

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 209**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2003 E 03791650 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 1542725**

54 Título: **Método de humanización de moléculas del sistema inmune**

30 Prioridad:

29.08.2002 US 230880

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

27.12.2013

73 Titular/es:

**ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION (100.0%)
2810 NORTH COMMERCE PARKWAY
MIRAMAR, FL 33025-3958, US**

72 Inventor/es:

**WONG, HING C.;
STINSON, JEFFREY R. y
MOSQUERA, LUIS A.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 436 209 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

Método de humanización de moléculas del sistema inmune

5 **Campo de la invención**

La presente invención presenta métodos para preparar moléculas del sistema inmune humanizadas. En un aspecto, la invención proporciona métodos para humanizar anticuerpos que implican optimizar la similitud de secuencia entre regiones flanqueantes de anticuerpo individuales en lugar de una región flanqueante o dominio variable más grande. La invención tiene un amplio espectro de aplicaciones incluyendo uso en la producción de anticuerpos monoclonales humanizados con afinidad de unión adecuada e inmunogenicidad humana minimizada.

Antecedentes de la invención

15 Existe un reconocimiento general de que los anticuerpos tienen usos importantes. Por ejemplo, se conoce que muchos detectan antígeno con especificidad exquisita. Se han informado anticuerpos policlonales y monoclonales. Véase de forma general *Molecular Biology of the Cell* (B. Alberts *et al.* Eds. 2ª edición) (1989) Garland Publishing, Inc., Nueva York y referencias citadas en el mismo.

20 Ha existido interés sustancial hacia la comprensión de la estructura y función del anticuerpo. Por ejemplo, se conoce mucho acerca de la estructura y función de los dominios variables (V). Casi todos los dominios V de anticuerpo incluyen regiones determinantes de complementariedad hipervariables ("CDR") y regiones flanqueantes ("FR"). Para la mayoría de las moléculas de anticuerpo, una CDR única se encuentra separada de otra CDR por medio de una FR intermedia. Se reconoce de forma general que las FR sirven como armazones moleculares que ayudan a posicionar los bucles de CDR en la configuración apropiada para el reconocimiento y unión a antígeno. Véase en general B. Alberts *et al.*, mencionado anteriormente, y referencias citadas en el mismo.

30 Muchos trabajadores han usado "armazón" para describir las FR en su totalidad a partir de un dominio variable de cadena ligera (VL) o un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo único. Por consiguiente, un dominio V de anticuerpo incluye subconjuntos de regiones flanqueantes individuales (FR1, FR2, FR3 y FR4) en los cuales cada subconjunto está enlazado a su CDR correspondiente (CDR1, CDR2 y CDR3). Un armazón consiste en los subconjuntos de región flanqueante en su totalidad a partir de un anticuerpo único.

35 Al menos para algunos anticuerpos, los restos de aminoácidos en las FR se cree que contribuyen a unión a antígeno. Véase Foote, J. y G. Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224: 487.

40 Ha habido intentos de uso de anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos. Sin embargo, el enfoque ha sido un reto al menos con determinados anticuerpos. Por ejemplo, se ha informado que algunos sujetos humanos desarrollan reacciones secundarias inmunes indeseables después de exposición a anticuerpos obtenidos a partir de fuentes no humanas. Estas reacciones, en algunos casos, pueden presentar problemas de salud graves y pueden presentar peligro para la vida.

45 Ha habido intentos de preparación de anticuerpos más inmunológicamente aceptables para los sujetos humanos. Aunque existen algunos informes de anticuerpos monoclonales humanos, se acepta de forma general que tales moléculas son difíciles de preparar y de usar.

50 Una estrategia alternativa para preparar anticuerpos más aceptables para los seres humanos ha sido introducir genes que codifican anticuerpos humanos en animales no humanos (por ejemplo ratones). Se ha informado que tales animales "transgénicos" preparan anticuerpos con secuencia humana. Sin embargo, la preparación de tales animales ha sido con frecuencia difícil y ha requerido mucho tiempo. También, estos ratones transgénicos están patentados y poseen menos repertorios de genes de anticuerpo humano que los óptimos.

55 Otro enfoque para preparar anticuerpos inmunológicamente aceptables ha sido el uso de tecnologías de ADN recombinante. Un concepto ha sido clonar y modificar anticuerpos no humanos de forma que las moléculas resultantes se parezcan a anticuerpos humanos. De forma colectiva, tales anticuerpos se han denominado "humanizados". Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.766.886 de Studnicka *et al.*; 5.693.762 de Queen *et al.*; 5.985.279 de Waldeman *et al.*; 5.225.539 de Winter; 5.639.641 de Pedersen, *et al.*, y referencias citadas en las mismas.

60 Se han propuesto varios enfoques específicos para humanizar anticuerpos.

65 Una estrategia implica preparar lo que se ha descrito como una molécula de anticuerpo quimérica. Típicamente, se usa un antígeno para inmunizar un animal no humano tal como un ratón. Después, anticuerpos monoclonales se preparan a partir del animal usando técnicas convencionales. Los genes que codifican el anticuerpo monoclonal se generan usando amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. Las secuencias aisladas que codifican dominios variables de anticuerpo murinos se fusionan genéticamente mediante tecnología de

ADN recombinante convencional con las secuencias que codifican los dominios constantes de anticuerpos humanos. Esta estrategia se ha usado para preparar un anticuerpo quimérico humano-ratón. Véase, por ejemplo, S. L. Morrison y V. Oi (1989) *Adv. Immunol.* 44: 65.

5 Desafortunadamente, ha habido informes de problemas en la preparación y el uso de algunos anticuerpos quiméricos. Específicamente, se han desvelado respuestas inmunes inaceptables después de la administración de los anticuerpos a sujetos humanos. También se cree que la semivida circulatoria reducida es un problema con al menos algunos anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Boulianne *et al.* en *Nature* 312: 643 (1984); Junghans *et al.* *Cancer Res.* 50: 1495 (1990) y Bruggemann *et al.* (1989) *J. Exp. Med.* 170: 2153.

10 Se han informado estrategias adicionales para preparar anticuerpos humanizados.

Un enfoque se ha descrito como “injerto de CDR” (denominado algunas veces “injerto de armazón” o “reestructuración de anticuerpo”). Se ha descrito que el injerto de CDR implica la inserción de CDR murinas en un dominio V humano. Las CDR murinas posteriormente se sustituyen por las CDR humanas correspondientes. Véase, Padlan *Mol. Immunol.* 28: 489 (1991). Habitualmente, todas las FR en el dominio V se obtienen a partir de un anticuerpo humano único. Algunas personas en el campo han predicho que las FR humanas del armazón posicionarán de forma correcta las CDR murinas para unirse a antígeno. La expectativa ha sido que tales anticuerpos evadirán el reconocimiento por el sistema inmune humano. Véase, por ejemplo, Jones *et al.* *Nature* 321: 522-525 (1986); Junghans *et al.*, mencionado anteriormente.

Sin embargo, han existido problemas con el uso de muchas técnicas de injerto de CDR.

25 Por ejemplo, algunos anticuerpos “injertados” tienen propiedades de unión a antígeno inaceptables. Véase Gorman, *et al.* *PNAS* (Estados Unidos) 88: 4181 (1991). Los intentos para mejorar la unión a antígeno, habitualmente mediante la adición de restos murinos nuevamente al dominio V injertado con CDR, no han sido siempre satisfactorios. Véase Queen *et al.*, *PNAS* (Estados Unidos) 86: 10029 (1989); y Col, *et al.*, *PNAS* (Estados Unidos) 88: 2869 (1991).

30 Se han realizado intentos adicionales para producir anticuerpos humanizados usando lo que se ha descrito como “*resurfacing* de anticuerpo” (sustitución selectiva en la superficie de las FR de residuos que difieren de los observados en FR humanas). Un enfoque ha sido reemplazar los restos de aminoácidos expuestos de un anticuerpo alogénico con aquellos encontrados habitualmente en anticuerpos hospedador. La esperanza ha sido reducir la inmunogenicidad del anticuerpo mientras que se conserva la mayor cantidad de función de unión a antígeno posible. Véase Roguska, *et al.* *PNAS* (Estados Unidos), 91: 969 (1994).

Desafortunadamente, ha habido problemas con el uso de muchas de las técnicas de reestructuración de anticuerpo anteriores.

40 Por ejemplo, muchos anticuerpos reestructurados se cree que muestran propiedades de unión a antígeno inaceptables. Véase E. Padlan *Mol. Immunol.* 28: 489 (1991). Además, la mayoría de las técnicas de reestructuración requieren conocimiento detallado acerca de la estructura del anticuerpo que se tiene que reestructurar. Con frecuencia es necesaria información sustancial acerca de la accesibilidad del disolvente y parámetros relacionados. Sin embargo, tal información no está siempre disponible para anticuerpos que necesitan humanizarse.

50 Una desventaja principal compartida por la mayoría de las técnicas de humanización de anticuerpo es que para que un anticuerpo deseado se pueda humanizar, se selecciona un armazón o dominio V relativamente grande para manipulaciones de injerto o reestructuración. El concepto del uso de tales segmentos de anticuerpo grandes como la base de la manipulación de anticuerpos no humanos ha producido resultados indeseables, por ejemplo, reducción de la afinidad de unión a antígeno y conservación de inmunogenicidad inaceptable. Para abordar estas deficiencias, se emplean esfuerzos adicionales para restaurar la afinidad. Estos esfuerzos típicamente terminan en un compromiso entre añadir suficientes restos de aminoácidos no humanos para reforzar la afinidad a la vez que no se añaden demasiados para que la inmunogenicidad tampoco aumente.

55 Más particularmente, se cree que la mayoría de las técnicas de humanización anteriores implican manipulaciones que usan un armazón de anticuerpo inaceptablemente grande, o peor aún, dominio V completo para humanizar anticuerpos. De acuerdo con un enfoque, un armazón o dominio V no humano grande se usa como un problema para identificar un conjunto de armazones humanos con identidad de secuencia aceptable con respecto al problema. El armazón humano identificado se dice frecuentemente que es el de “mejor ajuste” si muestra la identidad de secuencia mayor frente a la secuencia no humana problema con respecto a los parámetros de búsqueda usados.

60 Se cree que la práctica pasada de seleccionar armazones humanos de mejor ajuste en base a comparaciones con armazones o dominio V relativamente grandes ha obstaculizado los intentos de preparar y usar muchas moléculas del sistema inmune humanizadas. Por ejemplo, el uso de los métodos de humanización de anticuerpo anteriores se cree que no ha identificado muchas coincidencias de “mejor ajuste” potenciales. Es decir, mediante la limitación del

conjunto de coincidencias de “mejor ajuste” a armazones o dominios V, se ha comprometido la capacidad de humanizar muchos anticuerpos.

Adicionalmente, muchos métodos anteriores para preparar anticuerpos humanizados han buscado coincidencias de “mejor ajuste” usando secuencias de anticuerpo completas. Sin embargo, esta estrategia presenta desventajas significativas.

Por ejemplo, tales enfoques de búsqueda no pueden incluir secuencias de FR de anticuerpos humanos secuenciados de forma incompleta. Este defecto ha hecho difícil aprovecharse de colecciones más completas de información de secuencia de anticuerpo humano.

Se cree que los métodos anteriores de preparación de anticuerpos humanizados sufren de otras deficiencias.

Por ejemplo, existe el reconocimiento en el campo de que muchos anticuerpos humanos no muestran afinidad de unión a antígeno óptima. El impedimento estérico (denominado algunas veces interferencia) entre aminoácidos de las CDR no humanas adyacentes a las FR humanas y los restos de aminoácidos en emplazamientos clave en las FR (denominados restos de zona de vernier) se cree que contribuyen al problema. Debido a que se cree que los métodos de humanización anteriores no identifican muchas secuencias de FR humanas de “mejor ajuste” potenciales, la capacidad de abordar estos y otros problemas de interferencia relacionados ha estado limitada.

Sería útil disponer de métodos más eficaces para humanizar moléculas del sistema inmune. Más específicamente, sería útil disponer de métodos para preparar anticuerpos humanizados que impliquen la optimización de la similitud de secuencia entre subconjuntos de armazón individuales como la base para preparar moléculas del sistema inmune humanizadas con afinidad de unión adecuada e inmunogenicidad humana minimizada.

Sumario de la invención

La presente invención presenta métodos eficaces y útiles para humanizar moléculas del sistema inmune. En un aspecto, la invención proporciona métodos para preparar anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos que comprenden un dominio variable (V) que optimizan la similitud de secuencia entre subconjuntos de región flanqueante individuales (FR). Las comparaciones entre armazones de anticuerpo y/o dominios variables más grandes se evitan y las FR humanas de “mejor ajuste” seleccionadas se usan para preparar las moléculas del sistema inmune humanizadas. La invención tiene una amplia diversidad de aplicaciones importantes incluyendo su uso en la preparación de inmunoglobulinas humanizadas con afinidad de antígeno adecuada e inmunogenicidad humana minimizada.

Los inventores han descubierto un método novedoso para “humanizar” un amplio espectro de moléculas del sistema inmune, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de los mismos que comprenden un dominio variable. El método implica optimizar la similitud de secuencia entre al menos un subconjunto de FR no humano y al menos una FR humana correspondiente. La similitud de secuencia se optimiza para las cuatro FR (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4). Tal similitud de secuencia se puede optimizar considerando una FR a la vez (por ejemplo, FR consecutivas como FR1 y FR2) o más de una a la vez (por ejemplo, las cuatro FR juntas) según sea necesario para adaptarse al uso pretendido. Uno o más subconjuntos de FR humanos identificados que tienen la similitud de secuencia más elevada con respecto al subconjunto de FR no humano correspondiente se seleccionan para manipulación adicional. El subconjunto de FR humano con frecuencia se dice que es el “mejor ajuste” con respecto al subconjunto de FR no humano con el cual se ha comparado. La práctica de la invención implica además sustituir los subconjuntos de FR humanos “de mejor ajuste” por los subconjuntos de FR no humanos correspondientes. El uso preferido de la invención, por tanto, tiene por objeto maximizar la similitud de secuencia entre todos los subconjuntos de FR humanos y no humanos individuales. La optimización de la similitud de secuencia al nivel de los conjuntos de armazón (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4 juntas) y dominios variables completos se evita. Los subconjuntos de FR humanos de mejor ajuste seleccionados se usan posteriormente como componentes para ensamblar las moléculas del sistema inmune humanizadas desveladas en el presente documento.

La presente invención proporciona muchas ventajas importantes.

Por ejemplo, la práctica anterior ha detectado con frecuencia armazones humanos de mejor ajuste (es decir, FR1-4) en base a similitud entre conjuntos de armazones completos o dominios variables de anticuerpo. Este enfoque se cree que ha obstaculizado los esfuerzos para preparar y usar inmunoglobulinas humanizadas, por ejemplo, provocando una carencia de la sensibilidad de selección de FR. Adicionalmente, no se han identificado muchas coincidencias de mejor ajuste entre FR humanas individuales.

Más específicamente, se cree que los métodos de humanización anteriores tienen limitado de forma grave el número de posibilidades de mejor ajuste. Por el contrario, la práctica de la invención no está tan limitada. Es decir, el uso óptimo de la invención implica la identificación y la maximización de la similitud de secuencia al nivel de los subconjuntos de FR individuales. Las comparaciones de secuencias menos sensibles entre conjuntos de armazones muchos y/o dominios variables de anticuerpo más grandes se evitan de forma específica. Estas y otras ventajas

relacionadas proporcionadas por la invención expanden el número de posibilidades de mejor ajuste, típicamente mediante la media aritmética factorial del número de subconjuntos de FR en la molécula del sistema inmune que se tiene que humanizar. Esta característica de la invención potencia de forma sustancial las oportunidades de preparar y usar moléculas humanizadas, ayuda a reducir los costes asociados con los procedimientos de humanización y proporciona una base racional para ensamblar casi cualquier molécula del sistema inmune humanizada de interés.

A modo de ilustración, la presente invención se puede usar para humanizar un anticuerpo no humano deseado. En este ejemplo, el grupo de subconjuntos de FR humanos disponibles para comparación de secuencias es la media aritmética factorial de cada uno de los cuatro subconjuntos de armazón (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada una de las cadenas ligera y pesada para la cual está disponible la información de secuencia (incluyendo, significativamente, información de secuencia de FR a partir de secuencias de dominio variable incompletas). Un resultado clave es un aumento en el tamaño del grupo de al menos aproximadamente cuatro veces. En algunas realizaciones, el tamaño del grupo será aún más grande debido a disponibilidad de FR de mejor ajuste a partir de secuencias de dominio V incompleto. Esta es una ventaja significativa con respecto a los métodos anteriores, ya que refuerza el tamaño del grupo de subconjuntos de FR humanos disponible para selección. Las posibilidades de FR humana de mejor ajuste potenciales se mejoran de esta manera. Por consiguiente, las posibilidades de detectar un subconjunto de FR humano de mejor ajuste son más elevadas de acuerdo con la invención en comparación con enfoques pasados.

La práctica de la presente invención proporciona otras ventajas significativas.

Como se ha descrito, es un objeto de la invención optimizar y seleccionar el mejor ajuste para cada subconjunto de FR no humano que se tiene que humanizar. Este proceso, a diferencia de los enfoques pasados, se conduce básicamente de forma independiente de otras FR dentro de la molécula del sistema inmune objeto. Por tanto, el número de aminoácidos no coincidentes, en la medida en que existan, será sustancialmente inferior utilizando el método de la invención. A diferencia de los métodos pasados que con frecuencia están limitados por el grupo de anticuerpos humanos completamente secuenciados y dominios variables disponibles, el uso de la invención proporciona nuevas oportunidades para seleccionar subconjuntos de FR humanos de mejor ajuste. La invención proporciona además mejores posibilidades de detectar FR humanas de mejor ajuste sin coincidencias o con pocas coincidencias en comparación con la FR no humana correspondiente. La práctica de los presentes métodos por tanto mejorará las oportunidades de preparación y uso de una amplia diversidad de moléculas del sistema inmune. De forma importante, tales métodos se pueden usar para preparar anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos que comprenden un dominio variable cuya afinidad de unión a antígeno está sustancialmente conservada en comparación con una molécula no humana o quimérica parental a partir de la cual se ha obtenido.

Por consiguiente, y en un aspecto, la invención proporciona un método para producir un dominio variable (V) de anticuerpo humanizado. En la mayoría de las realizaciones, el método incluye al menos una y preferentemente todas las etapas siguientes.

Típicamente, se compara al menos una secuencia de aminoácidos de un subconjunto de FR de anticuerpo no humano deseado, preferentemente menos de aproximadamente cuatro de tales FR, más preferentemente aproximadamente una FR tal como FR1 o FR2, con un grupo de secuencias de aminoácidos humanas de anticuerpo o de dominio variable o fragmentos de los mismos correspondientes. En la mayoría de los casos, una colección de secuencias de aminoácidos de armazón de anticuerpo humano correspondiente se usa para la comparación aunque se pueden usar otras colecciones para algunas aplicaciones incluyendo colecciones de secuencias de armazón parciales. Un subconjunto de FR humano correspondiente se selecciona a partir del grupo que tiene el mejor ajuste con respecto al subconjunto de FR no humano correspondiente. En general, un subconjunto de FR humano de mejor ajuste adecuado mostrará una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75%, preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90% hasta aproximadamente el 100% en comparación con el subconjunto de FR no humano correspondiente.

Posteriormente, el subconjunto de FR no humano se mutageniza para codificar básicamente el subconjunto de FR humano de mejor ajuste identificado anteriormente. Se puede usar uno o una combinación de procedimientos de mutagénesis convencionales como se ha descrito más adelante. Preferentemente, la mutagénesis del subconjunto de FR no humano se conduce para producir un subconjunto de FR humanizado (denominado algunas veces "huFR") que es sustancialmente idéntico al subconjunto de FR humano seleccionado, es decir, al menos aproximadamente el 75% idéntico, preferentemente al menos aproximadamente el 80% idéntico, más preferentemente al menos aproximadamente el 90% idéntico hasta aproximadamente el 100% idéntico al subconjunto seleccionado.

Las etapas de humanización anteriores de la invención se pueden repetir, según sea necesario, para humanizar uno o más subconjuntos de FR deseados del dominio V no humano. Más específicamente, las etapas se pueden repetir una, dos, tres o incluso más veces y en condiciones que producen una pluralidad de secuencias de ADN en las cuales cada secuencia de ADN codifica un subconjunto de huFR correspondiente. En la mayoría de los casos (por ejemplo, como cuando es necesaria una molécula del sistema inmune completamente humanizada), será útil repetir las etapas aproximadamente tres a cuatro veces para humanizar cada uno de los subconjuntos de FR (FR1, FR2, FR3 y FR4). Por tanto en realizaciones en las cuales un anticuerpo no humano es de interés, cada uno de los

subconjuntos de FR en cada una de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se someterá a las etapas de humanización mencionadas anteriormente.

5 La práctica satisfactoria de la invención no depende de ningún orden particular de humanización de las FR no humanas siempre y cuando se consigan los resultados pretendidos.

10 Posteriormente una o una combinación de las secuencias de ADN que codifican los subconjuntos de huFR se sustituyen en un (primer) vector adecuado usando enfoques recombinantes convencionales. Preferentemente, el primer vector codifica al menos el dominio V del anticuerpo no humano que se tiene que humanizar. Sin embargo en algunas realizaciones, el primer vector codifica además un dominio constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina o un fragmento del mismo unido covalentemente al dominio V.

15 Las etapas de sustitución preferidas se llevan a cabo en forma general en condiciones en las que al menos una y preferentemente todas las secuencias de ADN de huFR se usan como un reemplazo de uno o más subconjuntos de FR no humanos correspondientes codificados por el vector. El orden de la sustitución de FR habitualmente no es importante siempre que se produzca la molécula humanizada pretendida. Por tanto, por ejemplo, una FR1 no humana se puede humanizar en primer lugar seguido por FR2 no humana. Como alternativa, la FR2 no humana se puede humanizar antes que la FR1 no humana. Las etapas de sustitución preferidas se llevan a cabo de acuerdo con manipulaciones convencionales y dan como resultado que cada uno de los subconjuntos de huFR está unido operativamente a una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) correspondientes.

25 El primer vector se puede emplear para expresar una o más moléculas del sistema inmune humanizadas codificadas en un amplio espectro de células hospedadoras adecuadas como se describe más adelante. En general los métodos preferidos contribuyen a expresar el dominio V de anticuerpo humanizado en las células hospedadoras. Los métodos preferidos adicionales son completamente compatibles con los enfoques que tienen por objeto purificar la molécula humanizada de los constituyentes celulares que la acompañan.

