fragmentos 270 pb y 155 pb. Estos fragmentos se purificaron, se unieron entre sí y se purificaron de nuevo, también tal y como se ha descrito anteriormente.

Cada uno de los productos de las PCRs anteriores fue digerido con *Mlu* I y *Hind* III y se ligó en pANT09, digerido de manera similar. Las ligaciones se transformaron y se extendieron en placas, las colonias se seleccionaron, se prepararon los plásmidos y se secuenciaron todos tal y como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de nucleótidos que se traduce para proporcionar SEQ ID NO 9, se construyó mediante PCR utilizando los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NOs. 102 y 103 (Figura 17) y el ADN plasmídico de la variante primaria de la cadena ligera del Anticuerpo Humano Compuesto como molde. Se realizó una sola reacción de PCR, tal y como se ha descrito para las variantes de la cadena pesada, que proporcionó un producto de 383 pb. La reacción completada se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y la banda específica se escindió y se purificó usando un kit de extracción en gel de Qiagen. El ADN se eluyó en 30 µl de H₂O.

La secuencia de nucleótidos que se traduce para proporcionar SEQ ID NO 10, se construyó mediante PCR solapante utilizando los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NOs. 104 y 105 (Figura 17), junto con los oligonucleótidos SEQ ID NOs. 74 y 84, y el producto de la PCR de SEQ ID NO 9 como molde. Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando como cebadores parejas de SEQ ID NOs. 74 y 105 o de SEQ ID NOs. 104 y 84. Las PCRs de las primeras etapas se realizaron tal y como se han descrito anteriormente para las variantes de la cadena pesada y se obtuvieron fragmentos de 265 pb y 139 pb. Estos fragmentos se purificaron, se unieron entre sí para crear un producto de 383 pb y se volvió a purificar, también tal y como se ha descrito anteriormente para las variantes de la cadena pesada.

La secuencia de nucleótidos que se traduce para proporcionar SEQ ID NO 11, se construyó mediante PCR solapante utilizando los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NOs. 106 y 107 (Figura 17), junto con los oligonucleótidos SEQ ID NOs. 74 y 84, y el producto de PCR de SEQ ID NO 10 como molde. Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando como cebadores parejas de SEQ ID NOs. 74 y 107 o de SEQ. ID. NOs. 106 y 84. Las PCRs de las primeras etapas se realizaron tal y como se han descrito anteriormente para las variantes de la cadena

pesada y se obtuvieron fragmentos de 148 pb y 256 pb. Estos fragmentos se purificaron, se unieron entre sí para crear un producto de 383 pb y se volvió a purificar, también tal y como se ha descrito anteriormente para las variantes de la cadena pesada.

5 Cada uno de los productos de las PCRs anteriores fue digerido con *BssH II* y *BamH I* y se ligó en pANT08 digerido de manera similar. Las ligaciones se transformaron y se extendieron en placas, las colonias se seleccionaron, se prepararon los plásmidos y se secuenciaron todos tal y como se ha descrito anteriormente.

10 Las células CHO-K1 (ATCC nº CCL-61) se propagaron en DMEM con glucosa elevada que contenía 10% de FCS, L-glutamina, piruvato de sodio y L-prolina. Los cultivos casi confluentes se recogieron para transfectarlos utilizando Lipofectamina 2000 tal y como está indicado por el fabricante (Invitrogen). Las transfecciones se realizaron en placas de 48 pocillos sembradas con 200 µl de células, a 3×10^5 células/ml usando un total de 0,5 µg de ADN plasmídico que comprendía 0,3 µg de estructura artificial de cadena pesada y 0,2 µg de estructura artificial de cadena ligera.

15 Las transfecciones se incubaron a 37°C/5% de CO₂ durante 48 a 72 horas antes de recoger el material sobrenadante. La expresión de los anticuerpos se cuantificó mediante ELISA usando: un anticuerpo monoclonal de captura anti-IgG humana de ratón, patrones de IgG1/Kappa humana y HRP conjugada con cadenas ligeras Kappa anti-humanas de cabra como anticuerpo de detección (todos los reactivos eran de Sigma).

Todas las combinaciones de las cadenas pesadas y ligeras fueron transfectadas (es decir, 6 cadenas pesadas x 5 cadenas ligeras = 30 transfecciones). Los niveles de expresión de los anticuerpos estaban generalmente en el intervalo de 0,5 a 2,0 µg/ml, sin embargo, no se observó expresión con SEQ ID NO 8 de la cadena pesada.

20 Los anticuerpos expresados fueron sometidos a ensayo para estudiar su capacidad para neutralizar la actividad de TNFα humano utilizando células WEHI-164 sensibles a TNF (Espevik *et al.*, J. Immunol. Methods 1986, 95, 99-105). Las células se extendieron en placas en 1 µg/ml de actinomicina D con 5×10^4 células por pocillo, en placas de microtitulación de 96 pocillos, durante 3-4 horas. Las células se expusieron a TNF humano 40 pM y a concentraciones variables del anticuerpo quimérico (intervalo 1 ng/ml hasta 500 ng/ml) para crear una curva estándar. Las diversas combinaciones de cadenas pesadas y ligeras se sometieron a ensayo en un único punto de concentración de 25 ng/ml que se había determinado previamente como la DE₅₀ del anticuerpo quimérico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las mezclas se incubaron durante una noche a 37°C. La viabilidad celular se determinó añadiendo colorante bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) con una concentración final de 0,5 mg/ml, incubando durante 4 horas a 37°C, lisando las células en HCl 0,1 M, SDS al 0,1% y midiendo la densidad óptica con una longitud de onda de 550 nm.