30 La invención es completamente compatible con una amplia diversidad de enfoques recombinantes que convierten a un aminoácido no humano en cada posición no coincidente en un subconjunto de FR no humano dado en un aminoácido humano deseado. Un ejemplo de un enfoque recombinante aceptable es la mutagénesis dirigida o el método basado en PCR relacionado. Debido a que el grupo de subconjuntos de FR humanos de mejor ajuste potenciales es más grande de acuerdo con la invención, existe una probabilidad mucho más elevada de identificar un subconjunto de FR humano con menos faltas de coincidencia. Esta característica de la invención ayuda a reducir el número de faltas de coincidencia de FR que se necesita considerar cuando una molécula del sistema inmune particular se tiene que humanizar. Estas y otras ventajas de la invención ayudan a reducir los gastos de costo y tiempo que son típicos de muchos métodos de humanización anteriores.

40 Como se ha descrito, la mayoría de los enfoques de humanización anteriores han estado obstaculizados por unión a antígeno inaceptable de las moléculas resultantes. Más específicamente, la mayoría de los anticuerpos humanizados anteriores muestra una afinidad demasiado baja por el antígeno afin en comparación con la molécula parental. Muchos anticuerpos quiméricos parentales tienen características de unión a antígeno mejores que la versión humanizada del anticuerpo. Sin el deseo de limitarse por la teoría, se cree que tal unión a antígeno inaceptable se puede atribuir, en gran parte, al impedimento derivado de uno o más aminoácidos en los subconjuntos de FR proximales a las CDR (los restos de zona de vernier). Existen informes de que al menos para algunos anticuerpos, los restos de la zona de vernier pueden contribuir a unión a antígeno por el dominio V del anticuerpo.

50 Los intentos pasados de minimizar los problemas de impedimento de la zona de vernier han sido en gran parte no satisfactorios o necesitan algoritmos informáticos sofisticados para corregir y éstos dependen en gran parte de conocimiento de modelado molecular basado en ordenador y estructural.

55 Por ejemplo, en un enfoque, se ha usado software de modelado asistido por ordenador para ayudar a reducir el impedimento. Tal software con frecuencia es complicado y difícil de usar. La presente invención aborda el problema optimizando la detección y selección de subconjuntos de huFR de mejor ajuste sin la asistencia de software complicado. Es decir, la invención proporciona más candidatos de mejor ajuste, reduciendo de ese modo las probabilidades de falta de coincidencia en la zona de vernier y en otros lugares en la molécula del sistema inmune que se tiene que humanizar. Por consiguiente, el uso de la invención puede mantener de forma significativa la afinidad de unión a antígeno de la molécula del sistema inmune parental. Esta ventaja de la invención es especialmente importante cuando un anticuerpo no humano de interés tiene una afinidad inusualmente elevada ($K_d > 10^9$ M o mayor) por el antígeno. En tales situaciones, la afinidad elevada con frecuencia impone exigencias en el mantenimiento de las CDR en la configuración adecuada. La invención proporciona cumplimiento sustancial con estas exigencias minimizando o eliminando el potencial de incompatibilidades de zona de vernier. La práctica pasada ha usado cristalografía de rayos X o información de anticuerpo basada en ordenador para ayudar a abordar las incompatibilidades de zona de vernier. De forma significativa, la invención reduce y en muchos casos evita la necesidad de esta información por parte del usuario.

Otros aspectos de la invención se describen más adelante.

Breve descripción de los dibujos

5 Las Figuras 1A y 1B muestran las secuencias de ácido nucleico (SEC ID N°: 1 y 3) y de aminoácidos (SEC ID N°: 2 y 4) de dominios variables de cadena ligera y cadena pesada de H36.D2.B7, el anticuerpo anti-factor tisular murino, con regiones hipervariables (CDR o Regiones Determinantes de Complementariedad) subrayadas (subrayado único para secuencias de ácido nucleico y subrayado doble para secuencias de aminoácidos).

10 La Figura 2 es un dibujo que muestra un mapa de plásmido de vector de expresión de anticuerpo IgG1 anti-FT humanizado (pSUN-34).

15 Las Figuras 3A-D son secuencias de dominios variables de cadena ligera (LC) parcialmente y completamente humanizados del anticuerpo anti-FT (SEC ID N°: 72-82). La Figura 3A muestra la secuencia denominada "LC-09" que es ilustrativa de un armazón de LC completamente humanizado (SEC ID N°: 79). Las secuencias de CDR de cadena ligera de cH36 y LC-09 se muestran en las Figuras 3B-D (SEC ID N°: 103, 6 y 7, respectivamente).

20 Las Figuras 4A-D son dibujos que muestran las secuencias de dominios variables de cadena pesada (CH) parcialmente y completamente humanizados del anticuerpo anti-FT (SEC ID N°: 83-96). La Figura 4A muestra la secuencia denominada "HC-08", que es ilustrativa de un armazón de HC completamente humanizado (SEC ID N°: 91). Las secuencias de CDR de cadena pesada de cH36 y HC-08 se muestran en las Figuras 4B-D (SEC ID N°: 104, 104, 9, 101, 10 y 10, respectivamente).

25 Las Figuras 5A-B son secuencias que muestran dominios constantes humanos en el anticuerpo anti-factor tisular de IgG1 (hOAT), con la Figura 5A mostrando el dominio constante de cadena ligera kappa humano (SEC ID N°: 97) y la Figura 5B mostrando el dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEC ID N°: 98). Las Figuras muestran las secuencias de aminoácidos del dominio constante de hOAT (IgG1).

30 Las Figuras 6A-B son secuencias que muestran dominios constantes humanos en el anticuerpo anti-factor tisular de IgG4 (hFAT) con la Figura 6A mostrando el dominio constante de cadena ligera kappa humano (SEC ID N°: 99) y la Figura 6B mostrando el dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana (SEC ID N°: 100).

35 Las Figuras 7A y 7B muestran las secuencias de ácido nucleico (SEC ID N°: 105 y 107) y de aminoácidos (SEC ID N°: 106 y 108) de los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada de A110, el anticuerpo anti-LTA quimérico, con regiones hipervariables (CDR o Regiones Determinantes de Complementariedad) subrayadas (subrayado único para secuencias de ácido nucleico y subrayado doble para secuencias de aminoácidos).

40 La Figura 8 es un dibujo que muestra un mapa de plásmido de un vector de expresión que codifica IgG1 anti-LTA humanizada (pJRS 391).

45 Las Figuras 9A-H son dibujos que muestran las secuencias de dominios variables parcialmente y completamente humanizados del anticuerpo anti-LTA. La Figura 9A muestra la secuencia de las regiones flanqueantes de dominio variable de cadena ligera (LC) humanizadas (SEC ID N°: 109-114, respectivamente). Las Figuras 9B-D muestran CDR1-3 de cadena ligera (SEC ID N°: 115-117, respectivamente). La Figura 9E muestra las secuencias de regiones flanqueantes de dominio variable de cadena pesada (HC) parcialmente y completamente humanizadas (SEC ID N°: 118-123, respectivamente). Las Figuras 9F-K muestran CDR1-3 de cadena pesada (SEC ID N°: 124-126, respectivamente).

50 La Figura 10 es una tabla que muestra las construcciones de plásmido que producen anticuerpo A110 humanizado para evaluación.

55 La Figura 11 es un gráfico que muestra la determinación de expresión de anticuerpo mediante anti-LTA humanizado mediante plásmidos diferentes.

60 La Figura 12 es un gráfico que muestra la determinación de unión a LTA.

Descripción detallada de la invención

65 Como se ha descrito, la invención presenta métodos para preparar moléculas del sistema inmune humanizadas. Los ejemplos de tales moléculas incluyen dominios variables (V) de anticuerpo humanizado, anticuerpos humanizados (quiméricos y monoclonales) así como también fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, la invención proporciona métodos nuevos para humanizar anticuerpos que implican optimizar la similitud de secuencia

entre al menos un subconjunto de armazón (FR) no humano, típicamente dos, tres o cuatro de tales subconjuntos y uno o más subconjuntos de FR humanos correspondientes. Al menos un subconjunto de FR humanizado seleccionado (huFR) se sustituye por el subconjunto de FR no humano correspondiente para humanizar la molécula. Las moléculas del sistema inmune humanizadas preferidas de la invención presentan buena afinidad de unión a antígeno e inmunogenicidad mínima en sujetos humanos.

Las ventajas del uso de la presente invención para humanizar moléculas del sistema inmune se demuestran a través de toda la divulgación incluyendo los Ejemplos 6-9, más adelante. Como se ha descrito, una diferencia clave entre los intentos de humanización pasados y la presente invención es que los métodos de la invención buscan FR con el mejor ajuste. Por el contrario, los intentos anteriores han usado armazones completos (habitualmente obtenidos a partir de un dominio variable de anticuerpo único) o, peor aún, dominios variables completos para determinar los mejores ajustes. Por tanto con los presentes métodos las FR identificadas se pueden obtener a partir de tanto como cuatro anticuerpos diferentes para cada cadena de anticuerpo o un total de ocho FR por anticuerpo. Esta característica de la invención expande enormemente el grupo disponible de FR de mejor ajuste detectable. Esta flexibilidad en la búsqueda de las FR con el mejor ajuste da como resultado menores limitaciones sobre la búsqueda de forma que se pueden considerar más FR. Estos beneficios ayudan a proporcionar mejores ajustes que necesitan menos sustituciones de aminoácidos, menos cambios en los restos de vernier y mejores puntuaciones de homología o identidad. En la búsqueda de un armazón completo que tenga el mejor ajuste, el resultado es un compromiso del mejor ajuste sobre ese armazón completo. En algunos ejemplos, los armazones completos de ambas cadenas se toman a partir de un anticuerpo único o en una búsqueda menos limitada, los armazones de cada cadena pueden venir de anticuerpos diferentes.

Más particularmente, el Ejemplo 6 mostrado más adelante proporciona una comparación *in silico* entre un intento pasado de humanizar el anticuerpo anti-TAC y los métodos de la presente invención (denominados algunas veces en el presente documento "Humanización de Mejor Ajuste de FR"). Como se muestra en este ejemplo, el uso de la presente invención proporciona un resultado de humanización superior. Es decir, la humanización virtual del anticuerpo anti-TAC de acuerdo con la presente invención produce un anticuerpo mejor.

Las ventajas adicionales del uso de la invención son evidentes a partir de los resultados *in silico* mostrados en el Ejemplo 7 (anticuerpo Mc3); Ejemplo 8 (anticuerpo anti-FT); y Ejemplo 9 (anticuerpo anti-LTA). En estos Ejemplos incluyendo el Ejemplo 6, la humanización virtual de anticuerpos descritos produce un anticuerpo humanizado superior cuando se contrasta con enfoques de humanización anteriores. Por tanto, la invención tiene aplicación general que se puede usar para preparar y usar una amplia diversidad de moléculas del sistema inmune humanizadas.

Como se ha descrito, la invención se puede usar para humanizar un amplio espectro de moléculas del sistema inmune tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos que comprenden un dominio variable. Los métodos de la invención particulares se pueden usar para producir un dominio variable (V) de anticuerpo humanizado. En una realización, el método incluye al menos una y preferentemente todas las etapas siguientes:

- a) comparar la secuencia de aminoácidos de un subconjunto de región flanqueante (FR) de un dominio variable (V) de anticuerpo no humano con una colección de armazones de anticuerpo humano o secuencias de aminoácidos de dominio variable o secuencias de fragmentos de los mismos,
- b) seleccionar un subconjunto de FR humano a partir de la colección que tenga la mayor identidad de secuencia de aminoácidos con el subconjunto de FR no humano,
- c) mutagenizar el ADN del subconjunto de FR no humano para codificar un subconjunto de FR humanizado que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica al subconjunto de FR humano seleccionado de la etapa b),
- d) repetir las etapas a) a c) para cada uno de los subconjuntos de FR en el dominio V no humano para producir una pluralidad de secuencias de ADN en las cuales cada secuencia de ADN codifica un subconjunto de FR humanizado (huFR); y
- e) sustituir en un primer vector que codifica al menos el dominio V del anticuerpo no humano, cada una de las secuencias de ADN de huFR de la etapa d) por los subconjuntos de FR no humanos correspondientes codificados por el vector; donde la sustitución una operativamente a cada uno de las huFR con su región determinante de complementariedad correspondiente (CDR); y expresar el primer vector en células hospedadoras y en condiciones que contribuyen a preparar el dominio V de anticuerpo humanizado o anticuerpo completo.

El dominio V que se tiene que humanizar incluirá al menos una región determinante de complementariedad murina (CDR). Como se apreciará, la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina comparten determinadas similitudes estructurales, por ejemplo, cada una incluye un armazón de cuatro subconjuntos de región flanqueante (FR1-4) cuyas secuencias están relativamente conservadas. Cada una de FR1-4 (FR1, FR2, FR3, FR4) están unidas covalentemente por tres CDR, es decir, CDR1, CDR2, CDR3. Existe el reconocimiento general de que las cuatro FR adoptan en gran parte una configuración de lámina beta y las CDR interconectadas forman bucles de conexión y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. La mayoría de las CDR se mantienen cerca de FR contiguas, y con una CDR correspondiente de cadena ligera o pesada opuesta, ayudan a formar el sitio de unión a

antígeno. Se ha desvelado una amplia diversidad de CDR y FR. Véase, por ejemplo, Kabat *et al.* en *Sequences of Proteins of Immunological Interest* Quinta Edición, U.S. Dept. Of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991) Publicación NIH N° 91-3242.

- 5 Véanse también el documento EP-A-0239400 y la Patente de Estados Unidos N° 5.985.279 (que describen métodos para preparar anticuerpos alterados en los cuales las CDR se obtienen a partir de especies diferentes que la FR).

La expresión “fragmento de unión a antígeno” significa al menos una parte de un anticuerpo que se une específicamente a antígeno. Un ejemplo de un fragmento de este tipo incluye un dominio V de anticuerpo y su
10 compañero de unión de dominio V. Los fragmentos adecuados adicionales incluyen además partes del dominio V que tienen una masa molecular combinada para el dominio V y su compañero de unión de dominio V desde aproximadamente 15 kilodalton hasta aproximadamente 40 kilodalton, preferentemente entre desde
15 aproximadamente 20 kilodalton hasta aproximadamente 30 kilodalton, más preferentemente aproximadamente 25 kilodalton determinada por una diversidad de métodos convencionales incluyendo electroforesis en gel de poliacrilamida SDS o cromatografía de exclusión por tamaño usando fragmentos marcadores de tamaño apropiado, espectroscopía de masas o análisis de secuencia de aminoácidos.

Adicionalmente, los fragmentos de unión a antígeno adecuados incluyen al menos parte de un dominio V de unión a
20 antígeno en solitario o en combinación con un dominio constante afin (C) o fragmento del mismo (“afin” se usa para indicar relación entre dos componentes de la misma cadena pesada (H) o ligera (L) de inmunoglobulina. Los fragmentos de dominio C típicos tienen una masa molecular de entre desde aproximadamente 5 kilodalton a aproximadamente 50 kilodalton, más preferentemente entre desde aproximadamente 10 kilodalton a aproximadamente 40 kilodalton, determinada por una diversidad de métodos convencionales incluyendo electroforesis en gel de poliacrilamida SDS o cromatografía de exclusión por tamaño usando fragmentos marcadores
25 de tamaño apropiado, espectroscopía de masas o análisis de secuencia de aminoácidos. Adicionalmente más adelante se desvelan fragmentos de unión a antígeno adecuados.

La expresión “unión específica” o una expresión similar significa una molécula desvelada en el presente documento que se une a otra molécula, formando de ese modo un par de unión específico. Sin embargo, la molécula no
30 reconoce ni se une a otras moléculas como se determina por, por ejemplo, transferencia de Western, ELISA, RIA, ensayo de cambio de movilidad, inmunoensayo de enzima, ensayos competitivos, ensayos de saturación u otros ensayos de unión a proteína conocidos en la técnica. Véase de forma general, Sambrook *et al.* en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición 1989.); y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1989. Véase Harlow y Lane en, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) Cold Spring Harbor, Nueva York para ejemplos de métodos de detección de unión específica entre moléculas.
35

El término “humanizado” significa una inmunoglobulina que incluye al menos un subconjunto de FR humano, preferentemente al menos dos o tres de los mismos, más preferentemente cuatro subconjuntos de FR humanos y una o más CDR de una fuente no humana, habitualmente de roedor tal como una inmunoglobulina de rata o de
40 ratón. Las inmunoglobulinas humanizadas típicamente preferidas de la invención incluirán dos o más, preferentemente tres CDR. Los dominios constantes no es necesario que estén presentes pero con frecuencia son útiles para ayudar a la función de anticuerpos humanizados pretendidos para uso *in vivo*. Los dominios constantes preferidos, si están presentes, son sustancialmente idénticos a dominios constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente el 90% idénticos con respecto a la secuencia de aminoácidos, preferentemente al
45 menos aproximadamente el 95% idénticos o más. Por consiguiente, casi todas las partes de la inmunoglobulina humanizada, con la posible excepción de las CDR, son preferentemente sustancialmente idénticas a partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana de origen natural.

Los métodos para determinar identidad de secuencia de aminoácidos son convencionales en el campo e incluyen
50 inspección visual así como también enfoques asistidos por ordenador que usan BLAST y FASTA (disponibles en la página web de la Biblioteca Nacional de Medicina (EE.UU.)). Los programas de coincidencia preferidos para la mayoría de las realizaciones están disponibles en la página web de la base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) y un programa de coincidencia más preferido para esta realización es el programa denominado Match que está disponible en la base de datos Kabat. Véase Johnson G, Wu T “Kabat database and its application: Future
55 directions”. *Nucleic Acids Res.* (2001) 29: 205-206.

La expresión “anticuerpo humanizado” significa un anticuerpo que incluye una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y de cadena pesada humanizada. Véase S.L. Morrison, mencionado anteriormente; Oi *et al.*, mencionado anteriormente; Teng *et al.*, mencionado anteriormente; Kozbor *et al.*, mencionado anteriormente; Olsson *et al.*, mencionado anteriormente; y otras referencias citadas previamente. Por consiguiente, un “fragmento de anticuerpo humanizado” significa una parte de ese anticuerpo, preferentemente una parte que se une a un
60 antígeno específicamente.

Como se ha descrito, la invención incluye una o más etapas de método que tienen por objeto comparar y optimizar
65 la secuencia de aminoácidos de cada FR no humana individual con una colección de secuencias de aminoácidos humanos, preferentemente una colección de secuencias que incluyen secuencias de aminoácidos de armazón de

anticuerpo humano. En la práctica, la FR en el armazón humano con la puntuación de identidad de secuencia más elevada ha sido una FR correspondiente a la FR de anticuerpo no humano, pero esto no es requerido necesariamente por los parámetros de búsqueda. "Correspondiente" significa relación entre dos FR de la misma posición o de posición similar en el dominio V de anticuerpo. Por ejemplo, una FR1 de ratón de una cadena ligera de anticuerpo dada corresponde a una FR1 humana de esa cadena ligera. La correspondencia con frecuencia se indica mediante un número de FR, es decir, una FR1 de roedor corresponde con FR1 humana, una FR2 de roedor corresponde con FR2 humana, etc.

En una realización del método, el dominio V descrito es de una cadena ligera de anticuerpo no humano. Como se ha descrito el orden exacto de la humanización del subconjunto de FR típicamente no es importante. Por tanto, en un ejemplo de la invención, el subconjunto de FR ligero de la etapa a) en el método será la primera región flanqueante de dominio variable (FR1). Sin embargo, en otras realizaciones, otros subconjuntos de FR se humanizarán antes de FR1, por ejemplo, FR2, FR3 o FR4.

Como se ha descrito, la etapa b) del método implica seleccionar un subconjunto de FR humano a partir de una pluralidad de secuencias de aminoácidos humanos que tienen la mayor identidad de secuencia de aminoácidos con el subconjunto de FR no humano. En realizaciones en las cuales el armazón no humano que se tiene que humanizar es FR1, la identidad de secuencia entre la FR1 de la cadena ligera del anticuerpo no humano y el subconjunto de FR humano seleccionado es preferentemente al menos aproximadamente el 70%, más preferentemente al menos aproximadamente el 80%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 95%.

Como también se ha descrito, los métodos de la invención particulares implican humanización repetitiva (típicamente secuencial) de cada región flanqueante no humana. Por tanto en realizaciones en las cuales se manipula FR1 en primer lugar, el método posteriormente incluye la manipulación de FR2, FR3 y FR4. Como se ha mencionado, el orden exacto de la humanización de las FR no es importante pero por razones de comodidad, puede ser de ayuda humanizar los armazones ligero y pesado en orden numérico, es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4.

Por tanto en una realización de la invención, la etapa d) del método incluirá además comparar la segunda región flanqueante no humana (FR2) del dominio V de cadena ligera no humano (o cadena pesada) con la colección y seleccionar un subconjunto de FR humano que tenga al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia, preferentemente al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con su subconjunto de FR humano (en la práctica, esta es típicamente una FR2 humana). La etapa d) del método incluirá además comparar una tercera región flanqueante (FR3) del dominio V de cadena ligera no humano (o cadena pesada) con la colección y seleccionar una región flanqueante humana que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70%, preferentemente al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con un subconjunto de FR humano (en la práctica, esta es típicamente una FR3 humana). Típicamente, la etapa d) incluirá además comparar una cuarta región flanqueante (FR4) del dominio V de cadena ligera no humano (o cadena pesada) con la colección y seleccionar una región flanqueante humana que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70%, preferentemente al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con su subconjunto de armazón humano correspondiente (en la práctica, esta es típicamente una FR4 humana).

Como será evidente a partir de la presente descripción, la invención se puede emplear para humanizar una amplia diversidad de moléculas del sistema inmune incluyendo dominios V de cadena ligera, dominios V de cadena pesada de cualquier molécula de inmunoglobulina heterodimérica, incluyendo pero sin limitación receptores de células T, complejos mayores de histocompatibilidad y anticuerpos. En una realización, la cadena ligera humanizada (o cadena pesada) incluye los siguientes componentes enlazados covalentemente en secuencia: huFR1-CDR1-huFR2-CDR2 huFR3-CDR3-huFR4.

Como se ha mencionado, es un objeto de la invención producir anticuerpos humanizados en los cuales los problemas de impedimento de la zona de vernier potenciales en al menos uno de los dominios V están minimizados y preferentemente eliminados. La presente invención presenta ayudas para maximizar la unión específica entre la molécula del sistema inmune y su antígeno afín. Por tanto, en una realización del método, los restos de aminoácidos de la zona vernier en cada subconjunto de FR en al menos una de las cadenas ligera y pesada del dominio variable son idénticos cuando el subconjunto de FR no humano se compara con el subconjunto de FR humano correspondiente del dominio V de anticuerpo. Por ejemplo, los restos de aminoácidos de la zona de vernier de FR1 no humana en la cadena ligera o pesada deben ser idénticos a restos correspondientes en el subconjunto de FR1 humano.

El primer vector usado en el método típicamente incluye información de secuencia necesaria para la expresión adecuada de la molécula del sistema inmune codificada en un hospedador deseado. En realizaciones en las cuales la molécula del sistema inmune es un dominio V de cadena ligera humanizado, con frecuencia será útil si el primer vector incluye además un dominio constante de cadena ligera humano o un fragmento del mismo. Típicamente, pero no exclusivamente, el dominio constante de cadena ligera humano o fragmento estará unido covalentemente a la cadena ligera humanizada.

5 En realizaciones preferidas, el dominio constante de cadena ligera humana es C_{κ} , C_{λ} o un fragmento de las mismas. Con frecuencia, el fragmento de cadena ligera humanizado tendrá una longitud de aminoácidos de entre aproximadamente desde 80 hasta aproximadamente 250 aminoácidos, preferentemente entre desde aproximadamente 95 hasta aproximadamente 235 aminoácidos, más preferentemente entre desde aproximadamente 104 hasta aproximadamente 225 aminoácidos. El tamaño del fragmento de cadena ligera humanizado se puede determinar mediante una diversidad de métodos convencionales incluyendo electroforesis en gel de poliacrilamida SDS o cromatografía de exclusión por tamaño usando fragmentos marcadores de tamaño apropiado, espectroscopía de masas o análisis de secuencia de aminoácidos.

10 En realizaciones en las que la molécula del sistema inmune humanizada es un dominio V de cadena pesada, el fragmento de cadena pesada humanizada tendrá una longitud de aminoácidos de entre aproximadamente 80 y aproximadamente 650 aminoácidos, preferentemente entre aproximadamente 95 y aproximadamente 540 aminoácidos, más preferentemente aproximadamente 102 a aproximadamente 527 aminoácidos determinado por ejemplo, por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS o cromatografía de exclusión por tamaño usando fragmentos marcadores de tamaño apropiado, espectroscopía de masas o análisis de secuencia de aminoácidos.

15 Como se ha descrito, es un objeto de la invención proporcionar métodos de humanización novedosos en los cuales cada región flanqueante de una molécula del sistema inmune no humana se compara independientemente con una colección de subconjuntos de armazón humano. De forma que, por ejemplo, para humanizar un anticuerpo quimérico, la secuencia de la primera región flanqueante (FR1) en el dominio variable de cadena pesada (HC) se compara con todas las secuencias conocidas para subconjuntos de FR en los dominios variables de cadena pesada de anticuerpos humanos. Los candidatos con grado más elevado de identidad u homología (el menor número de faltas de coincidencia en la secuencia de aminoácidos) se identifican. El proceso después se repite preferentemente para cada una de FR2, FR3 y FR4 para la HC. Un proceso similar se lleva a cabo para la FR en el dominio variable de la cadena ligera. Los subconjuntos de FR humanos de mejor ajuste se pueden tomar a partir de anticuerpos iguales o diferentes según sea necesario para adecuarse a un uso pretendido de la invención. Esta es una divergencia significativa de otros métodos de humanización en los cuales el mejor ajuste seleccionado es un armazón único en su totalidad a partir de una secuencia de anticuerpo humano única.

20 30 En una realización particular del método, el primer vector incluye además un dominio constante de cadena pesada humano o un fragmento del mismo unido covalentemente a la cadena pesada humanizada. Preferentemente, el dominio constante humano es uno de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un fragmento del mismo.

35 La expresión "anticuerpo quimérico" o expresión relacionada incluyendo formas en plural significa anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a especies diferentes. Por ejemplo, los dominios variables (V) de los genes a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir con dominios constantes (C) humanos, tales como γ_1 , γ_2 , γ_3 o γ_4 . Un anticuerpo quimérico terapéutico típico es, por tanto, una proteína híbrida que consiste en el dominio de unión a antígeno o V de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector a partir de un anticuerpo humano, aunque se pueden usar otras especies de mamífero. Los anticuerpos quiméricos específicos son el anticuerpo anti-factor tisular, cH36 y el anticuerpo anti-ácido lipoteicoico, c96-110 (algunas veces denominado A110) desvelados más adelante.

45 Como se ha descrito, el método de la invención compara la secuencia de aminoácidos de una región flanqueante (FR) de dominio variable (V) de anticuerpo no humano con una pluralidad de secuencias de aminoácidos humanos, preferentemente una colección de secuencias de aminoácidos de armazón de anticuerpo humano o secuencias de fragmentos de los mismos. Un ejemplo de una colección de este tipo es una a partir de una base de datos que incluye una lista de anticuerpos humanos completamente secuenciados. A diferencia de métodos de humanización anteriores, la colección puede incluir además una o más secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos parcialmente secuenciados. Como alternativa, la colección puede consistir básicamente en únicamente los anticuerpos humanos secuenciados parcialmente. Los ejemplos de tales colecciones incluyen, pero sin limitación, las siguientes bases de datos: GenBank, IMGT, Swiss-Prot y Kabat, mencionado anteriormente.

50 55 En un ejemplo más particular de la invención, se proporciona un método para preparar un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado que comprende dominios variables (V) de cadena pesada y ligera. En una realización, el método incluye las siguientes etapas:

- 60 a) comparar la secuencia de aminoácidos de una región flanqueante (1-FR) de dominio variable (V) de cadena ligera de anticuerpo no humano con una colección de secuencias de aminoácidos de armazón de cadena ligera de anticuerpo humano,
- b) seleccionar un subconjunto de FR humano a partir de la colección que tenga la mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la 1-FR,
- c) mutagenizar ADN de la 1-FR para codificar un subconjunto de FR humanizado de cadena ligera (L-huFR) que tenga una secuencia de aminoácidos al menos el 75% idéntica al subconjunto de FR humano seleccionado de la etapa b),
- 65 d) repetir las etapas a) a c) para cada uno de los subconjuntos de FR en la región V de cadena ligera para

producir una pluralidad de secuencias de ADN en las cuales cada secuencia de ADN codifica una L-huFR,
 e) sustituir en un primer vector que codifica al menos el dominio V de cadena ligera del anticuerpo no humano, cada una de las secuencias de ADN de L-huFR de la etapa d) con las 1-FR correspondientes codificadas por el vector; donde la sustitución una operativamente cada una de las L-huFR con una región determinante de
 5 complementariedad correspondiente (CDR),
 f) comparar la secuencia de aminoácidos de una región flanqueante (h-FR) de dominio variable (V) de cadena pesada de anticuerpo no humano con una colección de secuencias de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo humano,
 g) seleccionar un subconjunto de FR humano a partir de la colección que tenga la mayor identidad de secuencia
 10 de aminoácidos con la h-FR,
 h) mutagenizar el ADN de la h-FR para codificar un subconjunto de FR de cadena pesada humanizado (H-huFR) que tenga una secuencia de aminoácidos al menos el 75% idéntica a la FR humana seleccionada de la etapa g),
 i) repetir las etapas f) a h) para cada una de las h-FR en el dominio V de cadena pesada no humano para producir una pluralidad de secuencias de ADN en las cuales cada secuencia de ADN codifica una H-huFR,
 15 j) sustituir en dicho primer vector o un segundo vector que codifica al menos el dominio V de cadena pesada del anticuerpo no humano, cada una de las secuencias de ADN de H-huFR de la etapa i) por las h-FR correspondientes del anticuerpo; donde la sustitución una operativamente cada una de las H-huFR con una CDR de cadena pesada correspondiente; y
 k) expresar el vector o vectores en la misma célula hospedadora y en condiciones que conduzcan a producir cadenas ligera y pesada humanizadas y preparar un anticuerpo humanizado o el fragmento de anticuerpo humanizado que comprende dominios V de cadena pesada y ligera.

En una realización del método anterior, el primer y segundo vectores se co-expresan en la misma célula hospedador. En otra realización, las moléculas de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada humanizadas o
 25 fragmentos de las mismas están contenidas en un vector único y se co-expresan en el mismo hospedador.

Los primeros vectores adecuados para su uso con el método de humanización de anticuerpo anterior incluirán información de secuencia necesaria para expresión adecuada de la molécula del sistema inmune codificada. Por ejemplo, los primeros vectores aceptables incluirán un dominio constante de cadena ligera humana o un fragmento del mismo unido covalentemente con el dominio V de cadena ligera humanizado. Preferentemente, el dominio constante es C_κ, C_λ o un fragmento de los mismos.

Los segundos vectores preferidos de acuerdo con el método típicamente incluirán además un dominio constante de cadena pesada humana o un fragmento del mismo unido covalentemente al dominio V de cadena pesada humanizado. Por ejemplo, el dominio constante humano puede ser uno de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 incluyendo fragmentos de los mismos u otros isotipos (IgA, IgD, IgE o IgM).

La presente invención también es compatible con etapas adicionales que tienen por objeto purificar las moléculas del sistema inmune humanizadas de los componentes celulares que las acompañan de forma natural. Por tanto, en una realización, los métodos anteriores incluirán además una o más etapas que incluyen purificar el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo humanizado que comprende dominios V de cadena pesada y ligera de las células hospedadoras para producir una preparación sustancialmente pura del anticuerpo o fragmento. Preferentemente, el anticuerpo humanizado sustancialmente purificado se une específicamente a antígeno con una afinidad no menor de aproximadamente 10 veces inferior al anticuerpo no humano parental.

Como será evidente, la presente invención se puede usar para preparar un amplio espectro de moléculas del sistema inmune humanizadas. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado incluye: 1) regiones flanqueantes de cadena ligera y pesada (FR) que son cada una individualmente al menos aproximadamente el 90% idénticas en la secuencia de aminoácidos a un subconjunto de FR humano, preferentemente al menos el 95% idénticas al mismo, más preferentemente al menos aproximadamente el 98% hasta el 100% idénticas al subconjunto de FR humano, 2) al menos una CDR de un roedor tal como un ratón, preferentemente todas las CDR de un ratón, 3) y un dominio constante de inmunoglobulina que es al menos aproximadamente el 90% idéntico, preferentemente al menos el 95% hasta aproximadamente el 100% idéntico a un dominio constante de inmunoglobulina humano correspondiente. Se apreciará que un anticuerpo se ha "humanizado" mediante el proceso de "humanización" porque el anticuerpo humanizado resultante se espera que se una al mismo antígeno que el anticuerpo que proporciona las CDR.

Se apreciará además que las moléculas del sistema inmune humanizadas particulares desveladas en el presente documento, habitualmente anticuerpos humanizados, pueden tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas adicionales que pueden ser contiguas o no contiguas según sea necesario. Por ejemplo, tales sustituciones tendrán típicamente sustancialmente poco o ningún efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. La expresión "sustitución conservativa" incluyendo las formas en plural significa combinaciones de: gli ↔ ala; val ↔ ile ↔ leu; asp ↔ glu, asn ↔ gln; ser ↔ thr, lys ↔ arg y phe ↔ tyr.

Los anticuerpos son preferentemente sustancialmente puros cuando se usan en los métodos y ensayos desvelados. Las referencias a que un anticuerpo es "sustancialmente puro" significan un anticuerpo o proteína que se ha separado de los componentes que lo acompañan de forma natural. Por ejemplo, mediante el uso de técnicas

de inmunoafinidad convencionales o de purificación de afinidad de proteína A, se puede purificar un anticuerpo de la invención a partir de medio de cultivo celular o de hibridoma mediante el uso de FT nativo como un antígeno o resina de proteína A. De forma similar, el FT nativo se puede obtener en forma sustancialmente pura mediante el uso de un anticuerpo de la invención con técnicas de purificación de inmunoafinidad convencionales. Particularmente, un anticuerpo o proteína es sustancialmente puro cuando al menos el 50% de la proteína total (% en peso de proteína total en una muestra dada) es un anticuerpo o proteína de la invención. Preferentemente el anticuerpo o proteína es al menos el 60% en peso de la proteína total, más preferentemente al menos el 75% en peso, aún más preferentemente al menos el 90% en peso y lo más preferente es que sea al menos el 98% en peso del material total. La pureza se puede ensayar fácilmente mediante métodos conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PAGE), cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño), espectroscopía de masas o análisis de HPLC.

Tales anticuerpos sustancialmente purificados y humanizados se pueden usar para unirse específicamente a una amplia diversidad de antígenos. Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos producidos por los presentes métodos se pueden usar para reconocer y unirse específicamente a ácido lipoteicoico o a un ácido graso relacionado. Se producen otros anticuerpos y fragmentos humanizados que reconocen y se unen específicamente a factor tisular humano.

Las moléculas del sistema inmune humanizadas proporcionan un amplio espectro de usos importantes. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados se pueden usar para prevenir o tratar enfermedades en seres humanos o animales. Otros usos contemplados incluyen el uso como un producto de diagnóstico.

Los anticuerpos para humanización de acuerdo con el método de la invención se pueden obtener fácilmente a partir de una diversidad de fuentes. Como alternativa, los mismos se pueden preparar *de novo*. En un enfoque, tales moléculas se pueden preparar mediante la inmunización de un mamífero con una muestra purificada de FT humano nativo o un péptido inmunogénico como se descrito anteriormente, en solitario o en complejo con un vehículo o como una mezcla con un adyuvante. Los mamíferos adecuados incluyen animales de laboratorio típicos tales como ovejas, cabras, conejos, cobayas, ratas y ratones. Las ratas y ratones, especialmente los ratones, se prefieren para obtener anticuerpos monoclonales. El antígeno se puede administrar al mamífero mediante cualquiera de una diversidad de rutas adecuadas tal como inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o intracutánea. El intervalo de inmunización óptimo, la dosis de inmunización, etc. pueden variar dentro de rangos relativamente amplios y se pueden determinar empíricamente en base a la presente divulgación. Los procedimientos típicos implican inyección del antígeno varias veces a lo largo de varios meses. Los anticuerpos se recogen a partir del suero del animal inmunizado mediante técnicas convencionales y se explora para encontrar anticuerpos específicos para el antígeno deseado. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir en células que producen anticuerpos y esas células usarse para generar anticuerpos monoclonales mediante el uso de técnicas de fusión convencionales para formar células de hibridoma. Véase G. Kohler, *et al*, Nature 256: 456 (1975). Típicamente esto implica fusionar una célula que produce anticuerpo con una línea de células inmortales tal como células de mieloma para producir la célula híbrida. Como alternativa, los anticuerpos monoclonales se pueden producir a partir de células mediante el método de Huse, *et al*, Science, 256: 1275 (1989). Un anticuerpo de este tipo se puede secuenciar mediante metodologías convencionales si se desea.

Para algunas aplicaciones, puede ser deseable usar, como el anticuerpo que se tiene que humanizar, un anticuerpo quimérico, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que se combinan con un dominio variable animal no humano y un dominio constante humano. Se puede preparar una diversidad de tipos de tales anticuerpos quiméricos, incluyendo, por ejemplo, mediante la producción de quimeras de dominio variable humano, en las cuales partes de los dominios variables, específicamente regiones conservadas del dominio de unión a antígeno, son de origen humano y únicamente las regiones hipervariables son de origen no humano. Véanse también las descripciones de anticuerpos quiméricos humanizados y los métodos para producir los mismos en S.L. Morrison, Science, 229: 1202-1207 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4: 214 (1986); Teng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312 (1983); Kozobor *et al.* Immunology Today 4: 72-79 (1983); Olsson *et al.* Meth. Enzymol. 92: 3-16 (1983).

Adicionalmente, los ratones transgénicos se pueden emplear para preparar anticuerpos monoclonales humanos particulares. Por ejemplo, se han creado ratones transgénicos que portan repertorios de anticuerpo humano que se pueden humanizar con un antígeno de interés. Los esplenocitos de tales ratones transgénicos inmunizados se pueden usar posteriormente para crear hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos que reaccionan de forma específica con el antígeno. Véase N. Lonberg *et al.*, Nature, 368: 856-859 (1994); L.L. Green *et al.*, Nature Genet., 7: 13-21 (1994); S.L. Morrison SL, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81: 6851-6855 (1984).

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos también se pueden preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa (véanse los cebadores desvelados en el Ejemplo 1 a continuación). Véase, en general, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning (2ª ed. 1989). Tales ácidos nucleicos también se pueden sintetizar mediante métodos conocidos, por ejemplo, el método de triéster fosfato (véase Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M.J. Gait, ed., 1984)), o mediante el uso de un sintetizador de oligonucleótidos automatizado disponible en el mercado. Un ácido nucleico preparado de este tipo se puede emplear para expresar un anticuerpo mediante técnicas conocidas.

Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo se puede incorporar en un vector adecuado mediante métodos conocidos tal como mediante el uso de enzimas de restricción para realizar cortes en el vector para inserción de la construcción seguida por ligamiento. El vector que contiene la secuencia de ácido nucleico insertada, unida operativamente de forma adecuada a una secuencia promotora, se introduce posteriormente en células hospedoras para expresión. Véase, en general, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. La selección de los vectores adecuados se puede realizar empíricamente en base a factores relacionados con el protocolo de clonación. Por ejemplo, el vector debería ser compatible con y tener el replicón apropiado para la célula hospedadora que se emplea. Además, el vector tiene que ser capaz de alojar la secuencia de ácido nucleico insertada. Las células hospedoras adecuadas incluirán una amplia diversidad de células procariontas o eucariotas, tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans* u otros hospedadores bacterianos, *Saccharomyces cerevisiae* u otra levadura, *Aspergillus niger* u otro hongo u otros hospedadores microbianos, células de mamífero CHO, BK o NSO, células de aves o plantas y similares.

De acuerdo con una realización de la invención particular, el método descrito en el presente documento incluirá la etapa de introducir uno o más tipos de vectores deseados en células de planta en condiciones adecuadas para expresar el vector o vectores en esas células. Una célula de planta particular de interés es *Arabidopsis*. Véase la Patente de Estados Unidos N° 6.417.429 y referencias citadas en la misma.

Por ejemplo, en el método anterior para preparar un dominio V, la etapa e) incluirá introducir el primer vector en células de planta, preferentemente *Arabidopsis*, y expresar el primer vector en la misma para producir el dominio V de anticuerpo. El método se adapta fácilmente para expresar el anticuerpo completo (entero).

Con respecto al método descrito previamente para preparar un anticuerpo humanizado, la etapa k) incluirá introducir el primer y segundo vectores en células de planta, preferentemente *Arabidopsis*, y expresar los vectores en la misma para producir las moléculas deseadas. En algunas realizaciones de la invención, se puede usar lo que se denomina más adelante "mega" vector en lugar de primero y segundo vectores.

El peso molecular de los anticuerpos variará dependiendo de varios factores tales como el uso pretendido y si el anticuerpo incluye una toxina, agente farmacéutico, isótopo radiactivo o etiqueta detectable o similar conjugada o fusionada de forma recombinante. También el peso molecular variará dependiendo de la naturaleza y el alcance de las modificaciones post-traduccionales si existiera alguna (tal como glicosilación) al anticuerpo. Las modificaciones son una función del hospedador usado para expresión con *E. coli* produciendo anticuerpos no glicosilados y los hospedadores eucariotas, tales como células de mamífero, produciendo anticuerpos glicosilados. En general, un anticuerpo tendrá un peso molecular de entre aproximadamente 20 y 150 kDa. Tales pesos moleculares se pueden determinar fácilmente mediante métodos de determinación de tamaño molecular tales como SDS-PAGE seguido por tinción de proteína o análisis de transferencia de Western.

"Anticuerpo" u otros términos similares se refieren a inmunoglobulina completa así como también fragmentos inmunológicamente activos que se unen a un antígeno deseado. Las inmunoglobulinas y los fragmentos inmunológicamente activos (que se unen a antígeno) de las mismas incluyen un sitio de unión a epítipo (es decir, un sitio o epítipo capaz de unirse específicamente por un anticuerpo que reconoce antígeno). Los fragmentos de anticuerpo ilustrativos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(v), Fab', F(ab')₂, "medias moléculas" obtenidas reduciendo los enlaces de disulfuro de inmunoglobulinas, inmunoglobulinas de cadena única u otros fragmentos de unión a antígeno adecuados (véanse, por ejemplo, Bird *et al.*, Science, 242: 423-426 (1988); Huston *et al.*, PNAS, (EE.UU.), 85: 5879 (1988); Webber *et al.*, Mol. Immunol., 32: 249 (1995)). El anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo pueden ser de un animal (por ejemplo, un roedor tal como ratón o una rata) o forma quimérica (véase Morrison *et al.*, PNAS, 81: 6851 (1984); Jones *et al.*, Nature, 321: 522 (1986)). Los anticuerpos de cadena única y humanizados de la invención pueden ser útiles para algunas aplicaciones de la invención.

Por tanto, de acuerdo con otra realización, los métodos anteriores incluirán además etapas adicionales que tienen por objeto preparar un anticuerpo de cadena única humanizado (sc-Fv) a partir de las regiones V humanizadas. Adicionalmente, los fragmentos de anticuerpos humanizados se pueden preparar mediante métodos convencionales, particularmente F(v), F(ab')₂, Fab' o Fab, así como también fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

De forma similar, un "ácido nucleico" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se puede expresar para proporcionar un anticuerpo ya que tal término se especifica que significa lo inmediatamente anterior.

En algunos casos, puede ser deseable modificar el anticuerpo para impartir una propiedad biológica, química o física deseable al mismo. Por tanto el método de la presente invención es compatible con etapas convencionales adicionales que tienen por objeto conjugar (es decir, unir covalentemente) una o más moléculas del sistema inmune humanizadas a un agente farmacéutico. Tal enlace se puede conseguir mediante varios métodos incluyendo el uso de una molécula de unión tal como un agente de entrecruzamiento de proteína heterobifuncional, por ejemplo, SPDP, carbodiimida o similares o mediante métodos recombinantes. Las estrategias de conjugación particulares compatibles con el uso de los anticuerpos humanizados se han desvelado en la Solicitud PCT WO 99/21572 de

Rhode, P. *et al.* Véase también Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, (1989); Harlow y Lane en Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Publications, Nueva York (1988).