25 Las densidades ópticas de las combinaciones de las cadenas pesadas y ligeras se utilizaron para calcular las concentraciones aparentes de anticuerpo a partir de la curva estándar. La concentración aparente del quimérico se dividió por la de cada una de las combinaciones de variantes para proporcionar un valor multiplicado de la diferencia. Los valores inferiores al del quimérico indicaron que las combinaciones eran más eficaces en la protección de las células frente a la toxicidad de TNFα, mientras que los valores más elevados indicaban que eran menos eficaces. Los valores para todas las combinaciones se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Relación entre las actividades de variantes de Anticuerpos Humanos Compuestos en comparación con el anticuerpo quimérico

SEQ. ID. NO.	1	3	5	6	7	8
2	1,00	1,38	1,24	1,20	1,02	ND
4	1,51	2,28	1,28	1,38	1,05	ND
9	1,28	2,14	1,32	1,77	0,95	ND
10	1,31	2,51	1,17	1,63	0,98	ND
11	16,90	15,15	196,49	134,08	105,61	ND

40 Las siguientes combinaciones de cadenas pesadas y ligeras del Anticuerpo Humano Compuesto proporcionaron diferencias multiplicadas cerca de 1,0: SEQ ID NOs. 5/10, SEQ ID NOs. 7/4, SEQ ID NOs. 7/9, SEQ ID NOs. 7/10. Estas combinaciones se seleccionaron para su posterior estudio.

45 Los plásmidos de expresión que eran portadores de las secuencias seleccionadas anteriormente se transfectaron en células NS0 (ECACC nº 85110503). Las células se cultivaron en DMEM con glucosa elevada que contenía L-glutamina, piruvato de sodio, 5% de FCS con IgG muy baja y penicilina/estreptomicina. Las células se recogieron durante la fase de crecimiento logarítmico, se centrifugaron y se resuspendieron para tener 5×10^6 células/ml en medio de crecimiento de nuevo aporte. Se mezclaron 750 µl células con un total de 30 µg de cada pareja de plásmidos, que se habían linealizado con *Ssp I*, en 50 µl de H₂O. La mezcla célula/plásmido se transfirió a una cubeta de hueco de 4 mm y se sometió a electroporación usando Equibio Easyject Plus a 250 V, 1500 µF,

- resistencia infinita. La electroporación se transfirió de inmediato a 25 ml de medio de cultivo precalentado y se extendió en placas de 5x 96 pocillos de fondo plano, con 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron a 37°C/5% de CO₂. Cuarenta y ocho horas después de la electroporación, 50 µl de medio que contenía metotrexato 300 nM se añadieron a cada pocillo para dar una concentración final de 100 nM. Siete días después de la electroporación, se añadieron a cada pocillo otros 50 µl de medio que contenía metotrexato 100 nM.
- Aproximadamente 2 semanas después de la electroporación, el medio en algunos de los pocillos empezó a ponerse amarillo, lo que indicaba el crecimiento de colonias transfectadas. El medio de estos pocillos se sometió a ensayo para estudiar la expresión del anticuerpo utilizando el ELISA de detección con conjugado de HRP cadena ligera Kappa de Ig anti-humana/ captura de Fc de IgG anti-humana. Las muestras del ensayo se compararon con un patrón de IgG1 humana/ Kappa y se estimaron los niveles de expresión del anticuerpo. Las colonias que expresaban cantidades útiles de anticuerpo se expandieron en medios que contenían metotrexato 200 nM.
- Los anticuerpos se purificaron a partir de medios de cultivo de 500 ml mediante cromatografía de afinidad a proteína A, seguida de cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando Sephacryl S200. Los anticuerpos purificados se cuantificaron mediante absorbancia UV a 280 nm, suponiendo que la DO₂₈₀ 1 = 1,4 mg/ml.
- Los anticuerpos quiméricos y compuestos purificados se sometieron a ensayo para estudiar la actividad a través del ensayo de protección WEHI-164, descrito en el ejemplo 4 anterior. Cada anticuerpo se sometió a ensayo todo el intervalo de concentración utilizado previamente para crear la curva estándar (véase la Figura 18). El Anticuerpo Humano Compuesto 7/10 (es decir, que contenía SEQ. ID. NOs. 7 y 10) se encontró que era la variante más activa y que tenía la misma actividad que el anticuerpo quimérico. Los Anticuerpos Humanos Compuestos 7/9 y 5/10 tenían una actividad similar que se redujo ligeramente en comparación con el anticuerpo quimérico, y el Anticuerpo Humano Compuesto 7/4 fue el menos activo.
- Por lo tanto, ya que el Anticuerpo Humano Compuesto 7/10 se había previsto que tendría el perfil de unión más favorable con el CMH de clase II y era la variante más activa, se seleccionó para someterlo a un ensayo del curso temporal de proliferación de linfocitos T. Las CMSPs humanas se prepararon a partir de la capa leucocitaria obtenida de donaciones de sangre humana, mediante dos rondas de centrifugación con gradiente de densidad de Ficoll. Las CMSPs preparadas se resuspendieron con una densidad de 3x10⁷ células/ml en partes alícuotas de 1 ml en 90% de suero humano AB /10% de DMSO, y se almacenaron en nitrógeno líquido. Las CMSPs fueron histotipificadas con un kit de tipificación con PCR Dynal Allset[®].
- El Anticuerpo Humano Compuesto guía se comparó con el anticuerpo quimérico en ensayos de linfocitos T de proteínas enteras, usando CMSPs humanas procedentes de 20 donantes sanos. Las CMSPs de cada donante se descongelaron, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo de suero AIM V exento de linfocitos. El día 1, se añadieron 50 µg de proteína a cultivos en masa de 2 ml de 4x10⁶ CMSPs en placas de 24 pocillos, y partes alícuotas de 100 µl por triplicado se retiraron y se transfirieron a placas de 96 pocillos los días 6 y 9. Cada parte alícuota se sometió a impulsos con 75 µl de medio que contenía 1 µCi de timidina tritiada durante 24 h, antes de recoger y medir la incorporación de radiactividad. Los resultados se normalizaron mediante el cálculo del índice de estimulación (IE).
- Una cobertura de una amplia gama de alotipos HLA DR se logró seleccionando donantes de acuerdo con haplotipos individuales del CMH.
- Los resultados del ensayo del curso temporal se muestran en la Figura 19 y mostraron que el anticuerpo quimérico (Figura 19(a)) provoca una respuesta de los linfocitos T (IE > 2) al menos un día en 10 de los 20 donantes. Por el contrario, el Anticuerpo Humano Compuesto (Figura 19(b)) no provocaba una respuesta en ninguno de los donantes en ningún momento. Por lo tanto, se construyó con éxito un Anticuerpo Humano Compuesto no inmunogénico a partir de segmentos de anticuerpos humanos utilizando un anticuerpo de ratón anti-TNFα (A2) como referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para escrutar una región variable de un anticuerpo compuesto o de un fragmento que se une a antígeno para evitar epítomos de linfocitos T, en donde el método comprende las siguientes etapas:

5 generar una genoteca que codifica regiones variables de anticuerpos compuestos o fragmentos que se unen a antígeno obtenidos a partir de múltiples péptidos con una secuencia de aminoácidos de 2 a 31 aminoácidos de longitud, procedentes de otros anticuerpos o fragmentos que se unen a antígeno, en donde los dos o varios péptidos no son ni CDRs completas ni regiones estructurales completas;

escrutar la región variable del anticuerpo o de un fragmento que se une a antígeno para evitar epítomos de linfocitos T; y

10 expresar y escrutar la genoteca de regiones variables de anticuerpos o fragmentos que se unen a antígeno con miras a la unión a uno o a varios antígenos de interés.

2. Un método según la reivindicación 1, en donde los dos o varios péptidos empleados para generar la genoteca se obtienen a partir de anticuerpos humanos.

ANTICUERPOS COMPUESTOS																				
Herceptin																				
Kabat	Cadena	Nombre	Seq ID	Subgrupo																
1	E	AL7.1	040564	III																
2	V																			
3	Q																			
4	L																			
5	V																			
6	E																			
7	S																			
8	G																			
9	G																			
10	G																			
11	L																			
12	V																			
13	Q																			
14	P																			
15	G																			
16	G																			
17	S																			
18	L																			
19	R																			
20	L																			
21	S																			
22	C																			
23	A																			
24	A																			
25	S																			
26	G																			
27	F																			
28	N																			
29	I	B-B10 M0'CL	020397	I	RECEPTOR ANTI-IL-2 HUMANA															
30	K																			
31	D																			
32	T																			
33	Y																			
34	I	NIE	000639	III																
35	H																			
36	W																			
37	V																			
38	R																			
39	Q																			
40	A																			
41	P																			
42	G																			
43	K																			
44	G																			
45	L																			
46	E																			
47	W																			
48	V																			

ANTICUERPOS COMPUESTOS						
Herceptin						
Kab at	Ca de na	Nombre	Seq ID	Subgrupo	Antigeno	
1	D	RSP1'CL	025071	I		
2	I					
3	Q					
4	M					
5	T					
6	Q					
7	S					
8	P					
9	S					
10	S					
11	L					
12	S					
13	A					
14	S					
15	V					
16	G					
17	D					
18	R					
19	V					
20	T					
21	I					
22	T					
23	C					
24	R					
25	A					
26	S					
27	Q					
28	D					
29	V	BCSYN11'CL	047196	I		
30	N					
31	T	IM9	036668	I	ANTIGEN ANTI-CARCINOEMBRIONARIO HUMANO	
32	A					
33	V					
34	A					
35	W					
36	Y					
37	Q					
38	Q					
39	K					
40	P					
41	G					
42	K					
43	A					
44	P					
45	K					
46	L	WES	004768	I		
47	L					
48	I					

49	Y					
48	S					
49	A					
50	S					
61	F	284959	043716	I		
52	L					
53	E	CAR	04811	I		
54	S					
57	G					
58	V					
59	P					
60	S					
61	R					
62	F					
63	S					
64	G					
65	S					
66	R	26C1	040096	I	ANTI-Rh(D)	
67	S					
68	G					
69	T					
70	D					
71	F					
72	T					
73	L					
74	T					
75	I					
76	S					
77	S					
78	L					
79	Q					
80	P					
81	E					
82	D					
83	F					
84	A					
85	T					
86	Y					
87	Y					
88	C					
89	Q	HuMc3	037000	IV	ANTI-BA46 (UNA GLICOPROTEINA DE 46 kDa DE LA MEMEBRANA GLOBULAR DE LA GRASA LÁCTEA HUMANA EXPRESADA EN CELULAS DE CARCINOMA DE MAMA)	
90	Q					
91	H					
92	Y					
93	T					
94	T	L612'CL	019751	IV	ANTI-GANGLIOSIDO GM3, II3NeuAc-LacCer	
95	P					
96	P					
97	T					
98	F					
99	G					
100	Q					
101	G					