5 Los anticuerpos humanizados particulares de la presente invención pueden ser policlonales o monoclonales, según sea necesario y pueden tener, sin limitación, un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o IgA, IgD, IgE, IgM.

Los anticuerpos humanizados desvelados en el presente documento se pueden producir mediante una o una combinación de estrategias incluyendo las que se describen más adelante en los Ejemplos 1-9.

10 En un enfoque descrito en los Ejemplos 1 y 4, se emplearon cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo. En primer lugar, las secuencias de las cadenas ligera y pesada de anticuerpo de ratón se obtuvieron a partir del anticuerpo quimérico de ratón-humano cH36. En segundo lugar, el anticuerpo cH36 se humanizó determinando qué región flanqueante de anticuerpo humana daba el "mejor ajuste", es decir, se parecía de forma más cercana a la secuencia de aminoácidos de la región flanqueante de ratón. En tercer lugar, las secuencias de FR de cadena ligera y pesada pertinentes se humanizaron y en cuarto lugar, transfección y expresión de ácido nucleico o ácidos nucleicos aislados que codifican la cadena ligera o pesada humanizada (o cadena ligera y pesada humanizada, por ejemplo, véanse los mega vectores descritos más adelante).

20 Más particularmente, el enfoque "mejor ajuste de FR" se aplicó para humanizar el anticuerpo anti-factor tisular quimérico cH36. En este enfoque, las secuencias de dominio variable de cadena ligera y pesada murinas mostradas en las Figuras 1A y 1B (SEC ID N°: 2 y 4) se usaron para buscar ("comparar") todas las bases de datos de proteína disponibles para aquellas secuencias de dominio variable de anticuerpo humano que son las más homólogas al dominio variable murino. Véase por ejemplo, Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. Se pueden usar varios programas informáticos disponibles fácilmente para llevar a cabo esta etapa tales como BLAST, FASTA y programas relacionados. Las regiones flanqueantes 1, 2, 3, y 4 de la cadena ligera y pesada eran de interés especial ya que se comprende casi universalmente que estos sitios tienen las CDR en orientación apropiada para unión a antígeno. El resultado derivado de esta búsqueda fue típicamente una lista de secuencias más homólogas a las secuencias de ratón problema, el porcentaje de homología con cada secuencia y un alineamiento de cada secuencia humana con la secuencia murina correspondiente. El análisis se llevó a cabo de forma general en las cadenas ligera y pesada de forma independiente.

30 De acuerdo con el enfoque de "mejor ajuste de FR", se minimizó el número de aminoácidos no coincidentes entre el subconjunto de FR de ratón problema y el subconjunto de FR humano. En la mayoría de los casos, los subconjuntos de región flanqueante humanos se seleccionaron en base a los siguientes criterios de identidad. En la cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la FR1 murina era al menos aproximadamente el 80% idéntica al subconjunto de FR humano; la FR2 murina era al menos aproximadamente el 90% idéntica al subconjunto de FR humano, la FR3 murina era al menos aproximadamente el 90% idéntica al subconjunto de FR humano, y la FR4 murina era al menos aproximadamente el 75% idéntica al subconjunto de FR humano. Y en la cadena pesada, la secuencia de aminoácidos de la FR1 murina se eligió para ser al menos aproximadamente el 80% idéntica al subconjunto de FR humano; la FR2 murina era al menos aproximadamente el 85% idéntica al subconjunto de FR humano; la FR3 murina se eligió para ser al menos aproximadamente el 70% idéntica al subconjunto de FR humano; y la FR4 murina era al menos aproximadamente el 90% idéntica al subconjunto de FR humano. Típicamente, las sustituciones de aminoácido conservativas se favorecieron durante la evaluación de secuencias de región flanqueante humanas candidatas similares. Se observó que cuando se consideraban tales factores, las regiones flanqueantes humanas resultantes servían como un buen punto de referencia para humanización del anticuerpo cH36 quimérico.

45 Una vez que se había tomado la decisión con respecto a la región flanqueante humana deseada, se usaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa recombinante (PCR) para preparar sustituciones de aminoácidos deseadas tanto en las cadenas ligera como pesada. Típicamente, los oligonucleótidos se prepararon y se usaron para mutagenizar armazones de dominio variable de ratón para contener restos deseados. Se emplearon oligonucleótidos con una diversidad de longitudes. Véase el documento WO 92/07075 para una divulgación general con relación a PCR recombinante y métodos relacionados.

50 En general, se usó PCR regular para clonación, para introducir sitios de endonucleasas de restricción de clonación o de diagnóstico y para cambiar restos de aminoácidos localizados en los extremos de los dominios variables. Se usó mutagénesis basada en PCR para cambiar múltiples restos de aminoácidos al mismo tiempo, especialmente cuando estos restos estaban en el centro de los dominios variables. Se usó mutagénesis dirigida para introducir una o dos sustituciones de aminoácido a la vez. Después de cada etapa, los clones parcialmente humanizados se secuenciaron y algunos de estos dominios variables se clonaron posteriormente en vectores de expresión. Los métodos más específicos para llevar a cabo estas manipulaciones se describen en la sección de Ejemplos.

60 Después de llevar a cabo el enfoque de "mejor ajuste de FR" anterior para humanizar cada una de las FR no humanas, ácidos nucleicos mutagenizados que codifican región flanqueante humanizada (huFR) y/o CDR se enlazaron a un ADN apropiado que codifica dominios constantes de cadenas ligera o pesada. Tales construcciones se clonaron posteriormente en un vector de expresión y se transfectaron en células hospedadoras, preferentemente células de mamífero. Estas etapas se consiguieron usando técnicas recombinantes y de cultivo celular conocidas en

el campo.

En un enfoque, se puede preparar un anticuerpo humanizado mediante el siguiente método general:

- 5 (a) preparación de un primer vector de expresión incluyendo un replicón apropiado para el hospedador de expresión y un promotor adecuado unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos un dominio variable de una cadena pesada o ligera de Ig, comprendiendo el dominio variable regiones flanqueantes humanizadas individualmente (FR1-4) y CDR 1-3 murinas a partir de un anticuerpo deseado,
- 10 (b) preparación de un segundo vector de expresión replicable que incluye un promotor adecuado unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de una cadena ligera o pesada de Ig complementaria respectivamente, comprendiendo ese dominio variable regiones flanqueantes humanizadas individualmente y correspondientes (FR1-4) y CDR 1-3 murinas a partir del anticuerpo;
- (c) transfección de una línea celular con el primero o ambos vectores preparados; y
- 15 (d) cultivo de dicha línea celular transfectada para producir dicho anticuerpo humanizado.

Preferentemente la secuencia de ADN en las etapas (a) y (b) codifica dominios constantes adecuados a partir de la cadena de anticuerpo humana. Los isotipos adecuados incluyen, sin limitación, IgG1 e IgG4, por ejemplo.

- 20 Como alternativa, un anticuerpo humanizado adecuado se puede preparar preparando un "mega" vector replicable único que incluye un promotor apropiado unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos un dominio variable de una cadena pesada o ligera de Ig, comprendiendo el dominio variable cada una de las regiones flanqueantes humanizadas individualmente (FR1-4) y CDR 1-3 murinas a partir de un anticuerpo objeto.

- 25 En una realización, el mega vector incluirá además un promotor adecuado unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos un dominio variable de una cadena ligera o pesada de Ig complementaria respectivamente, comprendiendo ese dominio variable regiones flanqueantes humanizadas (FR1-4) individualmente y correspondientes y CDR 1-3 murinas a partir del anticuerpo CH36 u otras CDR adecuadas. El uso del mega vector será apropiado con frecuencia cuando es necesaria la expresión de anticuerpo humanizado a partir de un vector único.

- 30 Será evidente que el método anterior para preparar el anticuerpo CH36 humanizado se puede adaptar fácilmente para preparar otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno humanizados de acuerdo con la invención.

- 35 Los ejemplos particulares de anticuerpos adecuados por los métodos de humanización de la presente invención se han desvelado en el documento WO 03/037911 así como también en los ejemplos que siguen a continuación.

- 40 Los términos "ensamblar" o "ensamblado" significan el uso de técnicas recombinantes convencionales para introducir secuencias de ADN objeto que codifican los armazones o regiones flanqueantes humanizados en los vectores. Tal ensamblaje se puede llevar a cabo mediante uno o una combinación de enfoques incluyendo, pero sin limitación, introduciendo cambios repetitivos en una secuencia de armazón o de región flanqueante única, cortando y empastando fragmentos entre sí (a través del uso de endonucleasas de restricción y ligasas), o mediante técnicas de síntesis de ADN sintético. Véase, en general Harlow y Lane, mencionado anteriormente y Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente.

- 45 Los métodos anteriores para preparar anticuerpos humanizados se pueden llevar a la práctica con casi cualquier técnica de mutagénesis aceptable. En particular, las etapas del método pertinentes pueden emplear métodos de mutagénesis dirigida y/o de PCR convencional para reemplazar aminoácidos de roedor deseados en el armazón con aminoácidos humanos apropiados. También se puede conseguir mediante síntesis de ADN de fragmentos modificados o regiones codificantes enteras o mediante la recombinación *in vitro* usando técnicas de ADN recombinante o de ingeniería genética convencionales o cualquier combinación de las mismas. Típicamente, la secuencia del armazón o región flanqueante modificada (humanizada) corresponde a la secuencia del armazón o región flanqueante humana de la base de datos.

- 55 Los ácidos nucleicos adecuados codifican al menos una de las cadenas pesada o ligera de los anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos desvelados en el presente documento. Típicamente, el ácido nucleico es un vector de ADN recombinante que incluye el ácido nucleico aislado. El vector de ADN incluirá típicamente además una secuencia polinucleotídica de control de expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de inmunoglobulina humanizada, incluyendo regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de expresión serán sistemas de promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o de transfectar células hospedadoras eucariotas, pero también se pueden usar secuencias de control para hospedadores procariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para expresión de nivel alto de las secuencias de nucleótidos y, según se desee, la recolección y purificación de las cadenas ligera, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina se pueden
- 65 llevar a cabo a continuación.

Las secuencias de ácido nucleico capaces de expresar en última instancia los anticuerpos humanizados deseados se pueden formar a partir de una diversidad de polinucleótidos diferentes (ADN genómico o ADNc, ARN, oligonucleótidos sintéticos, etc.) y componentes (por ejemplo, regiones V, J, D y C), así como también mediante una diversidad de técnicas diferentes.

5 La unión de secuencias genómicas y sintéticas apropiadas es actualmente el método más común de producción, pero también se pueden utilizar secuencias de ADNc. Véase, por ejemplo, S.L. Morrison, mencionado anteriormente; Oi *et al.*, mencionado anteriormente; Teng *et al.*, mencionado anteriormente; Kozbor *et al.*, mencionado anteriormente; Olsson *et al.*, mencionado anteriormente; Publicación de Patente Europea N° 0239400 y Riechmann, L. *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988), y referencias citadas en los mismos.

10 El uso de la invención es compatible con una amplia diversidad de hospedadores adecuados, por ejemplo, células hospedadoras de mamíferos, planta o microbianas. En una realización, los vectores de expresión de ADN adecuados incluyen uno o más marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, ampicilina, geneticina, higromicina, puromicina o neomicina (o similares), para permitir la detección de las células transformadas con las
15 secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.704.362). *E. coli* es un hospedador procarionta útil particularmente para clonar los polinucleótidos de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen, aunque no están limitados a, bacilos tales como *Bacillus subtilis* y otras *enterobacteriáceas*, tales como *Salmonella*, *Serratia*, diversas especies de *Pseudomonas* y otros microbios tales como actinomicetos (por ejemplo, especies de *Streptomyces*), levadura
20 (por ejemplo, especies de *Saccharomyces*) u hongos (por ejemplo, especies de *Aspergillus*). En estos hospedadores procariontas, también se pueden preparar vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, promotores y un origen de replicación). Además, puede estar presente cualquier cantidad de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema de promotor de lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un
25 sistema promotor a partir de fago lambda. Los promotores típicamente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora y tienen secuencias de sitio de unión a ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción. Otros microbios, tales como levadura, también se pueden usar para expresión. *Saccharomyces* es un hospedador preferido, teniendo los vectores adecuados secuencias de control de expresión, tales como promotores, que incluyen 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas y un origen de
30 replicación, secuencias de terminación y similares según se desee.

Además de los sistemas basados en microorganismo anteriores, los hospedadores eucariotas también se pueden usar para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (véase, Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, Nueva York, NY (1987)). En muchas realizaciones, se preferirán de forma general los
35 hospedadores eucariotas, típicamente líneas de células de mamífero sin limitación, incluyendo líneas de células CHO, diversas líneas de células COS, células NSO, células BK, células HeLa, preferentemente líneas de células de mieloma, etc. o células B de hibridoma transformadas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen *et al.*, Immunol. Rev. 89: 46-68 (1986)) y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a
40 ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de expresión preferidas son promotores obtenidos a partir de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus de papiloma bovino, citomegalovirus y similares. En otras realizaciones, se preferirán de forma general los hospedadores eucariotas donde el hospedador eucariota es una planta o células de planta sin limitación, incluyendo, por ejemplo, *Arabidopsis*, *Nicotinia*, etc. y el cultivo de células de planta también se
45 puede usar para expresar y producir los anticuerpos de la presente invención. En otras realizaciones, se preferirán de forma general los hospedadores eucariotas donde el hospedador eucariota es una célula de insecto, especies de aves o un animal transgénico.

Los vectores de ADN preferidos para poner en práctica la invención incluyen las siguientes secuencias unidas
50 operativamente: un marcador de resistencia a antibiótico, por ejemplo, resistencia a ampicilina, origen F1 y dominio variable de cadena pesada (HC) o cadena ligera (LC). Ese dominio variable se puede insertar en un vector de expresión de HC apropiado que incluye unidos operativamente en secuencia: el dominio variable de HC, dominio constante de IgG1 o IgG4 humana, primer sitio poliA, promotor SV40, marcador de resistencia a antibiótico tal como resistencia a neomicina, segundo sitio poliA, promotor/potenciador de citomegalovirus (CMV) y secuencia líder
55 adecuada.

Los vectores de ADN adicionalmente preferidos incluyen el dominio variable de LC unido operativamente a un intrón kappa de roedor (por ejemplo, ratón), intrón que está unido operativamente a un dominio constante kappa humano adecuado; y un marcador de resistencia a antibiótico tal como una resistencia a neomicina.

60 Como se ha descrito, con frecuencia será altamente útil expresar los anticuerpos humanizados de la presente invención a partir de un ácido nucleico único. Un vector de ADN preferido se denomina en el presente documento algunas veces un "mega" vector e incluye los siguientes componentes unidos operativamente en secuencia: promotor SV40, marcador de resistencia a antibiótico tal como neomicina, primer sitio poliA, primer
65 promotor/potenciador CMV, dominio variable de LC, intrón kappa de roedor (por ejemplo, ratón) exón kappa humano, segundo sitio poliA, segundo promotor/potenciador de CMV, dominio variable de HC y dominio constante

de cadena pesada de IgG1 o IgG4 humana. Un ejemplo específico de un mega vector de este tipo es el vector de expresión del anticuerpo IgG1 anti-FT humanizado descrito más adelante en los Ejemplos 1-3. Véase también la Figura 2.

5 A. Preparación de anticuerpo de unión anti-factor tisular humanizado

La preparación y uso de un anticuerpo de unión anti-factor tisular humanizado ya se ha descrito en el documento 03/037911. Véanse también los Ejemplos 1-3 más adelante.

10 En resumen, anticuerpos preferidos se unen a factor tisular humano para formar un complejo de unión. El factor tisular puede ser de origen natural o humano recombinante (rhTF). Preferentemente, se inhibe la unión del factor X o factor IX al complejo. En una realización preferida de la invención, el anticuerpo humanizado tiene una constante de afinidad aparente (K_A , M^{-1}) para el hTF de menos de aproximadamente 1 nM, preferentemente menos de aproximadamente 0,5 nM, más preferentemente entre desde aproximadamente 0,01 nM hasta aproximadamente 0,4 nM. Véanse los Ejemplos 1-3 más adelante para más información acerca de la determinación de las constantes de afinidad para los anticuerpos humanizados. "Unión específica" significa que los anticuerpos humanizados forman un complejo de unión detectable con el FT (o rhTF) y no se determina ningún otro antígeno mediante técnicas inmunológicas convencionales tales como RIA, transferencia de Western o ELISA.

20 Los anticuerpos de unión anti-FT humanizados preparados de acuerdo con la presente invención muestran una constante de afinidad aparente (K_A , M^{-1}) para FT humano nativo de al menos aproximadamente $1 \times 10^8 M^{-1}$ determinada mediante análisis de plasmón superficial (particularmente, análisis BIAcore de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 3 que se presenta a continuación), más preferentemente al menos aproximadamente $5 \times 10^8 M^{-1}$ determinada mediante análisis de plasmón superficial, aún más preferentemente una constante de afinidad aparente (K_A , M^{-1}) para FT nativo de al menos aproximadamente $3 \times 10^9 M^{-1}$ determinada mediante análisis de resonancia de plasmón superficial. Tal afinidad de unión sustancial de anticuerpos de la invención contrasta de forma marcada de las afinidades de unión mucho más bajas de anticuerpos informados previamente.

30 A este respecto, se puede usar una concentración eficaz bastante baja del anticuerpo de unión del factor tisular humanizado, por ejemplo, una concentración relativamente baja de anticuerpo se puede emplear para inhibir la función de FT según se desee (por ejemplo, al menos aproximadamente el 95, el 98 o el 99 por ciento de inhibición) en un ensayo *in vitro* tal como se describe en el Ejemplo 3 que se presenta a continuación.

35 Las secuencias de ácido nucleico (SEC ID N°: 1 y 3) y de aminoácidos (SEC ID N°: 2 y 4) de un anticuerpo de unión a factor tisular particular que se han humanizado mediante los presentes métodos, es decir H36.D2.B7. Véanse las Figuras 1A y 1B de los dibujos. Las SEC ID N°: 1 y 2 son el ácido nucleico y aminoácidos respectivamente del dominio variable de cadena ligera y las SEC ID N°: 3 y 4 son el ácido nucleico y los aminoácidos respectivamente del dominio variable de cadena pesada, estando las regiones hipervariables (CDR o regiones determinantes de complementación) subrayadas en todas esas secuencias.

40 Los anticuerpos humanizados de unión a factor tisular adicionales tendrán identidad de secuencia de aminoácidos sustancial con una o ambas secuencias de cadena ligera o cadena pesada mostradas en las Figuras 1A y 1B. Más particularmente, tales anticuerpos incluyen aquellos que tienen al menos aproximadamente el 70 por ciento de homología (identidad de secuencia de aminoácidos) con las SEC ID N°: 2 y/o 4, más preferentemente aproximadamente el 80 por ciento o más de homología con SEC ID N°: 2 y/o 4, aún más preferentemente aproximadamente el 85, el 90 o el 95 por ciento o más de homología con SEC ID N°: 2 y/o 4.

50 Los anticuerpos humanizados de unión a factor tisular más particulares tendrán identidad de secuencia de aminoácidos elevada con regiones hipervariables (mostradas con subrayado doble en las Figuras 1A y 1B) de SEC ID N°: 2 y 4). Los anticuerpos específicos tendrán una, dos o tres regiones hipervariables de un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia elevada (al menos el 90% o el 95% de identidad de secuencia de aminoácidos) con o será igual que una, dos o tres de las regiones hipervariables correspondientes del dominio variable de cadena ligera de H36.D2.B7 (las regiones hipervariables mostradas con subrayado en la Figura 1A y que son los siguientes:

- 55
- 1) LASQTID (SEC ID N°: 5);
 - 2) AATNLAD (SEC ID N°: 6); y
 - 3) QQVYSSPFT (SEC ID N°: 7).

60 Los anticuerpos específicos adicionales que se han humanizado mediante los métodos descritos en el presente documento y que se unen al factor tisular tendrán una, dos o tres regiones hipervariables de un dominio variable de cadena pesada que tiene identidad de secuencia elevada (al menos el 90% o el 95% de identidad de secuencia de aminoácidos) con o que es igual a una, dos o tres de las regiones hipervariables correspondientes del dominio variable de cadena pesada de H36.D2.B7 (aquellas regiones hipervariables mostradas subrayadas en la Figura 1B y que son las siguientes:

65

- 1) TDYNVY (SEC ID N°: 8);
- 2) YIDPYNGITIYDQNFKG (SEC ID N°: 9); y
- 3) DVTTALDF (SEC ID N°: 10).

5 Determinados ácidos nucleicos preferentemente son de una longitud suficiente (preferentemente al menos aproximadamente 100, 200 o 250 pares de bases) para unirse a la secuencia de SEC ID N°: 1 y/o SEC ID N°: 3 en las siguientes condiciones moderadamente rigurosas (denominadas en el presente documento condiciones de "rigurosidad normal"): uso de un tampón de hibridación que comprende formamida al 20% en tampón de solución salina 0,9 M/citrato de sodio 0,12 M (6xSSC) a una temperatura de 37 °C y que permanece unido cuando se somete a lavado una vez con ese tampón 2xSSC a 37 °C.

15 Más específicamente, determinados ácidos nucleicos (preferentemente al menos aproximadamente 100, 200 o 250 pares de bases) se unirán a la secuencia de SEC ID N°: 1 y/o SEC ID N°: 3 en las siguientes condiciones altamente rigurosas (denominadas en el presente documento condiciones de "rigurosidad elevada"): uso de un tampón de hibridación que comprende formamida al 20% en tampón de solución salina 0,9 M/citrato de sodio 0,12 M (6xSSC) a una temperatura de 42 °C y que permanece unido cuando se somete a lavado dos veces con ese tampón 1xSSC a 42 °C.

20 Los ácidos nucleicos preferentemente comprenden al menos 20 pares de bases, más preferentemente al menos aproximadamente 50 pares de bases y aún más preferentemente un ácido nucleico de la invención comprende al menos aproximadamente 100, 200, 250 o 300 pares de bases.

25 Los ácidos nucleicos preferidos de forma general expresarán un anticuerpo de la invención que muestra las afinidades de unión preferidas y otras propiedades desveladas en el presente documento.

30 Otros ácidos nucleicos también tendrán identidad de secuencia sustancial con una o ambas de las secuencias de cadena ligera o pesada mostradas en las Figuras 1A y 1B. Más particularmente, los ácidos nucleicos preferidos comprenderán una secuencia que tiene al menos aproximadamente el 70 por ciento de homología (identidad de secuencia de nucleótidos) con SEC ID N°: 1 y/o 3, más preferente aproximadamente el 80 por ciento o más de homología con SEC ID N°: 1 y/o 3, aún más preferentemente aproximadamente el 85, el 90 o el 95 por ciento o más de homología con SEC ID N°: 1 y/o 3.