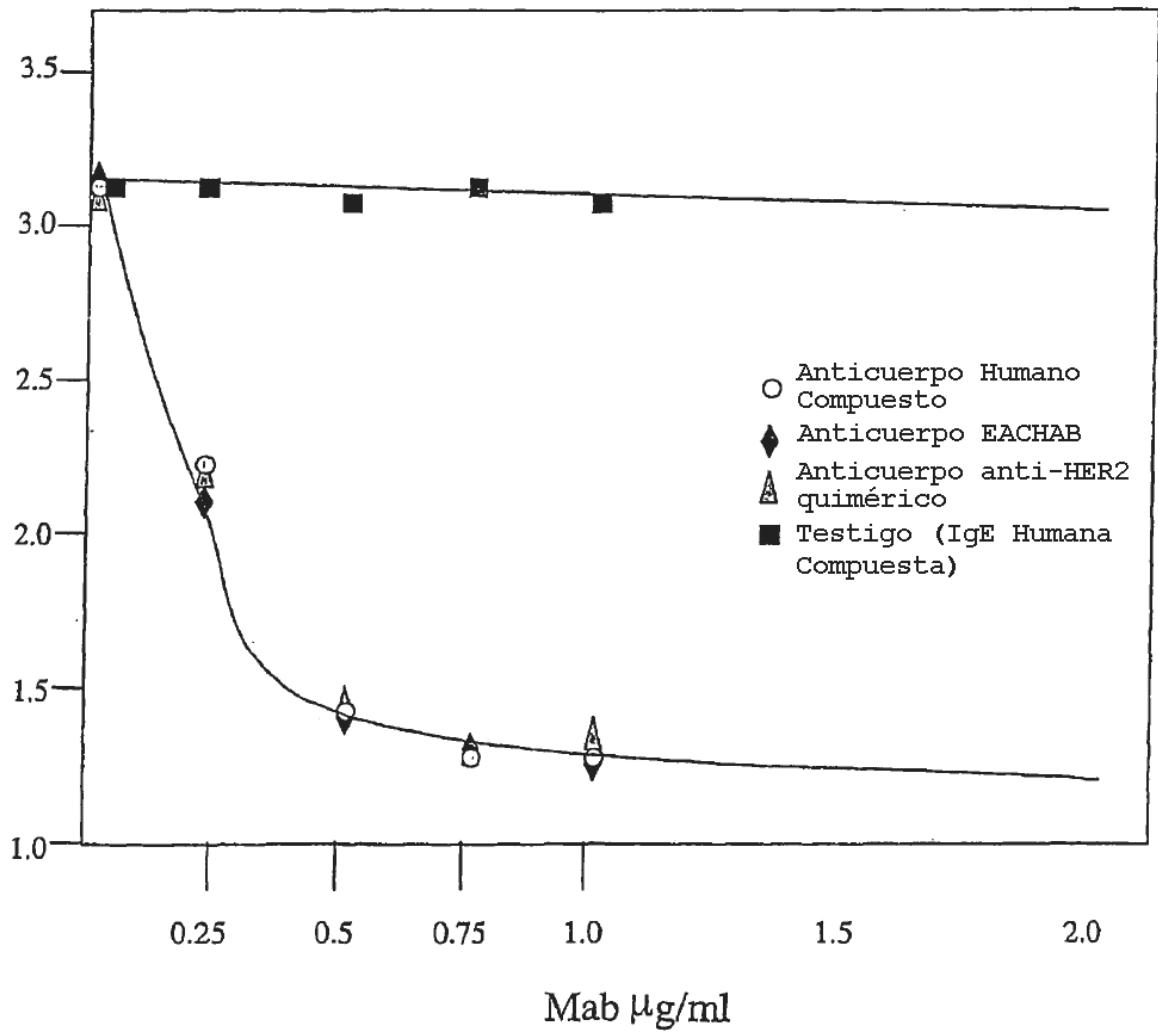


FIGURA 3

ANTICUERPOS COMPUESTOS						
HU3S193						
	Kab	Cad		Nombre	Seq ID	Subgrupo
	at	ena				
	1	1	E	HuKLVH'CL	026506	III
	2	2	V	KOL		
	3	3	Q			
	4	4	L			
	5	5	V			
	6	6	E			
	7	7	S			
	8	8	G			
	9	9	G			
	10	10	G			
	11	11	V			
	12	12	V			
	13	13	Q			
	14	14	P			
	15	15	G			
	16	16	R			
	17	17	S			
	18	18	L			
	19	19	R			
	20	20	L			
	21	21	S			
	22	22	C			
	23	23	S			
	24	24	S			
	25	25	S			
	26	26	G			
	27	27	F	B3	035926	III
	28	28	T			
	29	29	F			
	30	30	S			
CDR 1	31	31	D			
	32	32	Y			
	33	33	Y			
	34	34	M			
	35	35	Y			
	36	36	W			
	37	37	V			
	38	38	R			
	39	39	Q	FL2-H	036012	III
	40	40	A			
	41	41	P			
	42	42	G			
	43	43	K			
	44	44	G			
	45	45	L			
	46	46	E			
	47	47	W			

102	98	D		FS6	047328	II	ANTI-VH4-34							
103	99	G												
104	100	S												
105	100A	W		B3	035926	III								
106	100B	F												
107	100C	A												
108	100K	Y												
109	101	A												
110	102	V												
111	103	W												
112	104	G												
113	105	Q												
114	106	G												
115	107	T												
116	108	P		KOL	000662	III								
117	109	V												
118	110	T												
119	111	V												
120	112	S												
121	113	S												

FIGURA 4

ANTICUERPOS COMPUESTOS					
Xolair E25					
	Kab at	Cade na	Nombre	Seq ID	Subgrupo
	1	E			
	2	V			
	3	Q			
	4	L			
	5	V			
	6	E			
	7	S			
	8	G			
	9	G			
	10	G			
	11	L			
	12	V			
	13	Q			
	14	P			
	15	G			
	16	G			
	17	S			
	18	L			
	19	R			
	20	L			
	21	S			
	22	C			
	23	A			
	24	V	12G-1	00264	II
	25	S			
	26	G			
	27	Y			
	28	S	BF2N1-G4c08	044908	III
	29	I			
	30	T			
CDR 1	31	S	DA	040902	II
	32	G			
	33	Y			
	34	S			
	35	W			
	36	N			
	37	W	B1	000669	III
	38	I			
	39	R			
	40	Q			
	41	A			
	42	P			
	43	G			
	44	K			
	45	G	HuFd79	000657	III
	46	L			
	47	E			
	48	W			
	49	V			
	50	A			

CDR 2	61	50	S						
	52	61	I						
	53	52	T	BF2N2-g3A08	044852	III			
	54	53	Y						
	55	54	D						
	56	55	G						
	57	56	S						
	58	57	T	ARL14	039241	II			
	59	58	N						
	60	59	Y						
	61	60	N						
	62	61	P						
	63	62	S						
	64	63	V						
	65	64	K						
	66	65	G	66A 3.6	046821	I			
	67	66	R						
	68	67	I						
	69	68	T						
70	69	I							
71	70	S							
72	71	R	E54 3.10	000395	III				
73	72	D							
74	73	D							
75	74	S							
76	75	K							
77	76	N							
78	77	T							
79	78	F	CA	000717	III				
80	79	Y							
81	80	L							
82	81	Q							
83	82	M							
84	82A	N							
85	82B	S							
86	82C	L							
87	83	R							
88	84	A	hsighvm148	025873	III				
89	85	E							
90	86	D							
91	87	T							
92	88	A							
93	89	V							
94	90	Y							
95	91	Y							
96	92	C							
97	93	A							
98	94	R							
CDR 3	99	85	G						
	100	96	S						
	101	97	H	hu2.0	035863	III			
	102	98	Y						
	103	99	F	B9	024050	III			
	104	100	G						
	105	100A	H	HuRSV19VH	000763	II			
106	100B	W							

ANTICUERPOS COMPUESTOS							
Xolair E25							
	Kabat	Cadena	Nombre	Seq ID	Subgrupo	Antigeno	
	1	1	D				
	2	2	I				
	3	3	Q				
	4	4	L				
	5	5	T				
	6	6	Q				
	7	7	S				
	8	8	P				
	9	9	S				
	10	10	S				
	11	11	L				
	12	12	S				
	13	13	A				
	14	14	S				
	15	15	V				
	16	16	G				
	17	17	D				
	18	18	R				
	19	19	V				
	20	20	T				
	21	21	I				
	22	22	T				
	23	23	C				
CDR1	24	24	R				
	25	25	A	B43	037657	IV	ANTI-CD19
	26	26	S				
	27	27	Q				
	28	27A	S				
	29	27B	V				
	30	27C	D				
	31	27D	Y				
	32	28	D				
	33	29	G				
	34	30	D				
	35	31	S				
	36	32	Y				
	37	33	M	K-EV15	005133	I	
	38	34	N	STRAB SA-1A'CL	04743	I	AUTOANTICUERPO ANTI-ACTINA/ALFA-ACTININA
	39	35	W				
	40	36	Y				
	41	37	Q				
	42	38	Q				
	43	39	K				
	44	40	P				
	45	41	G				
	46	42	K				
	47	43	A				
	48	44	P				
	49	45	K				

FIGURA 8

VH compuesta

EVKLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFTFSNHWMNWVRQAPGKLEWVAEIRSKSINSATH
YAESVKGRFTISRDSKSVYLQMNDLKTEDTGVEVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFF
SNHWMNWVRQSPEKLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDSKSAVLQMTDLR
TEDTGVY

VH quimérica

VL compuesta

DILLTQSPDIQSVTPKEKVITICRASQFVGSSIHWYQQTDQSPKLLIKYASESMSGIPSRFSGS
GSGTDFTLTINSLESEDAADYYCQQSHSWPFTFGQDILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFV
GSSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESMSGIPSRFSGSGTDFTLSINTVESEDIADYCQQSHS
WPFTFGSG

VL quimérica

CDRs en negrita

Diferencias en el compuesto en
itálica/subrayado/negrita

FIGURA 9

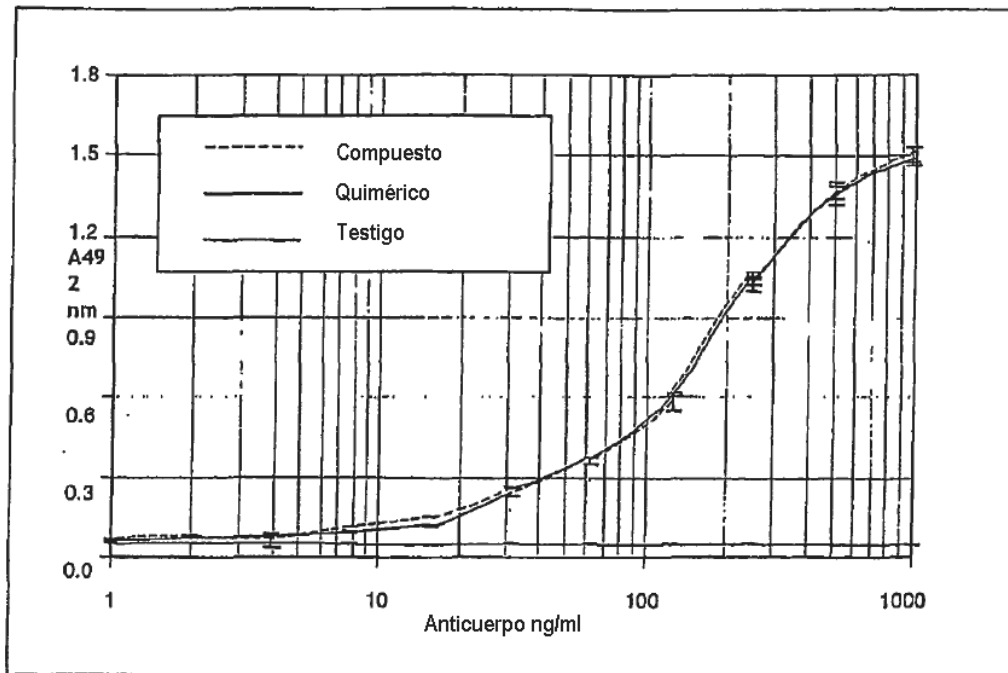


FIGURA 10

Secuencias de la región variable del anticuerpo anti-TNF α A2

(a) Cadena Pesada SEQ. ID. NO 1:

```

          10          20          30          40          50
EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLEWVAE

2ABC          60          70          80 2ABC          90
IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVIYCSR

100A          110
NYYGSTYDYWGQGTTTLTVSS
    
```

(b) Cadena Ligera SEQ. ID. NO 2:

```

          10          20          30          40          50
DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFVGSSIHWYQQRRTNGSPRLLIKY

          60          70          80          90          100
ASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLISINTVESEDIADYYCQQSHSWPFTFGS

107
GTNLEVK
    
```