35 Las secuencias de ácido nucleico adicionalmente específicas tendrán identidad de secuencia elevada con regiones hipervariables (mostradas subrayadas en las Figuras 1A y 1B) de SEC ID N°: 1 y 3). Tales ácidos nucleicos incluyen aquellos que codifican un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo y tienen una, dos o tres secuencias que codifican regiones hipervariables y tienen identidad de secuencia elevada (identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 90% o el 95%) con o son iguales a una, dos o tres de las secuencias que codifican regiones hipervariables correspondientes de H36.D2.B7 (las regiones hipervariables mostradas subrayadas en la Figura 1A y que son las siguientes:

- 1) CTGGCAAGTCAGACCATTGAT (SEC ID N°: 11);
- 2) GCTGCCACCAACTTGGCAGAT (SEC ID N°: 12); y
- 3) CAACAAGTTTACAGTTCTCCATTACGT (SEC ID N°: 13).

45 Los ácidos nucleicos más específicos también codifican un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo y tienen una, dos o tres secuencias que codifican regiones hipervariables y tienen identidad de secuencia elevada (identidad de secuencia de al menos el 90% o el 95%) con o son iguales a una, dos o tres de las secuencias que codifican regiones hipervariables correspondientes de H36.D2.B7 (aquellas regiones hipervariables mostradas subrayadas en la Figura 1B y que son las siguientes:

- 1) ACTGACTACAACGTGTAC (SEC ID N°: 14);
- 2) TATATTGATCCTTACAATGGTATTACTATCTACGACCAGAACTTCAAGGGC (SEC IN N° 15); y
- 3) GATGTGACTACGGCCCTTGACTTC (SEC ID N°: 16).

55 Los anticuerpos humanizados más específicos que se unen a FT son aquellos en los cuales cada una de las regiones flanqueantes (FR) 1, 2, 3 y 4 tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 90%, preferentemente al menos aproximadamente el 95% o identidad mayor con las secuencias de FR de cadena ligera mostradas en la Figura 3A (SEC ID N°: 72-82), preferentemente, la secuencia mostrada como "LC-09" en la Figura 3A. Los anticuerpos humanizados adicionalmente específicos incluyen un dominio constante de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia o más con la secuencia mostrada en la Figura 5A (SEC ID N°: 97) o Figura 6A (SEC ID N°: 99).

65 Los anticuerpos humanizados específicos adicionales son aquellos en los cuales cada una de las regiones flanqueantes (FR) 1, 2, 3 y 4 tiene al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente aproximadamente el 95% de identidad o mayor con las secuencias de cadena pesada mostradas

en la Figura 4A (SEC ID N°: 83-96), preferentemente, la secuencia mostrada como "HC-08" en la Figura 4A. Los anticuerpos humanizados adicionales tienen un dominio constante de cadena pesada con al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad o mayor, con la secuencia mostrada en la Figura 5B (SEC ID N°: 98) o Figura 6B (SEC ID N°: 100).

En determinados casos, el anticuerpo humanizado tendrá un isotipo de IgG1 (hOAT) o IgG4 (hFAT) como se desvela en el documento WO 03/037911.

Los fragmentos funcionales de los anticuerpos humanizados también se desvelan en el presente documento. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero sin limitación, aquellos que se unen a FT con una constante de afinidad (Kd) de menos de aproximadamente 1 nM, preferentemente menos de aproximadamente 0,5 nM, más preferentemente entre desde aproximadamente 0,01 nM hasta aproximadamente 0,4 nM. Los fragmentos de unión a antígeno Fab, Fab' y F(ab)₂ son preferidos de forma específica.

Como se ha descrito, los anticuerpos humanizados preparados mediante el método de la presente invención pueden incluir al menos una región determinante de complementariedad murina (CDR), por ejemplo, CDR1, CDR2, CDR3. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden unir específicamente a factor tisular humano (FT) para formar un complejo. Típicamente, el factor X o factor IX que se une a FT o FT: FVIIa y la activación por FT: FVIIa al mismo está inhibida. Como se ha mencionado anteriormente, las CDR preferidas (cadena ligera y pesada) son de una fuente de roedor, típicamente el ratón.

Los anticuerpos humanizados preparados mediante el método de la invención pueden incluir además al menos un subconjunto de región flanqueante (FR) humano. Preferentemente, todas las FR (cadenas ligera y pesada) son humanas.

De forma adecuada, la primera CDR (CDR1) de la región hipervariable de cadena pesada que se une a FT humano es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en la Figura 4B (SEC ID N°: 104), preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia. Típicamente, la segunda CDR (CDR2) de la región hipervariable de cadena pesada es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en la Figura 4C (SEC ID N°: 9 y 101), preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica o más. También preferentemente, la tercera CDR (CDR3) de la región hipervariable de cadena pesada es al menos el 90% idéntica a la secuencia de CDR3 mostrada en la Figura 4D (SEC ID N°: 10), más preferentemente aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia.

De forma adecuada, la primera CDR (CDR1) de la región hipervariable de cadena ligera que se une a FT humano es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en la Figura 3B (SEC ID N°: 103), preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica o más. Típicamente, la segunda CDR (CDR2) de la región hipervariable de cadena ligera es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en la Figura 3C (SEC ID N°: 6), preferentemente aproximadamente el 95% idéntica o más. Preferentemente, la tercera CDR (CDR3) de la región hipervariable de cadena ligera es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en la Figura 3D (SEC ID N°: 7), más preferentemente aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia.

Los anticuerpos humanizados adicionales preparados mediante el método de la invención incluyen una primera región flanqueante (FR1) de la región hipervariable de cadena pesada que se une a FT humano, FR1 que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4A (SEC ID N°: 91) como "FR1 HC-08", preferentemente aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia. De forma adecuada, la FR1 comprende al menos uno de los siguientes cambios de aminoácidos: E1 a Q; Q5 a V; P9 a G; L11 a V; V12 a K, Q 19 a R y T24 a A. Preferentemente, la FR1 incluye dos, tres, cuatro, cinco o seis de esos cambios prefiriéndose todos esos cambios de aminoácidos para muchas aplicaciones.

Los anticuerpos humanizados adicionales que se unen de forma adecuada a FT humano incluyen una segunda región flanqueante (FR2) de la región hipervariable de cadena pesada, FR2 que es al menos el 90% idéntica a la secuencia mostrada en la Figura 4A (SEC ID N°: 91) como "FR2 HC-08", preferentemente aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia. De forma adecuada, la FR2 tiene al menos uno de los siguientes cambios de aminoácidos: H41 a P y S44 a G. Una FR2 preferida incluye ambos de esos cambios de aminoácido.

El método de la invención también puede producir anticuerpos humanizados que se unen a FT humano en los cuales una tercera región flanqueante (FR3) de la región hipervariable de cadena pesada es al menos el 90% idéntica a la secuencia mostrada en la Figura 4A (SEC ID N°: 91) como "FR3 HC-08", preferentemente aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia. De forma adecuada, la FR3 incluye al menos uno de los siguientes cambios de aminoácidos: S76 a T; T77 a S; F80 a Y; H82 a E; N84 a S; T87 a R; D89 a E y S91 a T. Una FR3 preferida incluye dos, tres, cuatro, cinco o seis de esos cambios de aminoácidos prefiriéndose de forma general los siete cambios de aminoácidos.

El método de la presente invención también puede producir anticuerpos humanizados que se unen de forma adecuada a FT humano en los cuales la cuarta región flanqueante (FR4) de la región hipervariable de cadena pesada es de al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4A (SEC ID N°: 91) como "FR4 HC-08", preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia.

5 Preferentemente, la FR4 incluye el siguiente cambio de aminoácidos: L113 a V.

Los anticuerpos humanizados adicionales que se pueden preparar de acuerdo con el método de la invención y que se unen a FT humano presentan una primera región flanqueante (FR1) de la región hipervariable de cadena ligera que es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 3A (SEC ID N°: 79) como "FR1 LC-09", preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia. De forma adecuada, la FR1 comprende al menos uno de los siguientes cambios de aminoácidos: Q11 a L; L 15 a V, E 17 a D; y S 18 a R. Una FR1 preferida incluye dos o tres de tales cambios de aminoácidos prefiriéndose de forma general los cuatro cambios de aminoácidos.

10

El método de la presente invención también puede producir anticuerpos humanizados que se unen a FT humano en los cuales una segunda región flanqueante (FR2) de la región hipervariable de cadena ligera es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 3A (SEC ID N°: 79) como "FR2 LC-09", preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia. Una FR2 preferida tiene el siguiente cambio de aminoácidos: Q37 a L.

15

El método de la presente invención también puede producir anticuerpos humanizados que se unen FT humano en los cuales una tercera región flanqueante (FR3) de la región hipervariable de cadena ligera es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 3A (SEC ID N°: 79) como "FR3 LC-09", preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia. De forma adecuada, la FR3 tiene al menos uno de los siguientes cambios de aminoácidos: K70 a D, K74 a T, A80 a P, V84 a A, y N85 a T. Preferentemente, la FR3 tiene dos, tres, o cuatro de tales cambios de aminoácidos prefiriéndose de forma general los cinco cambios.

20

Los anticuerpos humanizados adicionales que se pueden preparar mediante el método de la invención y que se unen a FT incluyen una cuarta región flanqueante (FR4) de la región hipervariable de cadena ligera, FR4 que es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia mostrada en la Figura 3A (SEC ID N°: 79) como "FR4 LC-09", preferentemente al menos aproximadamente el 95% idéntica o más a esa secuencia. De forma adecuada, la FR4 incluye al menos uno y preferentemente todos los siguientes cambios de aminoácidos: A100 a Q, y L106 a I.

30

El método de la invención también puede producir un fragmento de unión a FT humano de los anticuerpos humanizados anteriores. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen Fab, Fab' y F(ab)₂.

35

El documento WO 03/037911 describe anticuerpos anti-FT humanizados preferidos adicionales que se pueden preparar mediante el método de la invención. Como se desvela en ese documento, se han depositado los siguientes tres vectores de ácido nucleico pSUN36 (vector de expresión de Ig G1-HC de anticuerpo anti-FT humanizado), pSUN37 (vector de expresión de Ig G4-HC de anticuerpo anti-FT humanizado) y pSUN38 (vector de expresión de LC de anticuerpo anti-FT humanizado) de acuerdo con el Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) en 10801 University Boulevard, Manassas VA 20110-2209. A los vectores se asignaron los siguientes Números de Acceso: PTA-3727 (pSUN36), PTA-3728 (pSUN37), y PTA-3729 (pSUN38).

40

Las estrategias de expresión y purificación adecuadas para preparar y usar los anticuerpos anti-FT humanizados de la presente invención se han desvelado en el documento WO 03/037911.

45

B. Preparación de anticuerpo de unión anti-LTA humanizado

50

El anticuerpo quimérico anti-LTA original es el objeto de las siguientes solicitudes de patente: "Opsonic and Protective Monoclonal and Chimeric Antibodies specific of Lipoteichoic Acid of Gram Positive Bacteria" a la espera de U.S.S.N. 09/097.055 (Publicada como documento WO 98/57994).

La preparación y uso de un anticuerpo de unión anti-LTA (ácido lipoteicoico) humanizado se describe más adelante en los Ejemplos 4-5. Los anticuerpos preferidos se unen generalmente a LTA para formar un complejo de unión específico. Los anticuerpos anti-LTA quiméricos particulares se unen a antígeno con una constante de afinidad aparente (K_A , M^{-1}) de menos de aproximadamente $1 \mu M$, preferentemente menos de aproximadamente 100 nM, más preferentemente entre desde aproximadamente 20 nM hasta aproximadamente 2 nM. Véase el Ejemplo 5, más adelante para información adicional acerca de la caracterización de anticuerpos anti-LTA.

55

El ácido lipoteicoico es un componente celular encontrado en algunas bacterias Gram positivas incluyendo especies de *Staphylococcus*, algunas especies de *Streptococcus* y *Enterococcus*. El mismo se incorpora en la pared celular como parte de un polímero macromolecular mixto que es heterodisperso en peso molecular y como tal el componente de LTA se puede encontrar en paredes celulares y fragmentos de las mismas que pueden tener un intervalo de masa molecular extremadamente amplio.

65

Los anticuerpos de unión anti-LTA humanizados más preferidos tienen una constante de asociación (K_A , M^{-1}) para LTA de al menos aproximadamente $5 \times 10^6 M^{-1}$ determinada mediante análisis de plasmón superficial (particularmente, análisis BIAcore de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 3 que se presenta a continuación), más preferentemente al menos aproximadamente $1 \times 10^7 M^{-1}$ determinada mediante análisis de plasmón superficial, aún más preferentemente una K_A para LTA de al menos aproximadamente $1 \times 10^8 M^{-1}$ determinada mediante análisis de resonancia de plasmón superficial.

De forma adecuada, la primera CDR (CDR1) de la región hipervariable de cadena ligera que se une al antígeno LTA es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en la Figura 7A (subrayada) preferentemente al menos aproximadamente el 95% o más de identidad. Típicamente, la segunda CDR (CDR2) de la misma región hipervariable de cadena ligera es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en la Figura 7A (subrayada), preferentemente al menos aproximadamente el 95% o más de identidad. También preferentemente, la tercera CDR (CDR3) de la región hipervariable de cadena ligera es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en la Figura 7A (subrayada), más preferentemente al menos aproximadamente el 95% o más de identidad de secuencia.

Con respecto a la región hipervariable de cadena pesada, los anticuerpos anti-LTA preferidos adicionalmente mostrarán al menos aproximadamente el 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en la Figura 7B (subrayada), preferentemente al menos aproximadamente el 95% o más de identidad. Típicamente, la segunda CDR (CDR2) de la misma región hipervariable de cadena ligera es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en la Figura 7B (subrayada), preferentemente al menos aproximadamente el 95% o mayor de identidad. También preferentemente, la tercera CDR (CDR3) de la región hipervariable de cadena ligera es al menos aproximadamente el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en la Figura 7B (subrayada), más preferentemente al menos aproximadamente el 95% o más de identidad de secuencia.

Los anticuerpos anti-LTA específicos adicionalmente incluyen aquellos en los cuales cada uno de los subconjuntos de región flanqueante de cadena ligera (FR) 1, 2, 3 y 4 tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 90%, preferentemente al menos aproximadamente el 95%, el 98% hasta el 100% de identidad con cada una de las secuencias de FR de cadena ligera mostradas en la Tabla 6 del Ejemplo 5. En una realización, el armazón incluye al menos uno y preferentemente todos los cambios de aminoácidos siguientes: D1 a Q; S5 a T; L11 a M; E17 a D; M21 a I; S41 a Q; R76 a A; V77 a M, y M102 a K. Un anticuerpo anti-LTA especialmente preferido tiene al menos uno de y preferentemente todos los subconjuntos de FR de cadena L mostrados para el A110-LC en la Tabla 6 del Ejemplo 5. Es decir, LC-FR1 (restos 1 a 23 de SEC ID N°: 109); LC-FR2 (restos 24 a 38 de SEC ID N°: 109); LC-FR3 (restos 39 a 70 de SEC ID N°: 109) y LC-FR4 (restos 71 a 80 de SEC ID N°: 109).

Los anticuerpos humanizados específicos adicionales que se unen específicamente al antígeno LTA incluyen aquellos en los cuales cada una de las regiones flanqueantes (FR) 1, 2, 3 y 4 tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 90%, preferentemente aproximadamente el 95%, el 98% hasta el 100% de identidad con las secuencias de cadena pesada mostradas en la Tabla 7 del Ejemplo 5. En una realización, el armazón incluye al menos uno y preferentemente todos los cambios de aminoácidos siguientes: M3 a Q; K15 a G; Q78 a K; S79 a N; M80 a S; N87 a S; M95 a V, V99 a A y L119 a V. Un anticuerpo anti-LTA especialmente preferido tiene al menos uno de y preferentemente todos los subconjuntos de FR de cadena H mostrados para el A110-HC en la Tabla 7 del Ejemplo 5. Es decir, HC-FR1 (restos 1 a 25 de SEC ID N°: 118); HC -FR2 (restos 26 a 39 de SEC ID N°: 118); HC -FR3 (restos 40 a 71 de SEC ID N°: 118) y HC -FR4 (restos 72 a 82 de SEC ID N°: 118).

De forma adecuada, el anticuerpo anti-LTA humanizado tendrá un isotipo de dominio constante de cadena pesada de IgG1 (similar a hOAT) o de dominio constante de cadena pesada de IgG4 (similar a hFAT). Véase el documento WO 03/037911.

Los anticuerpos anti-LTA adicionalmente preferidos tendrán cada una de las FR de cadena ligera y pesada mostradas en las Tablas 6 y 7 del Ejemplo 5.

Los anticuerpos anti-LTR humanizados preferidos adicionales tendrán un dominio variable de cadena ligera de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferentemente al menos aproximadamente el 98% o identidad mayor con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 9A (SEC ID N°: 109). Más preferentemente, un anticuerpo de este tipo tendrá un dominio variable de cadena ligera que es el mismo al de la secuencia mostrada en la Figura 9A (SEC ID N°: 109). Los anticuerpos adicionalmente preferidos tendrán un dominio variable de cadena pesada de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 95%, preferentemente al menos aproximadamente el 98% o identidad mayor con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 9E (SEC ID N°: 118). Más preferentemente, un anticuerpo de este tipo tendrá un dominio variable de cadena pesada que es igual a la secuencia mostrada en la Figura 9E (SEC ID N°: 118).

En un ejemplo particular, se proporciona un anticuerpo anti-LTA humanizado que se une específicamente a LTA e incluye al menos una CDR de roedor, habitualmente de un ratón. Preferentemente, el antígeno de LTA se une específicamente al anticuerpo para formar un complejo. También preferentemente, un anticuerpo anti-LTA humanizado de este tipo incluye, en la cadena pesada, al menos uno de y preferentemente todos los siguientes componentes:

- 5
- a) una primera CDR (CDR1) que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en la Figura 9F (SEC ID N°: 124),
 - 10 b) una segunda CDR (CDR2) que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en la Figura 9G (SEC ID N°: 125),
 - c) una tercera CDR (CDR3) que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en la Figura 9H (SEC ID N°: 126),
 - d) un primer subconjunto de armazón (FR1) que es al menos el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 6A (restos 1 a 23 de SEC ID N°: 109) como "LC-FR1",
 - 15 e) un segundo subconjunto de armazón (FR2) que es al menos el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 6A (restos 24 a 38 de SEC ID N°: 109) como "LC-FR2",
 - f) un tercer subconjunto de armazón (FR3) que es al menos el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 6B (restos 39 a 70 de SEC ID N°: 109) como "LC-FR3",
 - 20 g) un cuarto subconjunto de armazón (FR4) que es al menos el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 6B (restos 71 a 80 de SEC ID N°: 109) como "LC-FR4".

De forma adecuada, el anticuerpo anti-LTA humanizado también incluye, en la cadena ligera, al menos uno de y preferentemente todos los siguientes componentes:

- 25
- h) una primera CDR (CDR1) que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR1 mostrada en la Figura 9B (SEC ID N° 115),
 - i) una segunda CDR (CDR2) que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR2 mostrada en la Figura 9C (SEC ID N°: 116),
 - 30 j) una tercera CDR (CDR3) que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de CDR3 mostrada en la Figura 9D (SEC ID N°: 117),
 - k) un primer subconjunto de armazón (FR1) que es al menos el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 7A (restos 1 a 25 de SEC ID N°: 118) como "HC-FR1",
 - l) un segundo subconjunto de armazón (FR2) que es al menos el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 7A (restos 26 a 39 de SEC ID N°: 118) como "HC-FR2",
 - 35 m) un tercer subconjunto de armazón (FR3) que es al menos el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 7B (restos 40 a 71 de SEC ID N°: 118) como "HC-FR3", y
 - n) un cuarto subconjunto de armazón (FR4) que es al menos el 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 7B (restos 72 a 82 de SEC ID N°: 118) como "HC-FR4". Preferentemente, el anticuerpo humanizado incluye además la secuencia constante de cadena ligera de la Figura 6A (hFAT (IgG4) SEC ID N°: 99). También preferentemente, el anticuerpo incluye la región constante de cadena pesada de la Figura 6B (IgG4 SEC ID N°: 100).
- 40

De forma adecuada, las moléculas de ácido nucleico codifican uno o más del dominio variable de cadena ligera anti-LTA de aminoácidos y dominio variable de cadena pesada anti-LTA mostrados en la Figura 9A (SEC ID N°: 109-114) y 9E (SEC ID N°: 118-123), respectivamente. Los ácidos nucleicos más específicos expresan al menos parte de un anticuerpo de unión anti-LTA que muestra las afinidades de unión preferidas y otras propiedades desveladas en el presente documento. El peso molecular de tales ácidos nucleicos generalmente será menor de aproximadamente 1000 pares de bases (pb), preferentemente entre desde aproximadamente 200 pb hasta aproximadamente 750 pb, determinado mediante métodos de electroforesis en gel convencionales.

50 Un ácido nucleico específicamente preferido es el plásmido representado por la Figura 8 (pJRS 391).

También se proporcionan fragmentos funcionales de los anticuerpos anti-LTA humanizados desvelados en el presente documento. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero sin limitación, los que se unen a LTA con una constante de afinidad aparente (K_A , M^{-1}) de menos de aproximadamente 100 nM, preferentemente menos de aproximadamente 25 nM, más preferentemente entre desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 5 nM. Los fragmentos de unión a antígeno Fab, Fab' y F(ab)₂, Fv de cadena única y anticuerpos de longitud completa son preferidos específicamente.

60 En general, los ácidos nucleicos son aislados, habitualmente constituyen al menos aproximadamente el 0,5%, preferentemente al menos aproximadamente el 2% y más preferentemente al menos aproximadamente el 5% en peso del ácido nucleico total presente en una fracción dada. Un ácido nucleico parcialmente puro constituye al menos aproximadamente el 10%, preferentemente al menos aproximadamente el 30% y más preferentemente al menos aproximadamente el 60% en peso del ácido nucleico total presente en una fracción dada. Un ácido nucleico puro constituye al menos aproximadamente el 80%, preferentemente al menos aproximadamente el 90% y más preferentemente al menos aproximadamente el 95% en peso del ácido nucleico total presente en una fracción dada.