FIGURA 11

Variantes de la cadena pesada de anticuerpos humanos compuestos

SEQ. ID. No. 3: 10 20 30 40 50
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVCVASGFIFSNHWMNWVRQAPGKGLEWVAE
 2ABC 60 70 80 2ABC 90
 IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMTDLRTEDTGVIYCSR
 100A 110
 NYYGSTYDYWGQGTITVTVSS

SEQ. ID. No. 5: 10 20 30 40 50
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVCVASGFIFSNHWMNWVRQAPGKGLEWVAE
 2ABC 60 70 80 2ABC 90
 IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNDLKTEDTGVIYCSR
 100A 110
 NYYGSTYDYWGQGTITVTVSS

SEQ. ID. No. 6: 10 20 30 40 50
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVCVASGFIFSNHWMNWVRQAPGKGLEWVAE
 2ABC 60 70 80 2ABC 90
 IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNSLKTEDTGVIYCSR
 100A 110
 NYYGSTYDYWGQGTITVTVSS

SEQ. ID. No. 7: 10 20 30 40 50
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFSNHWMNWVRQAPGKGLEWVAE
 2ABC 60 70 80 2ABC 90
 IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNSLKTEDTGVIYCSR
 100A 110
 NYYGSTYDYWGQGTITVTVSS

SEQ. ID. No. 8: 10 20 30 40 50
 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFSNHWMNWVRQAPGKGLEWVAE
 2ABC 60 70 80 2ABC 90
 IRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTGVIYCSR
 100A 110
 NYYGSTYDYWGQGTITVTVSS

FIGURA 12

Variantes de la cadena ligera de anticuerpos humanos compuestos

SEQ. ID. No. 4: 10 20 30 40 50
DILLTQSPAILSLSPGERATLSCRASQFVGSSIHWHYQQKTNQSPKLLIKY
 60 70 80 90 100
ASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLESEDAADYYCQQSHSWPFTFGQ
 107
GTRLEIK

SEQ. ID. No. 9: 10 20 30 40 50
DILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFVGSSIHWHYQQKTNQSPKLLIKY
 60 70 80 90 100
ASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLESEDAADYYCQQSHSWPFTFGQ
 107
GTRLEIK

SEQ. ID. No. 10: 10 20 30 40 50
DILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFVGSSIHWHYQQKTNQSPKLLIKY
 60 70 80 90 100
ASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAADYYCQQSHSWPFTFGQ
 107
GTRLEIK

SEQ. ID. No. 11: 10 20 30 40 50
DILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFVGSSIHWHYQQKTDQSPKLLIKY
 60 70 80 90 100
ASEMSGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAADYYCQQSHSWPFTFGQ
 107
GTRLEIK

FIGURA 13

Oligonucleótidos solapantes para la construcción de cadena pesada quimérica

(a) Oligonucleótidos de la cadena codificadora:

SEQ. ID. No.	Secuencia	Longitud
12	gttgctacgcgtgtccactccGAAGTGAAGCTTGAGGA	38
13	GTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAA	40
14	CTCTCCTGTGTTGCCTCTGGATTCATTTTCAGTAACCACT	40
15	GGATGAACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGA	40
16	GTGGGTTGCTGAAATTAGATCGAAATCTATTAATCTGCA	40
17	ACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCCACCATCT	40
18	CAAGAGATGATTCCAAAAGTGCTGTCTACCTGCAAATGAC	40
19	CGACTTAAGAACTGAAGACACTGGCGTTTATTACTGTAGC	40
20	AGGAACTATTACGGTTCAACCTACGACTACTGGGGCCAAG	40
21	GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGgtaagctttctggg	38

(b) Oligonucleótidos de la cadena no codificadora:

SEQ. ID. No.	Secuencia	Longitud
22	cccagaaagcttaccTGA	18
23	GGAGACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTAGTCGTAG	40
24	GTTGAACCGTAATAGTTCCTGCTACAGTAATAAACGCCAG	40
25	TGTCTTCAGTTCCTTAAGTCGGTCATTTGCAGGTAGACAGC	40
26	ACTTTTGGAATCATCTCTTGAGATGGTGAACCTCCCTTTC	40
27	ACAGACTCCGCATAATGTGTTGCAGAATTAATAGATTTCCG	40
28	ATCTAATTTTCAGCAACCCACTCAAGCCCTTCTCTGGAGA	40
29	CTGGCGGACCCAGTTCATCCAGTGGTACTGAAAATGAAT	40
30	CCAGAGGCAACACAGGAGAGTTTCATGGATCCTCCAGGTT	40
31	GCACCAAGCCTCCTCCAGACTCCTCAAGCTTCACTTCgga	40
32	gtggacacgcgtagcaac	18

FIGURA 14

Oligonucleótidos solapantes para la construcción de la cadena ligera quimérica

(a) Oligonucleótidos de la cadena codificadora

SEQ. ID. No.	Secuencia	Longitud
33	tcccaggecgcgatgtGACATCCTGCTGACACAATCTCC	40
34	AGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTC	40
35	TCCTGCAGGGCCAGTCAGTTGTTGGCTCAAGCATACACT	40
36	GGTATCAGCAGAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCAT	40
37	AAAGTATGCTTCTGAGTCTATGTCTGGGATCTCTTCCAGG	40
38	TTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCA	40
39	TCAACACTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTG	40
40	TCAACAAAGTCATAGTTGGCCGTTACGTTCCGGTCTGGG	40
41	ACAAATTTGGAAGTAAAacgtgagtagaatttaaactttg	40
42	cttcctcagttggatcctggcag	23