65

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la invención. En los siguientes ejemplos y en otras partes el método de la invención se aplica a la humanización del anticuerpo anti-factor tisular murino H36 y el anticuerpo anti-ácido lipoteicoico A110. H36 también se denomina H36.D2 y H36.D2.B7, pero H36 es el anticuerpo producido por el clon madre y H36.D2 se obtiene a partir del clon primario, mientras que H36.D2.B7 se obtiene a partir del clon secundario. No se han observado diferencias entre el anticuerpo producido por esos tres clones con respecto a la capacidad del anticuerpo de inhibir FT u otras propiedades físicas. Durante el uso general, H36 con frecuencia se usa para indicar anticuerpo anti-FT producido por cualquiera de estos clones o líneas de células relacionadas que producen el anticuerpo. La versión quimérica ratón-humana de H36 se denomina cH36 (y también Sunol-cH36). El anticuerpo anti-ácido lipoteicoico A110 también se denomina 96-110, c96-110 y BSYX-A110 y es un anticuerpo quimérico ratón-humano.

Véase el documento WO 03/03791 para divulgación adicional con respecto a la preparación y el uso del anticuerpo H36. Véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.986.065.

15 **EJEMPLO 1 - Humanización de anticuerpo anti-factor tisular**

La descripción de cómo preparar y usar un anticuerpo particular murino denominado H36.D2 (también denominado algunas veces H36 como se ha descrito anteriormente) se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.986.065. El presente ejemplo muestra cómo preparar y usar una versión humanizada de ese anticuerpo. Un anticuerpo H36 humanizado tiene una diversidad de usos incluyendo ayudar a minimizar el potencial de respuestas inmunológicas de anticuerpo anti-ratón humanas (HAMA). Estas y otras respuestas indeseadas presentan problemas para el uso del anticuerpo H36 en aplicaciones terapéuticas humanas.

25 A. Preparación de anticuerpo anti-factor tisular quimérico (cH36)

El anticuerpo H36 descrito previamente es un anticuerpo murino de IgG2a. H36 se convirtió en primer lugar en un anticuerpo quimérico de ratón-humano para desarrollo clínico. Para realizar esto, los genes de cadena pesada y ligera de H36 se clonaron (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.986.065). El dominio variable de cadena pesada se fusionó a un dominio constante (Fc) de IgG4 humana y el dominio variable de cadena ligera se fusionó a un dominio constante de cadena ligera kappa humana. El anticuerpo quimérico IgG4 κ resultante se denominó cH36 (y también se denomina Sunol-cH36). Para usos múltiples de H36 o cH36 en pacientes con enfermedades crónicas, se prefiere un cH36 completamente humanizado de forma que el mismo disminuirá o eliminará cualquier respuesta inmunológica de anticuerpo anti-quimérico humana (HACA). La humanización de cH36 se describe más adelante.

35 B. Estrategia de humanización para anticuerpos cH36

La humanización del anticuerpo anti-factor tisular quimérico cH36 se consiguió usando un método de "mejor ajuste de FR" de la invención. Este método se aprovecha completamente del hecho de que un gran número de IgG humanas con secuencias de aminoácido conocidas o secuencias de fragmentos de IgG humana están disponibles en las bases de datos públicas. Las secuencias de las regiones flanqueantes individuales de los dominios variables pesado y ligero de ratón en cH36 se comparan con las secuencias respectivas de dominios variables de cadena pesada o ligera o armazones humanos (o fragmentos de los mismos) en la base de datos de Kabat (véase <http://immuno.bme.nwu.edu>). Los siguientes criterios se usaron para seleccionar los subconjuntos de región flanqueante de IgG humanos deseados para humanización: (1) El número de aminoácidos no coincidente se mantuvo tan bajo como fue posible. (2) Los aminoácidos dentro de la zona de "vernier" (los aminoácidos en esta zona pueden ajustar la estructura de CDR y afinar el ajuste para antígeno, véase Foote, J. y Winter, G., J., Mol. Bio. 224 (2): 487-499 [1992]) se dejaron sin cambiar. (3) Las sustituciones de aminoácidos conservativas se favorecieron cuando se evaluaban candidatos similares. El programa de coincidencia usado para esta comparación se puede encontrar en la base de datos de Kabat. Véase Johnson G, Wu T "Kabat database and its application: Future directions". Nucleic Acids Res. (2001) 29: 205-206. El programa encuentra y alinea regiones de homología entre las secuencias de ratón y las secuencias humanas en la base de datos de Kabat. Mediante el uso de este método de mejor ajuste de FR único, se anticipa que los dominios variables de LC o HC humanizados de la IgG diana pueden tener las cuatro FR obtenidas a partir de tan poco como una molécula de IgG humana o tanto como cuatro moléculas de IgG humana diferentes.

55 B (i). Selección de regiones flanqueantes de dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana

La secuencia de aminoácidos en cada una de las regiones flanqueantes de LC de cH36 se comparó con la secuencia de aminoácidos en las FR en dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana en la base de datos de Kabat. La FR de mejor ajuste se seleccionó en base a los tres criterios descritos anteriormente.

La secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 005191 se seleccionó para humanización de FR1 de LC de cH36. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 019308 se seleccionó para humanización de FR2 de LC de cH36. Se realizaron las siguientes mutaciones en FR1 de LC de cH36 para hacer coincidir la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera kappa de IgG

humana con una ID de base de datos de Kabat N° 005191: Q11 → L, L15 → V, E17 → D, S18 → R. Una mutación Q37 → L se realizó en FR2 de LC de cH36 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 019308 (véase la Tabla 1A para información de secuencia).

5 La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 038233 se seleccionó para humanización de FR3 de LC de cH36. La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 004733 se seleccionó para humanización de FR4 de LC de cH36. Las siguientes mutaciones se realizaron en FR3 de LC de
10 cH36 para igualar la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 038233: K70 → D, K74 → T, A80 → P, V84 → A, N85 → T. Dos mutaciones A100 → Q y L106 → I se realizaron en FR4 de LC de cH36 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 004733 (véase la Tabla 1B para información de secuencia).

15 B (ii). Selección de regiones flanqueantes de dominio variable de cadena pesada de IgG humana

La secuencia de aminoácidos en cada una de las regiones flanqueantes de HC de cH36 se comparó con la secuencia de aminoácidos en las FR en dominio variable de cadena pesada de IgG humana en la base de datos de
20 Kabat. La FR de mejor ajuste se seleccionó en base a los tres criterios descritos anteriormente.

La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000042 se seleccionó para humanización de FR1 de HC de cH36. La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 023960 se seleccionó para humanización de FR2 de HC de cH36. Las siguientes mutaciones se realizaron en FR1 de HC de
25 cH36 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000042: E1 → Q, QS → V, P9 → G, L11 → V, V12 → K, Q19 → R, T24 → A. Dos mutaciones H41 → P y S44 → G se realizaron en FR2 de HC de cH36 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 023960 (véase la
30 Tabla 2A para información de secuencia).

La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 037010 se seleccionó por humanización de FR3 de HC de cH36. La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000049 se seleccionó para humanización de FR4 de HC de cH36. Las siguientes mutaciones se realizaron en FR3 de HC de
35 cH36 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 037010: S76 → T, T77 → S, F80 → Y, H82 → E, N84 → S, T87 → R, D89 → E, S91 → T. Una mutación L113 → V se realizó en FR2 de HC de cH36 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000049 (véase la
40 Tabla 2B para información de secuencia).

Tabla 1. Comparación de secuencias de FR de cH36 (SEC ID N°: 72) y cadena ligera humana (LC) (SEC ID N°: 79)

Tabla 1A	
Nombres	LC-FR1 (23 aa)
cH36-LC	1 10 20 35 49 DIQMTQSPASQSASLGESVTITC WYQQKPGKSPQLLIY
LC-Humana	L V DR L 005191 019308
Tabla 1B	
Nombres	LC-FR3 (32 aa) LC-FR4 (10 aa)
cH36-LC	57 60 70 80 88 98 107 GVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYC FGAGTKLELK
LC-Humana	D T P AT Q I 038233 004733

Tabla 2. Comparación de secuencias de FR de cH36 (SEC ID N°: 83) y cadena pesada humana (HC) (SEC ID N°: 91)

Tabla 2A		
Nombres	HC-FR1 (30 aa)	
	1 10 20 30 36 49	
cH36-LC	EIQ LQQSGPELVKPGASVQV SCKTSGYSFT WVRQSHGKSLEWIG	
HC-Humana	Q V G VK R A P G	
	000042 023960	
Tabla 2B		
Nombres	LC-FR3 (32 aa)	HC-FR4 (11 aa)
	67 75 85 95 107 117	
cH36-LC	KATLTVDKSSTTAFMHLNSLTSDDSAVYFCAR	WGQGTTLTVSS
HC-Humana	TS Y E S R E T	V
	037010	000049

Una vez que se tomaron las decisiones acerca de las regiones flanqueantes humanas deseadas, se usaron las siguientes tres técnicas para conseguir las sustituciones de aminoácidos deseadas tanto en las cadenas ligera como pesada: (1) Se usó PCR regular para clonación, para introducir sitios de endonucleasa de restricción de clonación o de diagnóstico y para cambiar los restos de aminoácidos localizados en los extremos de los dominios variables. (2) Se usó mutagénesis basada en PCR para cambiar múltiples restos de aminoácidos a la vez, especialmente cuando estos restos estaban en el centro de los dominios variables. (3) Se usó mutagénesis dirigida para introducir una o dos sustituciones de aminoácidos a la misma vez. Se llevó a cabo mutagénesis dirigida siguiendo el protocolo descrito en "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" de Stratagene (N° de catálogo 200518).

Después de cada etapa, los clones parcialmente humanizados se secuenciaron y algunos de estos dominios variables se clonaron posteriormente en vectores de expresión. El plásmido tKMC180 se usó para expresar mutantes de LC, y pJRS 355 o el vector pLAM 356 se usó para expresar mutantes de HC como IgG1 o IgG4, respectivamente. Algunos de estos clones se combinaron posteriormente y se expresaron de forma transitoria en células COS para determinar los niveles de expresión mediante ELISA.

Las formas completamente humanizadas finales de los dominios variables pesado y ligero anti-FT se clonaron en lo que se denomina algunas veces en el presente documento un "mega vector" y se transfectaron en células CHO y NSO para expresión de IgG. Las líneas celulares estables se usaron posteriormente para producir cantidades suficientes de anti-FT humanizado para análisis. Las versiones humanizadas resultantes tienen un origen 100% humano (cuando no se consideran las secuencias de CDR). La versión kappa de IgG4 humanizada se denomina hFAT (anticuerpo Anti-factor Tisular de IgG Cuatro Humanizado, por sus siglas en inglés) y la versión kappa de IgG1 se denomina hOAT (anticuerpo Anti-Factor Tisular de IgG Uno Humanizado, por sus siglas en inglés). Estas versiones completamente humanizadas de cH36 tienen por objeto tratar indicaciones crónicas, tales como trombosis, cáncer y enfermedades inflamatorias.

C. Generación de cadena pesada de anticuerpo anti-FT humanizado

1. Amplificación por PCR y clonación en pGem T-easy de dominio variable de cadena pesada (HC) de mAb cH36 anti-FT se llevó a cabo usando el plásmido pJAlgG4TF.A8 (un vector de expresión de H36 quimérico) como un molde y los cebadores TFHC1s2 y TFHC1as2. El cebador TFHC1s2 introdujo un sitio *Bsi*/W1 cadena arriba del codón de inicio y también un cambio de aminoácido **E1** a Q en el armazón 1 (FR). El cebador TFHC1as introdujo un cambio de aminoácido **L113** a V en FR4. Esta etapa dio como resultado la construcción **HC01**.

2. La mutagénesis basada en PCR usando la construcción anterior (HC01) y los siguientes cuatro cebadores generaron la construcción **HC02**. La PCR cadena arriba usó los cebadores TFHC1s2 y TFHC7as. La PCR cadena abajo usó los cebadores TFHC7s y TFHC1as2. La PCR que usa productos de PCR cadena arriba y cadena abajo como moldes y con los cebadores TFHC1s2 y TFHC1as2 produjo **HC02**. El uso de los cebadores TFHC7s y TFHC7as introdujo dos cambios de aminoácidos en FR2: **H41** a P y **S44** a G.

3. La mutagénesis basada en PCR usando HC02 como molde y los siguientes cuatro cebadores generó la construcción **HC03**. La PCR cadena arriba usó los cebadores TFHC1s2 y TFHC5as2. La PCR cadena abajo usó los cebadores TFHC5s y TFHC1as2. La PCR que usa productos de PCR cadena arriba y cadena abajo como moldes y con cebadores TFHC1s2 y TFHC1as2 produjo **HC03**. El uso de los cebadores TFHC5s y TFHC5as2 introdujo tres cambios de aminoácidos en FR3: **T87** a R, **D89** a E y **S91** a T. También se introdujo un sitio *Bgl* II en la posición 87.

4. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando los cebadores TFHC2s y TFHC3as y **HC03** en pGem como molde. TFHC2s se encuentra cadena arriba del sitio de clonación en pGem. TFHC3as se encuentra en el

almazón 3 e introduce dos cambios de aminoácidos en FR3: **H82** a E y **N84** a S. La banda de PCR resultante se clonó en pGEM y después el inserto de tamaño apropiado se digirió con *BsiW1* y *Bgl* II. La clonación de este fragmento en **HC03** produce **HC04**.

5 5. La mutagénesis basada en PCR usando **HC04** como molde y los siguientes cebadores dio como resultado **HC05**. La PCR cadena arriba usó los cebadores TFHC1s2 y TFHC6as. La PCR cadena abajo usó los cebadores TFHC6s y TFHC1as2. La PCR mutagénica que usa productos de PCR cadena arriba y cadena abajo como moldes y con los cebadores TFHC1s2 y TFHC1as2 produjo **HC05**. Esta etapa introdujo los siguientes cambios de aminoácidos en FR3: **S76** a T, **T77** a S y **F80** a Y.

10 6. La mutagénesis basada en PCR que usa **HC05** como molde y los siguientes cuatro cebadores generó **HC06**. La PCR cadena arriba usa los cebadores TFHC2s y TFHC2as2. La PCR cadena abajo usó los cebadores TFHC3s2 y TFHC1as2. La amplificación que usa TFHC2as2 introdujo un cambio de aminoácido en FR1: **P9** a G. El cebador TFHC3s2 los cambios **Q19** a R y **T24** a A. La PCR que usa productos de PCR cadena arriba y cadena abajo como molde y con los cebadores TFHC1s2 y TFHC1as2 produjo **HC06**.

15 7. Una mutación puntual de I a M en la posición 2 de FR1 se introdujo de forma espontánea durante la construcción de **HC06**. La amplificación por PCR usando **HC06** como molde y TFHC1s3 y TFHC1as2 como cebadores, corrigió esta sustitución errónea y también introdujo un cambio de aminoácidos en FR1: **Q5** a V. La construcción resultante fue **HC07**.

20 8. La construcción **HC08** se preparó mediante mutagénesis basada en PCR usando **HC07** como molde y los siguientes cebadores. TFHC2s y TFHC2as3 se usaron para el producto cadena arriba. El producto cadena abajo se amplificó previamente usando TFHC1s3 y TFHC1as2 (véase la etapa 7). El uso del cebador TFHC2as3 introdujo dos cambios de aminoácidos en FR1: **L11** a V y **V12** a K. Una mutación puntual espontánea dio como resultado un cambio de fenilalanina a leucina (F → L) en la posición 64 en CDR2. La exploración y secuenciación adicional produjo la construcción **HC08R1**, que tenía la secuencia correcta de F en la posición 64 en CDR2.

25 9. Dos construcciones, **HC11** y **HC12**, se generaron mediante mutagénesis dirigida a partir de **HC07**. Dos cebadores complementarios TFHC8sP y TFHC8asP se usaron junto con **HC07** como molde para producir **HC11** que contiene tres cambios de aminoácidos en FR1: G9 a P, L11 a V, y V12 a K. Posteriormente, **HC11** se metiló y se purificó en columna para la siguiente ronda de mutagénesis dirigida. La PCR que usa **HC11** como un molde y los cebadores complementarios TFHC9sL y TFHC0asL generó **HC12** que tiene una mutación de **V11** a L en FR1.

30 10. La construcción **HC09** se obtuvo a partir de **HC12** realizando PCR usando **HC12** como un molde y los cebadores complementarios TFHC10sK y TFHC10asK. **HC09** contiene un cambio de aminoácido: **K12** a V en FR1.

35 11. La construcción **HC10** se preparó a partir de **HC09**. La PCR que usa **HC09** como un molde y los cebadores complementarios LV-1 y LV-2 dio como resultado la generación de **HC10**, que contiene una mutación de **L11** a V en FR1.

40 Después de cada etapa de mutación, los clones parcialmente humanizados o completamente humanizados se secuenciaron y algunos de estos dominios variables se clonaron posteriormente en vectores de expresión. El vector pJRS 355 o pLAM 356 se usó para expresar mutantes de HC fusionados a Fc de IgG1 o IgG4 humana.

45 Las Figuras 3A-D resumen las etapas 1-11 y muestran los cambios de aminoácidos crecientes introducidos en FR1-4. A excepción de HC08, todos los demás mutantes de cadena pesada y cH36 contienen F en la posición 64 en CDR2. HC08 tiene una mutación de F a L en la posición 64. Las Figuras 4B-D muestran las secuencias de CDR de cadena pesada.

Cebadores usados para humanización de cadena pesada

55 TFHC1s2
5 'TTTCGTACGTCTTGTCCCAGATCCAGCTGCAGCAGTC 3' (SEC ID N°: 31)

TFHC1as2
5 'AGCGAATTCTGAGGAGACTGTGACAGTGGTGCCTTGCCCCAG 3' (SEC ID N°: 32)

60 TFHC7s
5 'GTGAGGCAGAGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGG 3' (SEC ID N°: 33)

TFHC7as
65 5 'CCAATCCACTCAAGGCCCTTCCAGGGCTCTGCCTCAC 3' (SEC ID N°: 34)

- TFHC5s
5'GCATCTCAACAGCCTGAGATCTGAAGACACTGCAGTTTATTCTGTG 3 '(SEC ID N°: 35)
- TFHC5as2
5 'CTGCAGTGTCTTCAGATCTCAGGCTGTTGAGATGCATGAAGGC 3' (SEC ID N°: 36)
- TFHC3as
5 'GTCTTCAGATCTCAGGCTGCTGAGCTCCATGAAGGCTGTGGTG 3' (SEC ID N°: 37)
- 10 TFHC2s
5 'TACGACTCACTATAGGGCGAATTGG 3' (SEC ID N°: 38)
- TFHC6s
5 'CTGTTGACAAGTCTACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAG 3' (SEC ID N°: 39)
- 15 TFHC6as
5 'CTGCTGAGCTCCATGTAGGCTGTGCTGGTAGACTTGCAACAG 3' (SEC ID N°: 40)
- TFHC2as2
20 5 'GCACTGAAGCCCCAGGCTTCACCAGCTCACCTCCAGACTGCTGCAGC 3' (SEC ID N°: 41)
- TFHC3s2
5'CTGGGGCTTCAGTGCGGGTATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTAC 3 '(SEC ID N°: 42)
- 25 TFHC1s3
5 'TCGTACGTCTTGTCCCAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGTGAGC 3' (SEC ID N°: 43)
- TFHC2as3
5 'GCACTGAAGCCCCAGGCTTCTTCACCTCACCTCCAGACTGCACC 3' (SEC ID N°: 44)
- 30 TFHC9sL
5 'GCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGG 3' (SEC ID N°: 45)
- TFHC9asL
35 5 'CCCCAGGCTTCTTCAGCTCAGGTCCAGACTGC 3' (SEC ID N°: 46)
- TFHC8sP
5 'GCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGGTGAAGAAGCC 3' (SEC ID N°: 47)
- 40 TFHC8asP
5 'GGCTTCTTCACCTCAGGTCCAGACTGCACCAGC3' (SEC ID N°: 48)
- TFHC10sK
5 'GCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC 3' (SEC ID N°: 49)
- 45 TFHC10asK
5 'GAAGCCCCAGGCTTCACCAGCTCAGGTCCAGACTGC 3' (SEC ID N°: 50)
- LV-1
50 5 'CAGTCTGGACCTGAGGTGGTGAAGCCTGGG 3' (SEC ID N°: 51)
- LV-2
5 'CCCAGGCTTCACCACCTCAGGTCCAGACTG 3' (SEC ID N°: 52)
- 55 D. Generación de cadena ligera de anticuerpo anti-FT humanizado
1. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando el plásmido pJA1g4TF.A8 (un vector de expresión para H36 quimérico) como molde y los cebadores TFLC1s2.1 y TFLC1as2. Esta etapa introdujo un sitio de clonación, *AgeI*, cadena arriba de la región codificante. También introdujo la mutación **L106I** en FR4. Esta etapa produjo la construcción **LC03**.
- 60 2. La mutagénesis dirigida se llevó a cabo usando los cebadores complementarios TFLC5s y TFLC5as y LC03 como molde. Esta etapa introdujo la mutación **Q37L** en FR2 y añadió un sitio *PstI* con fines de diagnóstico. Esta nueva construcción se denomina **LC04**.
- 65

3. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando **LC04** como molde y los cebadores TFHC2s y TFLC2as1. Esta etapa generó el **Fragmento A** que se usará en la etapa 6. Esta etapa introdujo las mutaciones **Q11L** y **L15V** en FR1.
- 5 4. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando **LC04** como molde y los cebadores TFLC1s2.1 y TFLC1asR. Esto introdujo el sitio *Kpn* I en el extremo del dominio variable de LC. La clonación de este fragmento de PCR en pGEM reduce **pGEM04K** que se usará en la etapa 6.
- 10 5. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando **LC04** como molde y los cebadores TFLC2s y TFLC4as. Esta etapa generó el **Fragmento C** que se usará en la etapa 6. Tres mutaciones **E17D**, **S18R** en FR1 y **A100Q** en FR4 se introdujeron en esta etapa.
- 15 6. La mutagénesis basada en PCR usando **Fragmento A** y **Fragmento C** como moldes y los cebadores TFHC2s y TFLC4as produjo el **Fragmento D**. La clonación del **Fragmento D** en pGEM04K produjo la construcción **LC05**.
- 20 7. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando pGEM04K como molde y los cebadores TFLC1s2.1 y TFLC4as. Esta etapa generó **Fragmento H**, que posteriormente se clona en pGEM04K. Esto introdujo la mutación **A100Q** en FR4 y la construcción se denomina **LC06**.
- 25 8. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando **LC06** como molde y los cebadores TFLC1s2.1 y TFLC3as. Esta etapa generó el **Fragmento I** que se usará en la etapa 10. Esto introdujo las mutaciones **K70D** y **K74T** en FR3.
- 30 9. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando **LC06** como molde y los cebadores TFLC3s2 y TFLC4as. Esta etapa generó el **Fragmento F** que se usará en la etapa 10. Esto introdujo la mutación **A80P** en FR3.
- 35 10. La PCR que usa **Fragmento I** y **Fragmento F** como moldes y los cebadores TFLC1s2.1 y TFLC4as produjo el **Fragmento J**. La clonación del **Fragmento J** en pGEM produjo la construcción **LC07**.
- 40 11. La mutagénesis dirigida se condujo usando los cebadores complementarios TFLC08sds y TFLC08sdsa y **LC07** como molde. Esta etapa introdujo las mutaciones **V84A** y **N85T** en FR3. Esta construcción se denomina **LC08**.
- 45 12. El fragmento de *Agel* a *Eco*O109I a partir de **LC05** que contiene las mutaciones **Q11L**, **L15V**, **E17D**, **S18R** y **Q37L** se clona en **LC08**. Esto produjo la construcción **LC09**.
- 50 13. La mutagénesis dirigida se condujo usando **LC09** como molde y los cebadores complementarios L105 y LC103. Esta etapa introdujo la mutación **T85N** en FR3 y produjo la construcción **LC10**.
- 55 14. La mutagénesis dirigida se condujo usando **LC10** como molde y los cebadores complementarios LC 115 y LC 113. Esta etapa introdujo la mutación de **D70K** en FR3. Esto produjo la construcción **LC11**.
- 60 15. La mutagénesis dirigida se condujo usando **LC11** como molde y los cebadores complementarios LC125a y LC123a. Esta etapa introdujo la mutación **K42Q** en FR2. Esto produjo la construcción **LC12**.

Después de cada etapa de mutación, los clones de LC parcialmente humanizados o completamente humanizados se secuenciaron y algunos de estos dominios variables se clonaron posteriormente en el vector de expresión tKMC180.

Cebadores oligonucleotídicos usados para humanización de cadena ligera

TFLC1as2:
5 'TTCGAAAAGTGTACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCAG 3' (SEC ID N°: 53)

TFLC1s2.1:
5 'ACCGGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCC 3' (SEC ID N°: 54)

TFLC5s:
5 'GGTTAGCATGGTATCTGCAGAAACCAGGG 3' (SEC ID N°: 55)

TFLC5as:
5 'CCCTGGTTTCTGCAGATACCATGCTAACC 3' (SEC ID N°: 56)

TFHC2s:
5 'TACGACTCACTATAGGGCGAATTGG 3' (SEC ID N°: 57)

TFLC2as1:

5' CCACAGATGCAGACAGGGAGGCAGGAGACTG 3' (SEQ ID N°: 58)

TFLC1asR:

5 5' TTCGAAAAGTGTACTTACGTTTGTATCTCCAGCTTGGTACCAGCACCGAACG 3' (SEC ID N: 59)

TFLC2s:

5'CCTGTCTGCATCTGTGGGAGATAGGGTCACCATCACATGC 3 '(SEC ID N°: 60)

10 TFLC4as:

5 'GATCTCCAGCTTGGTACCCTGACCGAACGTGAATGG 3' (SEC ID N°: 61)

TFLC3as:

15 5 'GTAGGCTGCTGATCGTGAAAGAAAAGTCTGTGCCAGATCC 3' (SEC ID N°: 62)

TFLC3s2:

5 'CACGATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGTAAATTACTGTGTC 3' (SEC ID N°: 63)

TFLC08sds:

20 5 'GCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTGTCAACAAG 3' (SEC ID N°: 64)

TFLC08sdsa:

5 'CTTGTTGACAGTAATAAGTTGCAAATCTTCAGGCTGTAGGCTGC 3' (SEC ID N°: 65)

25 LC105:

5 'CAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAAATTACTGTCAAC 3' (SEC ID N°: 66)

LC103:

30 5 'GTTGACAGTAATAATTTGCAAATCTTCAGGCTGTAGGCTGCTG 3' (SEC ID N°: 67)

LC115:

5 'CAGTGGATCTGGCACAAAGTTTTCTTTCACGATCAGCAGC 3' (SEC ID N°: 68)

LC113:

35 5 'GCTGCTGATCGTGAAAGAAAACCTTTGTGCCAGATCCACTG 3' (SEC ID N°: 69)

LC125a:

5 'CTGCAGAAACCAGGGCAATCTCCTCAGCTCCTG 3' (SEC ID N°: 70)

40 LC123a:

5 'CAGGAGCTGAGGAGATTGCCCTGGTTTCTGCAG 3' (SEC ID N°: 71)

La Figura 5A muestra la secuencia del dominio constante de cadena ligera kappa humana (SEC ID N°: 97). La Figura 5B muestra el dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana (SEC ID N°: 98). La Figura 6A muestra la secuencia de dominio constante de hFAT (IgG4) (SEC ID N°: 99). La Figura 6B proporciona el dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana (SEC ID N°: 100). Véase también el documento WO 03/03791 para divulgación adicional con relación a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulinas anteriores.

50 EJEMPLO 2 - Expresión y purificación de anticuerpos anti-FT humanizados

Los clones de LC y HC parcialmente humanizados o completamente humanizados se clonaron en vectores de expresión. El plásmido tKMC18 se usó para expresar mutantes de LC fusionados a la cadena kappa humana y el vector pJRS 355 o pLAM 356 se usó para expresar mutantes de HC fusionados a Fc de IgG1 o IgG4 humana. Algunas combinaciones de los clones de HC y LC se co-transfectaron posteriormente en células COS. Las IgG expresadas de forma transitoria en células COS se ensayaron para determinar la producción de IgG global y la unión a FT mediante ELISA. Para la divulgación con respecto a estos vectores particulares véase el documento WO 03/037911.

60 Las formas completamente humanizadas finales de los dominios variables pesado y ligero anti-FT (combinación de HC08 y LC09) se clonaron en lo que se denomina un Mega vector de expresión (pSUN34, véase la Figura 2) y se transfectaron en células CHO y NSO para expresión de IgG. Las líneas celulares transfectadas de forma estable que producen el anticuerpo anti-FT humanizado de IgG4 κ o IgG1 κ se clonaron. Las líneas celulares estables seleccionadas se usaron posteriormente para producir cantidades de anti-FT humanizado suficientes para análisis. Las versiones humanizadas resultantes tenían un origen aproximadamente el 100% humano (cuando las secuencias de CDR no se consideraban). La versión kappa de IgG4 humanizada (producida por pSUN35) se denomina hFAT (Anticuerpo anti-factor Tisular de IgG Cuatro Humanizado) y la versión kappa de IgG1 (producida

por pSUN34) se denomina hOAT (Anticuerpo anti-Factor Tisular de IgG Uno Humana). Estas versiones completamente humanizadas de h36 tienen por objeto tratar indicaciones crónicas, tales como cáncer y enfermedades inflamatorias.

- 5 Una de las líneas de células NSO (OAT-NSO-P10A7) que expresa hOAT (combinación de HC08 y LC09) se descongeló y se extendió en 10 ml de medio IMDM complementado con FBS al 10% en un tubo de 15 ml y se centrifugó. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de medio recién preparado y se pasó a un matraz T25 y se incubó a 37 °C en CO₂ al 5%. Con el fin de preparar un número suficiente de células para inocular un biorreactor de fibra hueca, las células se expandieron hasta obtener un total de 6x10⁸ células. Un biorreactor se configuró de acuerdo con el manual de instrucción del fabricante. Las células recogidas se sedimentaron y resuspendieron en 60 ml de IMDM que contenía FBS al 35% y se inyectaron en el espacio extracápsular del biorreactor. Las concentraciones de glucosa y lactato se supervisaron diariamente y el material recogido se centrifugó y se combinó. El material recogido se ensayó para determinar concentraciones de anticuerpo anti-FT mediante ensayo de ELISA. La muestra combinada que contenía anticuerpo anti-FT (hOAT) se purificó posteriormente y se analizó como se ha descrito más adelante.

A. Cromatografía de flujo rápido de rProteína A Sefarosa

20 El anticuerpo monoclonal anti-FT humanizado recombinante consiste en dos cadenas ligeras y dos pesadas. La cadena pesada es una fusión de dominio variable de ratón (inalterado o humanizado como se ha descrito anteriormente) y el dominio Fc de IgG1 o IgG4 humano, mientras que la cadena ligera contiene dominio variable de ratón (inalterado o humanizado como se ha descrito anteriormente) y dominio κ humano. Está bien establecido que la región Fc de IgG humana tiene afinidad elevada por la proteína A o proteína A recombinante (rProteína A).

25 Los grupos recogidos que contenían anticuerpo anti-FT humanizado (hOAT) se ajustaron a pH 8,0 ± 0,1 añadiendo 0,08 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 por ml de muestra. Posteriormente la muestra se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros de unión de proteína baja (por ejemplo, unidades de filtro de cultivo de tejido desechables estériles Nalgene con membrana de polietersulfona de Nalge Nunc International, N° de Cat. 167-0020). A continuación de la aplicación de la muestra, la columna de rProteína A (de Pharmacia) se lava con 5 volúmenes de lecho de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 para eliminar los materiales no unidos tales como proteínas del medio. Debido a que el medio de recogida contiene un alto contenido de suero bovino, se usa un lavado de gradiente de pH gradual para eliminar la IgG bovina de la columna. El gradiente de pH gradual se consiguió aumentando el porcentaje relativo de tampón B (ácido acético 100 mM) en tampón A (acetato de sodio 100 mM). Un lavado gradual de pH típico empleó tampón B al 20%, al 40% y al 60%. Eluir la columna con tampón B al 100% y recoger las fracciones en base A₂₈₀. Las fracciones combinadas se ajustaron a pH 8,5 con adición de base Tris 1 M.

B. Cromatografía de flujo rápido de Sefarosa Q

40 La cromatografía de intercambio iónico aniónico es muy eficaz para separar proteínas de acuerdo con sus cargas. La muestra eluida y ajustada a pH de la columna de rProteína A se diluyó con dos volúmenes de agua y el pH se comprueba y ajusta a 8,5. La muestra se cargó posteriormente en un flujo rápido de Sefarosa Q de 5 ml (1,6 x 2,5 cm) equilibrado con Tris-HCl 20 mM, pH 8,5 y la columna se lavó con (1) 5 volúmenes de lecho de Tris-HCl 20 mM, pH 8,5; y (2) 4 volúmenes de lecho de Tris-HCl 20 mM, pH 8,5 que contenía NaCl 100 mM. La proteína de IgG se eluyó posteriormente con volúmenes de lecho de Tris-HCl 20 mM, pH 8,5 que contenía NaCl 500 mM. Los picos de proteína se combinaron y el tampón se intercambió por PBS usando un dispositivo de ultrafiltración.

Usando los mismos métodos de transfección, cultivo celular y purificación, también se produjo y purificó hFAT.

EJEMPLO 3 - Propiedades de anticuerpos anti-FT humanizados

50 A. Inhibición de la función de FT mediante anticuerpo anti-FT humanizado

Una de las propiedades clave de anticuerpos anti-FT es su capacidad de inhibir la coagulación sanguínea iniciada por factor tisular. El hOAT y hFAT purificados se midieron para determinar su capacidad de inhibir la actividad de FT en un ensayo de PT convencional. El ensayo de PT se usa ampliamente para medir los tiempos de coagulación sanguínea dependiente del factor tisular. El principio de este ensayo es que el factor tisular (FT) forma complejo con el factor VIIa en plasma. Después el complejo activa el factor X a FXa; FXa después convierte la protrombina en trombina en presencia del factor Va y fosfolípidos. Eventualmente la trombina conduce a formación en coágulo sanguíneo. En ensayos de PT convencionales, el FT lipídado se añade al plasma para iniciar la coagulación sanguínea y la coagulación se registra mediante un analizador de coagulación Organon Teknika Coag-A-Mate o equivalente.

65 El anticuerpo anti-FT, H36, inhibe la actividad de FT humano mediante un mecanismo único. El mismo se une a FT (libre o en complejo con factor VIIa) en una forma tal que la unión del factor X y IX al complejo FT: FVIIa está prohibida, y por lo tanto la activación de FX y FIX por FT: FVIIa está bloqueada (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.986.065). En los ensayos de PT, la prolongación de los tiempos de coagulación de anticuerpo anti-FT añadido a

plasma humano es un indicio claro de que esta coagulación dependiente de FT está inhibida. El tiempo de coagulación está relacionado con la cantidad de actividad de FT. Una curva normal de FT se genera midiendo los tiempos de coagulación de PT de FT diluido en serie. A partir de los datos de la curva normal de FT, la inhibición de la actividad FT mediante el anticuerpo anti-FT se determina.

5 Reactivos: Innovin (N° Cat 68100-392) y Ci-Trol Coagulation Control, Nivel I (N° Cat 68100-336) se obtienen en VWR. El FT humano recombinante lipídado se produjo como se ha descrito en el Ejemplo 3 en la Patente de Estados Unidos N° 5.986.065.

10 Método: el ensayo PT se lleva a cabo a 37 °C usando un Analizador de Coagulación. La reacción de PT se inicia añadiendo 0,2 ml de factor tisular humano recombinante lipídado (por ejemplo, Innovin) en 0,1 ml de plasma humano (Ci-Trol Control de Nivel I) que contiene 0,01 ml de tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, BSA al 0,1%) o anticuerpo anti-FT.

15 1. Añadir agua purificada a un vial de Innovin de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Calentar el reactivo a 37 °C. El reactivo es estable durante algunos días si se almacena a 4-8 °C.

20 2. Añadir 1 ml de agua purificada a cada vial de Ci-Trol. Mezclar para solubilizar. Si se usan más de un vial, combinarlos en un recipiente (por ejemplo, un tubo de ensayo de 10 ml). 1 ml de Ci-Trol puede desarrollar 5 ensayos (cada ensayo usa 2 x 0,1 ml = 0,2 ml). Ci-Trol se puede almacenar en hielo y dura algunas horas.

3. A partir de reserva de anticuerpo anti-FT, preparar una serie de soluciones de anticuerpo anti-FT (200 nM a 1600 nM) con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, BSA al 0,1%

25 4. Añadir 10 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, BSA al 0,1% o 10 µl de anti-FT diluido a cada pocillo de la cubeta de pocillo doble que contiene 0,1 ml de Ci-Trol. Usar una pipeta con una punta de 0,1 ml para mezclar cada pocillo. Asegurarse de que no hay burbujas de aire en el pocillo. A continuación mezclar anti-FT (o tampón) con plasma (Ci-Trol), medir los tiempos de coagulación dentro de 10 min añadiendo 0,2 ml de Innovin al plasma.

30 5. Para la curva normal de FT, en primer lugar diluir Innovin (FT al 100%) al 20%, al 10%, al 5% y al 2,5% con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, BSA al 0,1%. Posteriormente los ensayos de PT se llevaron a cabo como en la etapa 4 usando muestras de Innovin diluidas.

35 La Tabla 3 es el resumen del efecto de cH36, hOAT y hFAT sobre los tiempos de coagulación de PT. En comparación con los datos en la Tabla 4, cH36, hFAT y hOAT mostraron inhibición muy potente de la función de FT. A una concentración de proteína superior a 12,9 nM, todos los anticuerpos consiguieron una inhibición de aproximadamente el 95%. Los resultados de la Tabla 3 también indica que la humanización de anti-FT, cH36, mediante el método descrito anteriormente no tuvo ningún efecto significativo sobre la actividad inhibidora de cH36 ya que tanto hFAT como hOAT mostraron una capacidad muy similar de inhibir la coagulación sanguínea dependiente de FT como se observa para cH36.

Tabla 3. Efecto sobre los tiempos de protrombina mediante anticuerpos anti-FT quiméricos (cH36) y humanizados (hFAT y hOAT) #

Concentraciones de anticuerpo anti-FT (nM) en ensayos PT	Tiempo de PT (en segundos)		
	cH36	hOAT	hFAT
0	12,2	12,2	12,2
6,45	14,9	nd	nd
9,7	17,8	16,5	nd
12,9	19,8	18,9	20,5
25,8	40	33,7	41,7
51,6	101,3	82,1	94,8

Todos los ensayos usaron la misma muestra de actividad de FT al 100% (concentración) que en la Tabla 4.

45 **Tabla 4.** Tiempos de coagulación y actividades de factor tisular relativas (concentraciones)

Actividades de FT relativas (concentraciones)	Tiempos de coagulación de PT(segundos)
100% (puro)	11,90
20%	13,225
10%	14,675
5%	16,700
2,5%	20,000

B. Determinación de constantes de afinidad

La afinidad del anticuerpo anti-FT humanizado por FT se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore de Pharmacia Biosensor) con factor tisular humano recombinante inmovilizado covalentemente en una microplaca sensora CM5. Las constantes de afinidad fueron los datos promedio calculados a partir de cuatro concentraciones de anticuerpo monoclonal anti-FT (0,125 nM, 0,25 nM, 0,5 nM y 1 nM) mediante el software informático BIAcore. Los resultados de la Tabla 5 indican que la humanización de anti-FT, cH36, mediante el método descrito anteriormente no tuvo ningún efecto significativo sobre la afinidad de cH36 por FT ya que tanto cH36 como hFAT tienen afinidad similar por FT.

Tabla 5. Afinidad aparente y constantes de disociación de anticuerpos anti-FT

Anticuerpo anti-FT	K_A aparente (M^{-1})	K_d aparente (M)
H36	$1,56 \times 10^{10}$	$6,4 \times 10^{-11}$
CH36	$7,94 \times 10^9$	$1,26 \times 10^{-10}$
hFAT	$2,99 \times 10^9$	$3,35 \times 10^{-10}$

EJEMPLO 4 - Humanización de anticuerpo anti-LTA

A. Anticuerpo anti-LTA quimérico

B. Estrategia de humanización para anticuerpo anti-LTA

La humanización del anticuerpo anti-LTA (ácido lipoteicoico) quimérico, A110, se consiguió usando un método de "mejor ajuste de FR". Este método se aprovecha completamente del hecho de que un gran número de dominios variables de IgG humana con secuencias de aminoácidos conocidas están disponibles en las bases de datos públicas. Los armazones individuales de los dominios variables pesado y ligero de ratón en A110 se comparan con sus armazones humanos correspondientes en la base de datos de Kabat (véase <http://immuno.bme.nwu.edu>). Se usaron los siguientes criterios para seleccionar los armazones de IgG humana deseados para humanización. (1) El número de aminoácidos no coincidentes se mantuvo tan bajo como fue posible. (2) Los aminoácidos dentro de la zona de "vernier" (los aminoácidos en esta zona pueden ajustar la estructura de CDR y ajustar finamente el ajuste al antígeno, véase Foote, J. y Winter, G., J. Mol Bio., **224**; (2) 487-499 [1992]) se dejaron sin cambios. (3) Se favorecieron las sustituciones de aminoácidos conservativas cuando se evaluaron candidatos similares. El programa de coincidencia usado para esta comparación se puede encontrar en la página web de internet de Kabat. El programa encuentra y alinea regiones de homología entre las secuencias de ratón y secuencias humanas en la base de datos. Mediante el uso de este método de mejor ajuste único, se anticipa que el dominio variable de LC o HC humanizado de la IgG diana puede tener las cuatro FR obtenidas a partir de tan poco como una molécula de IgG humana hasta tanto como cuatro moléculas de IgG humana.

B (i). Selección de armazones de dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana

La secuencia de aminoácidos en cada uno de los armazones de LC de A110 se comparó con la secuencia de aminoácidos en la FR correspondiente en el dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana en la base de datos de Kabat. La FR de mejor ajuste se seleccionó en base a los tres criterios descritos anteriormente.

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 036047 se seleccionó para humanización de FR1 y FR3 de LC de A110. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 037658 se seleccionó para humanización de FR2 de LC de A110 y la N° 004763 se seleccionó para humanización de FR4. Las siguientes mutaciones se realizaron en LC de A110 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera kappa de IgG humana con FR seleccionada: D1 → Q, S5 → T, L11 → M, M21 → I, S42 → Q, R76 → A, V77 → M y M102 → K. (véase la Tabla 6 para información de secuencia).

B (ii). Selección de armazones de dominio variable de cadena pesada de IgG humana

La secuencia de aminoácidos en cada uno de los armazones de HC de A110 se comparó con la secuencia de aminoácidos en la FR correspondiente en el dominio variable de cadena pesada de IgG humana en la base de datos de Kabat. La FR de mejor ajuste se seleccionó en base a los tres criterios descritos anteriormente.

La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000468 se selecciona para humanización de FR1 de HC de A110. La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000565 se selecciona para humanización de FR2 de HC de A110. La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000628 se selecciona para humanización de FR3 de HC de A110. La secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 031571 se selecciona para humanización de FR4 de HC de A110. Las

siguientes mutaciones se realizaron en FR1 de HC de A110 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000468: M3 → Q, y K15 → G. No fueron necesarios cambios para FR2 de HC de A110 con el fin de igualar la secuencia de FR2 con ID de base de datos de Kabat N° 000565. Se realizaron seis mutaciones en FR3 de HC de A110 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 000628: Q78 → K, S79 → N, M80 → S, N87 → S, M95 → V, y V99 → A. Se realizó una mutación, L119 → V en FR4 de HC de A110 para igualar la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada de IgG humana con una ID de base de datos de Kabat N° 031571 (véase la Tabla 7 para información de secuencia).