(b) Oligonucleótidos de la cadena no codificadora

SEQ. ID. No.	Secuencia	Longitud
43	ctgccaggatccaactgaggaagcaaagtttaaattctactca	43
44	cgTTTTACTTCCAAATTTGTCCCAGAACCGAACGTGAACG	40
45	GCCAACTATGACTTTGTTGACAGTAATAATCTGCAATATC	40
46	TTCAGACTCCACAGTGTGATGCTAAGAGTAAAATCTGTC	40
47	CCTGATCCACTGCCACTAAACCTGGAAGAGATCCCAGACA	40
48	TAGACTCAGAAGCATACTTTATGAGAAGCCTTGGAGAACC	40
49	ATTTGTTCTCTGCTGATACCAGTGTATGCTTGAGCCAACG	40
50	AACTGACTGGCCCTGCAGGAGAACTGACTCTTCTCTCTG	40
51	GACTCACAGACAGGATGGCTGGAGATTGTGTCAGCAGGAT	40
52	GTCacatcgcgccctggga	20

FIGURA 15

Oligonucleótidos solapantes para la construcción de cadena pesada del Anticuerpo Humano Compuesto

(a) Oligonucleótidos de la cadena codificadora:

SEQ. ID. No.	Secuencia	Longitud
53	gttgctacgcgtgtccactccGAAGTGCAGCTTGTGGA	38
54	GTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCTTGAAA	40
55	CTCTCCTGTGTTGCCCTCTGGATTTCATTTTCAGTAACCACT	40
56	GGATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTGA	40
57	GTGGGTTGCTGAAATTAGATCGAAATCTATTAATTCTGCA	40
58	ACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCATCT	40
59	CAAGAGATGATTCCAAAAGTATTGTCTACCTGCAAATGAC	40
60	CGACTTAAGAACTGAAGACACTGGCGTTTATTACTGTAGC	40
61	AGGAACTATTACGGTCAACCTACGACTACTGGGGCCAAG	40
62	GCACCACTGTACAGTCTCCTCAGgtaagctttctggy	38

(b) Oligonucleótidos de la cadena no codificadora:

SEQ. ID. No.	Secuencia	Longitud
63	cccagaaagcttacctGA	18
64	GGAGACTGTGACAGTGGTGCCCTGGCCCCAGTAGTCGTAG	40
65	GTTGAACCGTAATAGTTCCCTGCTACAGTAATAAACGCCAG	40
66	TGTCTTCAGTTCTTAAGTCGGTCATTTGCAGGTAGACAAT	40
67	ACTTTTGGAATCATCTCTTGAGATGGTGAACCTCCCTTTC	40
68	ACAGACTCCGCATAATGTGTTGCAGAATTAATAGATTTTCG	40
69	ATCTAATTTTCAGCAACCCACTCAAGCCCCTTCCCTGGAGC	40
70	CTGGCGGACCCAGTTCATCCAGTGGTACTGAAAATGAAT	40
71	CCAGAGGCAACACAGGAGAGTTTCAAGGATCCTCCAGGTT	40
72	GCACCAAGCCTCCTCCAGACTCCACAAGCTGCACTTCgga	40
73	gtggacacgcgtagcaac	18

FIGURA 16

Oligonucleótidos solapantes para la construcción de cadena ligera del Anticuerpo Humano Compuesto

(a) Oligonucleótidos de la cadena codificadora:

SEQ. ID. No.	Secuencia	Longitud
74	tcccaggegcgcgatgtGACATCCTGCTGACACAATCTCC	40
75	AGCCATCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCACTCTC	40
76	TCCTGCAGGGCCAGTCAGTTCGTTGGCTCAAGCATACT	40
77	GGTATCAGCAGAAAACAAATCAGTCTCCAAAGCTTCTCAT	40
78	AAAGTATGCTTCTGAGTCTATGTCTGGGATCTCTTCCAGG	40
79	TTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCA	40
80	TCAACAGTCTGGAGTCTGAAGATGCTGCAGATTATTACTG	40
81	TCAACAAAGTCATAGTTGGCCGTTACGTTCCGGTCAAGGG	40
82	ACAAATTTGGAAATAAAAcgtgagtagaatttaaactttg	40
83	cttcctcagttggatcctggcag	23

(b) Oligonucleótidos de la cadena no codificadora:

SEQ. ID. No.	Secuencia (20 meros 3' y 5')	Longitud
84	ctgccaggatccaactgaggaagcaaagtttaaattctactca	43
85	cgTTTTATTTCCAAATTTGTCCCTTGACCGAACGTGAACG	40
86	GCCAACTATGACTTTGTTGACAGTAATAATCTGCAGCATC	40
87	TTCAGACTCCAGACTGTTGATGGTAAGAGTAAAATCTGTC	40
88	CCTGATCCACTGCCACTAAACCTGGAAGAGATCCCAGACA	40
89	TAGACTCAGAAGCATACTTTATGAGAAGCTTTGGAGACTG	40
90	ATTTGTTTTCTGCTGATACCAGTGTATGCTTGAGCCAACG	40
91	AACTGACTGGCCCTGCAGGAGAGAGTGGCTCTTTCCTG	40
92	GACTCAGAGACAGGATGGCTGGAGATTGTGTCAGCAGGAT	40
93	GTCacatcgcgccctggga	20

FIGURA 17

Oligonucleótidos para la construcción
de variantes del Anticuerpo Humano Compuesto

(a) Cadena pesada:

SEQ.ID.No.	Secuencia (20 meros 3' y 5')	Longitud
94	CAAATGAACGACTTAAAACTGAAG	25
95	CTTCAGTTTTTAAGTCGTTTCATTTG	25
96	CAAATGAACAGCTTAAAACTGAAG	25
97	CTTCAGTTTTTAAGCTGTTTCATTTG	25
98	CTCTCCTGTGCTGCCTCTGG	21
99	CCAGAGGCAGCACAGGAGAG	21
100	CAAAGTATTGCCTACCTGC	21
101	CGAGGTAGGCAATACTTTG	21

(b) Cadena ligera:

SEQ.ID.No.	Secuencia (20 meros 3' y 5')	Longitud
102	tcccaggcgcgatgtGACATCCTGCTGACACAATCTCCAGCCACCCTGTCTC	54
103	ctgccaggatccaactgaggaagcaaagtttaaattctactcagTTTTATTCCAATCTTGTC	66
104	CAGTCTGGAGGCTGAAGATGC	21
105	CGATCTTCAGCCTCCAGACTG	21
106	GCAGAAAACAGATCAGTCTCC	21
107	GGAGACTGATCTGTTTTCTGA	21

Figure 18: Ensayo de protección WEHI-164 de variantes del Anticuerpo Humano Compuesto (CHAB)

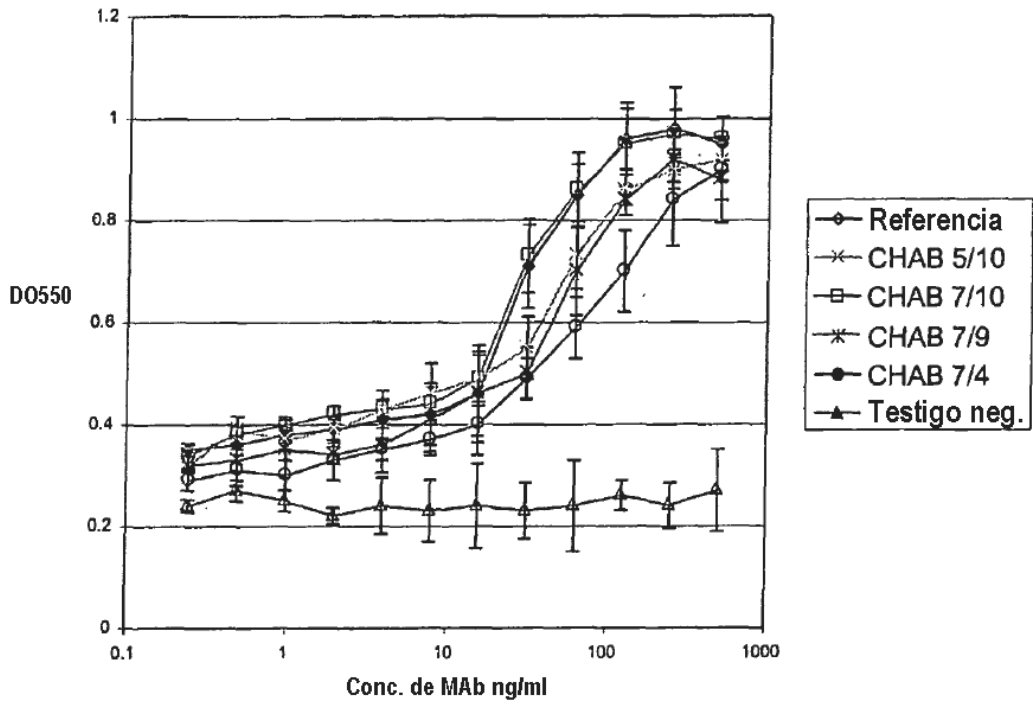
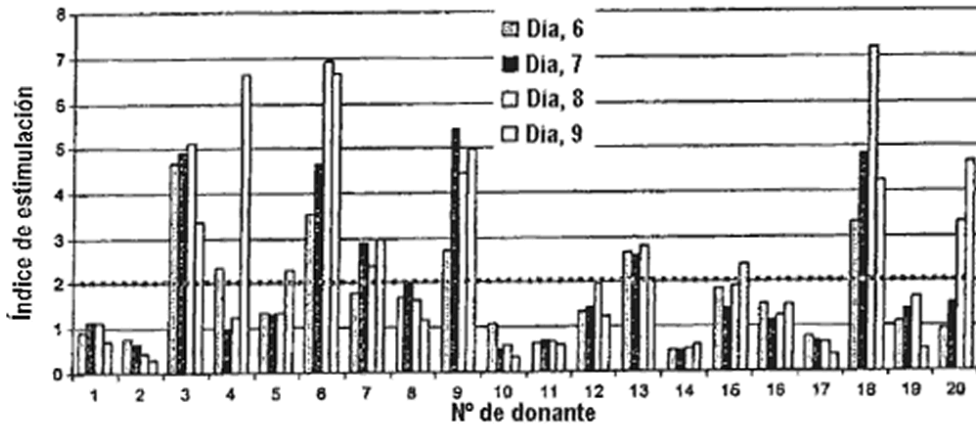


Figura 19: Ensayo del curso temporal de linfocitos T de Anticuerpo Humano Compuesto guía y de anticuerpo quimérico

(a) anti-TNF α quimérico



(b) Anticuerpo Humano Compuesto 7/10

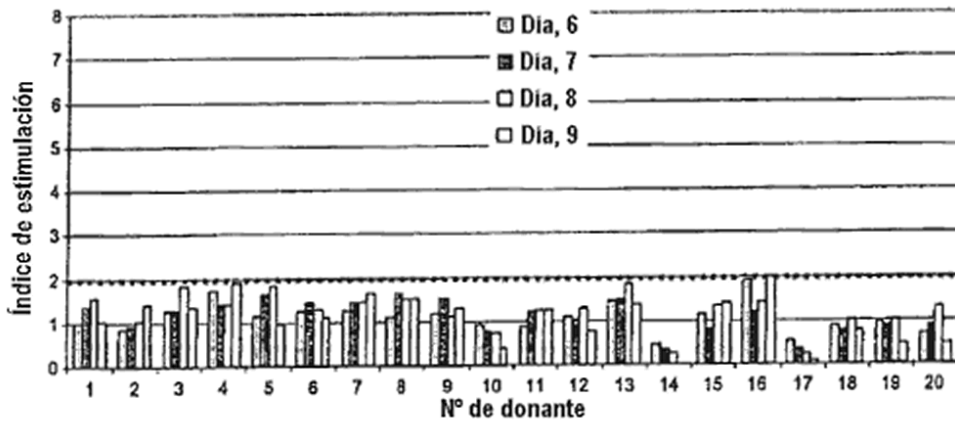


FIGURA 20

Actividad de variantes de bouganina