10 **Tabla 6.** Comparación de secuencias de FR de A110 (SEC ID N°: 109) y de cadena ligera humana (LC) (SEC ID N°: 127)

Tabla 6A	
Nombres	LC-FR1 (23 aa)
A110-LC	1 10 20 34 48
LC- Humana	DIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC WYQQKPGSSSPKPWIS
	Q T M D I Q
	036047 037658
Tabla 6B	
Nombres	LC-FR3 (32 aa)
A110-LC	56 60 70 80 87 97 106
LC- Humana	GVPARFSGSGSGTISYSLTISRVEAEDAATYYC FGGGTMLEIK
	AM K
	036047 004763

Tabla 7. Comparación de secuencias de FR de A110 (SEC ID N°: 118) y de cadena pesada humana (HC) (SEC ID N°: 123)

Tabla 7A	
Nombres	HC-FR1 (25 aa)
A110-LC	1 10 20 36 49
HC- Humana	EVMLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS WVRQAPGKGLEWVA
	Q G Sin cambios
	000468 000565
Tabla 7B	
Nombres	HC-FR3 (32 aa)
A110-LC	69 75 85 95 100 113 123
HC- Humana	RFTISRDDSQSMLYLQMNLLKTEDTAMYYCVR WGQGTSLTVSS
	KNS S V A V
	000628 031571

- 15 Una vez que se tomaron las decisiones acerca de los armazones humanos deseados, se usaron las siguientes tres técnicas para conseguir las sustituciones de aminoácidos deseadas en las cadenas tanto ligera como pesada. (1) Se usó PCR regular para clonación, para introducir sitios de endonucleasa de clonación o de diagnóstico y para cambiar los restos de aminoácidos localizados en los extremos de los dominios variables. (2) Se usó PCR mutagénica para cambiar los restos de aminoácidos múltiples a misma vez, especialmente cuando estos restos estaban en el centro de los dominios variables. (3) Se usó mutagénesis dirigida para introducir una o dos sustituciones de aminoácidos a la vez. Se realizó mutagénesis dirigida siguiendo el protocolo descrito en "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" de Stratagene (N° de Catálogo 200518).
- 20
- 25 Después de cada etapa, los clones inmunizados parcialmente se secuenciaron y algunos de estos dominios variables se clonaron posteriormente en vectores de expresión. El plásmido tKMC180 se usó para expresar mutantes de LC y pJRS355 se usó para expresar mutantes de HC como IgG1. Algunos de estos clones se combinaron posteriormente y se expresaron de forma transitoria en células COS.
- 30 Las formas completamente humanizadas finales de los dominios variables pesado y ligero anti-LTA se clonaron en lo que se denomina algunas veces en el presente documento un "mega vector" y se transfectaron en células COS para la expresión de IgG y el análisis de unión a LTA.

C. Generación de cadena pesada de anticuerpo anti-LTA humanizado

1. La amplificación por PCR y la clonación en pGEM T-easy (*Promega*) de dominio variable de cadena pesada (HC) de mAb A110 anti-LTA se llevaron a cabo usando el plásmido pJRS334 (un vector de expresión para A110) como molde y los cebadores HChuF1 y HChuR2. El cebador HChuF1 introdujo un sitio *BsiWI* cadena arriba del primer codón del dominio variable y también un cambio de aminoácido **M3 a Q** en el armazón (FR) 1. El cebador HChuR2 introdujo un cambio de aminoácido **L119 a V** en FR4 y un sitio de restricción *EcoRI* C terminal para fines de clonación. Esta etapa dio como resultado la construcción **pJRS362**. Este fragmento se subclonó posteriormente en el vector de expresión pJRS355 como un fragmento de restricción de *BsiWI* a *EcoRI* dando como resultado pJRS370.

2. La amplificación por PCR de fragmentos de dominio variable de cadena pesada (HC) de mAb A110 anti-LTA se llevó a cabo usando el plásmido pJRS334 (un vector de expresión para A110) como molde y los cebadores HChuF1 y HChuR1 para el fragmento N terminal y los cebadores HChuF2 y HChuR2 para el fragmento C terminal. La PCR dio como resultado un fragmento de dominio variable que contiene dos mutaciones adicionales, **N87 a S** y **M95 a V** en FR3. La clonación de este fragmento en pGEM T-Easy dio como resultado la construcción **pJRS364**.

3. La mutagénesis dirigida usando el sistema QuikChange (*Stratagene*) se usó posteriormente para introducir otra mutación en el dominio variable de cadena pesada. Un par de cebadores complementarios JSS80 y JSS81 se combinaron con el plásmido pJRS364 y se amplificaron con ADN polimerasa *Pfu* Turbo. A continuación de la digestión de los productos con *Dpn* I, el ADN se usó para transformar células XL1B de *E. coli*. Esta manipulación dio como resultado la mutación **V99 a A** en FR3 y la construcción se denominó **pJRS373**. La clonación de este fragmento en el vector de expresión pJRS355 como un fragmento de restricción de *BsiWI* a *EcoRI* dio como resultado el plásmido **pJRS380**.

4. La mutagénesis dirigida usando el sistema QuikChange (*Stratagene*) se usó posteriormente para introducir otra mutación en el dominio variable de cadena pesada. Un par de cebadores complementarios JSS82 y JSS83 se combinaron con el plásmido pJRS373 y se amplificaron con ADN polimerasa *Pfu* Turbo. A continuación de la digestión de los productos, el ADN se usó para transformar células XL1B de *E. coli*. Esta manipulación dio como resultado la mutación **K15 a G** en FR1 y la construcción se denominó **pJRS378**. La clonación de este fragmento en el vector de expresión pJRS355 como un fragmento de restricción de *BsiWI* a *EcoRI* dio como resultado el plásmido **pJRS381**.

5. La amplificación por PCR de fragmentos de dominio variable de cadena pesada (HC) de mAb A110 anti-LTA se llevó a cabo usando el plásmido pJRS381 (un vector de expresión de un HCV mutado de A110) como molde. Los cebadores MV-HC Leader y JSS87, para el fragmento N terminal y los cebadores JSS86 y HVC Back, para el fragmento C terminal. La PCR dio como resultado un fragmento de dominio variable que contiene tres mutaciones adicionales, **Q78 a K**, **S79 a N** y **M80 a S** en FR3. La clonación de este fragmento en pJRS355 como un fragmento de restricción de *BsiWI* a *EcoRI* dio como resultado la construcción **pJRS383**.

Cebadores usados para humanización de cadena pesada

D. Generación de cadena ligera de anticuerpo anti-LTA humanizado

1. La amplificación por PCR y la clonación en pGEM T-easy (*Promega*) de dominio variable de cadena pesada (HC) de mAb A110 anti-LTA se llevaron a cabo usando el plásmido pJRS334 (un vector de expresión para A110) como molde y los cebadores LChuF1 y LChuR3. El cebador LChuF1 introdujo un sitio *AgeI* cadena arriba del primer codón del dominio variable y también cambios de aminoácidos, **D1 a Q** y **S5 a T**, en el armazón 1. El cebador LChuR3 introdujo un cambio de aminoácido **M102 a L** en FR4 y un sitio de restricción *BstBI* C terminal para fines de clonación. Esta etapa dio como resultado la construcción **pJRS363**.

2. La amplificación por PCR de fragmento de dominio variable de cadena ligera (LC) de mAb A110 anti-LTA se llevó a cabo usando el plásmido pJRS334 (un vector de expresión para A110) como molde y los cebadores LChuF1 y LChuR1 para un fragmento N terminal (LCN1) y los cebadores LChuF1 y LChuR2 para un segundo fragmento N terminal (LCN2). Dos fragmentos C terminal se generaron usando los cebadores LChuF2 y LChuR3 (LCC1) para uno, y LChuF3 y LChuR3 para el segundo (LCC2). Un fragmento interno para PCR también se generó usando los cebadores LChuF2 y LChuR2 (LCI).

3. Las reacciones de PCR que usan fragmentos LCN1 y LCC1 como moldes y LChuF1 y LChuR3 como cebadores se llevaron a cabo y los productos resultantes se clonaron en pGEM T-easy para producir el plásmido **pJRS365**. Esto introdujo otra mutación, **S41 a Q** en FR2.

4. Las reacciones de PCR que usan fragmentos LCN2 y LCC2 como moldes y LChuF1 y LChuR3 como cebadores se llevaron a cabo y los productos resultantes se clonaron en pGEM T-easy para producir el plásmido **pJRS366**. Esto introdujo dos mutaciones diferentes, **R76 a A** y **V77 a M** en FR3.

- 5 5. Las reacciones de PCR que usan fragmentos LCI y LCC2 como molde y LChuF1 y LChuR3 como cebadores se llevaron a cabo. Posteriormente se realizó una segunda PCR usando este nuevo fragmento y LCN1 como molde y LChuF1 y LChuR3 como cebadores. El producto resultante se clonó en pGEM T-easy para producir el plásmido **pJRS367**. Esto combinó todas las mutaciones de cadena ligera en un fragmento de dominio variable de cadena ligera.
- 10 6. El **L102** en todos los clones de dominio variable de LC se convirtió posteriormente en una **K** mediante PCR. Usando los plásmidos pJRS363, 365, 366 y 367 como moldes, los dominios variables se re-amplificaron usando los cebadores LChuF1 y LChuR4. Los productos resultantes se clonaron nuevamente en pGEM T-easy para generar los plásmidos **pJRS363K, 365K, 366K, y 367K**.
- 15 7. Todas las cuatro versiones del dominio variable humanizado se clonaron posteriormente en un vector de expresión de cadena ligera, tKMC180, como un fragmento de restricción *AgeI* a *BSTBI*. Las construcciones finales para expresión de células de mamífero de las diversas cadenas ligeras mutantes se denominaron **pJRS374, 375, 376 y 377**.
- 20 8. La amplificación por PCR de fragmentos de dominio variable de cadena ligera (LC) de mAb A110 anti-LTA se llevó a cabo usando el plásmido pJRS376 (un vector de expresión para cadena ligera de A110 humanizado que contiene 6 mutaciones) como molde y los cebadores MV-LC Leader y JSS89 para el fragmento N terminal (LCN1) y los cebadores JSS90 y LC reverse para los fragmentos C terminal. Las reacciones de PCR que usan estos fragmentos como molde y los cebadores MV-LC leader y LC reverse dieron como resultado productos que contienen las mutaciones **L11 a M** y **M21 a I**. Estos productos se clonaron posteriormente en tKMC180, el vector de expresión de LC, como un fragmento de restricción de *AgeI* a *BSTBI* para generar el plásmido **pJRS384**.
- 25 Todas las construcciones de vector de expresión anteriores se ensayaron positivos para la capacidad de expresar anticuerpos en experimentos de co-transfección usando células COS. Todas las combinaciones de dominios variables de A110 de cadena pesada y ligera humanizados se unieron a LTA cuando se ensayaron usando ELISA. Posteriormente, los vectores de expresión de combinación, es decir, plásmidos únicos con regiones codificantes de cadena tanto pesada como ligera, se construyeron. El plásmido de expresión final que contiene las
- 30 16 mutaciones (8 pesada y 8 ligera) preparado a partir de los dominios variables cortados a partir de pJRS383 y pJRS384 se denominó **pJRS394**. Cuando este plásmido se usó para transfectar células COS, el anticuerpo resultante producido fue capaz de unirse a LTA como se muestra por los experimentos de ELISA.

35 Cebadores usados para clonación:

Nombre	Secuencia Oligo
HC-MV Leader	GGAGACCCAAGCTTGTTAAC (SEC ID N°: 128)
Volver HCV	CCCAGAGGTGCTCTTGGAG (SEC ID N°: 129)
HChuF1	TGTTTTCGTACGTCTTGTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG (SEC ID N°: 130)
HChuF2	GAACAGCTTGAAAAGTGGAGACACAGCCGTGTATTACTGTGTGAGAC (SEC ID N°: 131)
HChuR1	AATACACGGCTGTGTCCTCAGTTTTCAAGCTGTTTCATTGCAGATAGAGCATG (SEC ID N°: 132)
HChuR2	AATTCTGAATTCTGAGGAGACGGTCACTGAGGTTCCCTTGACCCC (SEC ID N°: 133)
JSS80	CAGCCGTGTATTACTGTGCGAGACGGGGGGCTTC (SEC ID N°: 134)
JSS81	GAAGCCCCCGTCTCGCACAGTAATACACGGCTG (SEC ID N°: 135)
JSS82	GGATTGGTGCAGCCTGGCGGGTCAATTGAACTCTC (SEC ID N°: 136)
JSS83	GAGAGTTTTCAATGACCCGCCAGGCTGCACCAATCC (SEC ID N°: 137)
JSS84	GAGGCTCTGCACAACCGCTTACGCAGAAGAGCCTCTCC (SEC ID N°: 138)
JSS85	GGAGAGGCTCTTCTGCGTGAAGCGGTTGTGCAGAGCCTC (SEC ID N°: 139)
JSS86	GATTCAAAAACAGCCTCTATCTGCAAATGAACAATTG (SEC ID N°: 140)
JSS87	CAGATAGAGGCTGTTTTTTGAATCATCTCTGGAGATGG (SEC ID N°: 141)
LC-MV Leader	GAGACCCAAGCTTGGTACC (SEC ID N°: 142)
LC reverse	CTGACTTTAACTCCTAACATG (SEC ID N°: 143)
JSS88	AATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACAATCACTTGCAGGGCCAGCTC (SEC ID N°: 144)
JSS90	CAAGTGATTGTGACCTTTTCCCCTGGAGATGCAGACATGATTGCTGGAGACTGGGA G (SEC ID N°: 145)
LChuF1	ACTTATACCGGTCAGATCGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATC (SEC ID N°: 146)
LChuF2	ACCAGCAGAAGCCAGGATCCCAGCCCAAACCCTGGATTTCTG (SEC ID N°: 147)
LChuF3	CAGCGCAATGGAGGCTGAAGATGCTGCC (SEC ID N°: 148)
LChuR1	TTGGGCTGGGATCCTGGCTTCTGCTGG (SEC ID N°: 149)
LChuR2	CTTCAGCCTCCATTGCGCTGATTGTGAGAGAGTAAG (SEC ID N°: 150)

Nombre	Secuencia Oligo
LChuR3	ATTACCTTCGAAAAGTGTACTTACGTTTTATTTCCAGGTTGGTCCCCCTCCGAAC (SEC ID N°: 151)
LChuR4	ATTACCTTCGAAAAGTGTACTTACGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCCTCCGAAC (SEC ID N°: 152)

EJEMPLO 5 - Caracterización de anticuerpos anti-LTA humanizados

A. Producción transitoria de variantes de anticuerpo c96-110 humanizado recombinante

5 Para caracterizar las versiones humanizadas del anticuerpo anti-LTA, los plásmidos pJRS334, 391, 392, 393 y 394 (véase Figura 10) se transfectaron en células COS usando Superfect (Qiagen) en pocillos de cultivo de tejido de 6 pocillos como se describe por el fabricante. El plásmido pJRS334 codifica el anticuerpo c96-110 y los plásmidos pJRS391-4 codifican las variantes humanizadas de c96-110. Después de dos días el sobrenadante se ensayó para 10 determinar la producción de anticuerpo quimérico. Estos anticuerpos se ensayaron posteriormente para determinar la capacidad del anticuerpo expresado de unirse a antígeno LTA de *S. aureus*.

15 Los ensayos de producción de anticuerpos se llevaron a cabo en tiras de 8 pocillos a partir de placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) recubiertas a una dilución de 1:500 con un Fc antihumano de cabra (Pierce). Las placas se cubrieron con película sensible a presión y se incubaron durante una noche a 4 °C. Posteriormente las placas se lavaron una vez con solución de lavado (Imidazole/NaCl/Tween-20 al 0,4%). Cien microlitros de diluciones de sobrenadante de cultivo de las células COS transfectadas de forma transitoria se aplicaron posteriormente a pocillos duplicados y se permitió que se incubaran durante 60 minutos en un rotador de placa a temperatura ambiente. Las placas se lavaron siete veces con solución de lavado. Un conjugado de IgG H + 20 L-HRP anti-humano de cabra se diluyó 1:4000 en el diluyente de muestra/conjugado y cien microlitros de la dilución se añadieron a cada una de las muestras y después se incubaron en un rotador de placa durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron como se ha indicado anteriormente y posteriormente se incubaron con 100 µl/pocillo de sustrato de desarrollo ABTS (BioFX) durante 1 minuto a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de tampón de inactivación Quench (BioFX) y el valor de absorbancia a 405 nm se 25 determinó usando un lector de ELISA de placa de microtitulación automatizado (véase los resultados de la Tabla 8 y la Figura 11). Este ensayo demuestra que las transfecciones de células COS con estas construcciones de plasmado da como resultado que las células produzcan moléculas que contienen dominios tanto IgG como kappa humanos. La aproximación de concentración de anticuerpo en cada uno de los sobrenadantes celulares se determinó mediante comparaciones con una serie de dilución de curva normal usando IgG1 monoclonal humana a 0,5 µg/ml a 0,04 µg/ml. 30

Tabla 8. Producción de anticuerpo en células COS (D.O._{405 nm})

Dilución	pJRS391	pJRS392	pJRS393	pJRS394	pJRS334
1:1	1,01	1,09	1,14	1,2	1,05
1:2	0,56	0,65	0,75	0,88	0,68
1:4	0,36	0,44	0,52	0,57	0,41
1:8	0,17	0,34	0,33	0,36	0,27
1:16	0,13	0,19	0,23	0,26	0,18

B. Caracterización de unión de anticuerpo a LTA mediante las variantes humanizadas.

35 Los sobrenadantes de cultivo que contienen anticuerpo a partir de las células COS transfectadas de forma transitoria se ensayaron posteriormente para determinar la capacidad de los anticuerpos expresados de unirse a LTA de *S. aureus*. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en tiras de 8 pocillos a partir de placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc.) recubiertas a 1 µg/ml con LTA de *S. aureus* (Sigma) usando PBS. Las placas se cubrieron e incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas posteriormente se lavaron una vez con PBS. Cien microlitros de diluciones de sobrenadante de cultivo se aplicaron posteriormente a pocillos duplicados y se permitió que se incubaran durante 60 minutos en un rotador de placa a temperatura ambiente. Las placas se lavaron siete veces con solución de lavado. La IgG H + L-HRP antihumana de (Zymed) se diluyó 1:4000 en el diluyente de muestra/conjugado y cien microlitros de la dilución se añadieron a cada una de las muestras y después se incubaron 45 en un rotador de placa durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como anteriormente y después se incubaron con 100 µl/pocillo de sustrato de desarrollo ABTS (BioFX) durante 10-15 minutos en un rotador de placa a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de tampón de inactivación (BioFX) y el valor de absorbancia a 405 nm se determinó usando un lector de ELISA de placa de microtitulación automatizado (véase los resultados en la Tabla 9 y la Figura 1). Este ensayo demuestra que la transfección de 50 células con estas construcciones de plásmidos da como resultado que las células produzcan niveles comparables de anticuerpos A110 humanizados.

Tabla 9. Ensayo de unión de anticuerpo (D.O. 405 nm)

[Ab] equivalente en ng/ml	pJRS391	pJRS392	pJRS393	pJRS394	pJRS334
100,00	1,45	0,86	1	1,1	1,65
50,00	0,98	0,4	0,45	0,45	0,93
25,00	0,42	0,23	0,27	0,27	0,43
12,50	0,2	0,13	0,16	0,15	0,25
6,25	0,1	0,1	0,1	0,1	0,13

C. Determinaciones de constante de afinidad de c96-110 usando análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR).

5 Estos anticuerpos se examinaron posteriormente usando resonancia de plasmón superficial para evaluar la unión de anticuerpo al antígeno LTA de *S. aureus*. Es evidente a partir de estos resultados en la Tabla 10 que el anticuerpo A110 humanizado producido por pJRS391 es comparable en su capacidad de unión a LTA con el anticuerpo A110 parental (o c96-110). Por lo tanto la versión humanizada tiene que tener una afinidad de unión aparente similar a LTA a la de su parental.

C-1. Preparación e inmovilización de vesícula.

15 Vesículas que contienen ácido lipoteicoico (LTA) se prepararon de acuerdo con el método de Kalb *et al.*, Biochemica et Biophysica Acta (1992) 1103, 307-316. En resumen, una solución de fosfatidil-etanolamina linoleoil-palmitoil (PE-L-P, SIGMA, St. Louis, MO) en cloroformo se evapora hasta sequedad al vacío. Eluyente BIAcore (HBS) y LTA de *Staphylococcus aureus* (Sigma, St. Louis MO) se añadieron para preparar una solución de PE-L-P 0,2 mM en HBS y LTA al 1% en PE-L-P. Después de agitación vorticial vigorosa la solución se pasa a 8 veces a través de un filtro de policarbonato (poros de 0,1 µm, Nucleopore Corning). Esta solución se inyecta inmediatamente en la microplaca HPA de BIAcore (BIAcore Inc. Piscataway, NJ) hasta que se obtiene una meseta de aproximadamente 1400 RU. Las vesículas se fusionan espontáneamente con la superficie de una microplaca HPA.

C-2. Análisis SPR

25 Las cinéticas de unión se determinaron en un instrumento BIAcore (BIAcore Inc., Piscataway, NJ) provisto de una microplaca HPA recubierto con PE-L-P/LTA al 1%. Concentraciones diferentes de c96-110 se inyectaron sobre la superficie. Ya que la superficie de la microplaca no se pudo regenerar, se llevó a cabo únicamente 1 inyección por superficie. Los índices de asociación y disociación se determinaron con el software BIAevaluation 2.0 (BIAcore Inc., Piscataway, NJ) usando el modelo de unión de uno a uno.

Tabla 10. Constantes de afinidad aparente para c96-110 para concentraciones diferentes de LTA

Conc. de LTA	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_A [M^{-1}]
0,1%	$1,68 \times 10^6$	$1,68 \times 10^{-2}$	1×10^8
1%	$1,33 \times 10^6$	$1,15 \times 10^{-2}$	$1,16 \times 10^8$
10%	$2,07 \times 10^5$	$3,51 \times 10^{-4}$	$5,89 \times 10^8$

Ejemplo 6. Comparación *in silico* de humanización de anticuerpo anti-TAC con el enfoque de mejor ajuste de FR de la invención.

35 Para comparar enfoques, los anticuerpos específicos para los cuales se había llevado a cabo la humanización y descrito en publicaciones se comparan con los resultados de humanización mediante el enfoque del mejor ajuste de FR. Cuando el trabajo de humanización original se llevó a cabo en el pasado, la base de datos de Kabat no era tan extensa como lo era cuando se llevó a cabo esta comparación *in silico*. La expansión de la base de datos proporciona un número aumentado de armazones que se podrían considerar para mejor ajuste. Para corregir la desviación introducida como un resultado de la base de datos expandida, se llevó a cabo una búsqueda de mejor ajuste revisada y los resultados se presentaron.

45 En este Ejemplo, la comparación se llevó a cabo para el anticuerpo anti-TAC. La humanización *in silico* se presenta en las Tablas 11 y 12. En la primera línea de cada tabla, la secuencia de anticuerpo murino de partida se informa y la segunda línea es la secuencia del anticuerpo humanizado original (Queen, *et al.* PNAS 86: 10029-10033 (1989)) donde el armazón que muestra el mejor ajuste fue 035921 para el dominio variable de cadena ligera y 035918 para el dominio variable de cadena pesada. La tercera línea en cada tabla muestra el armazón de mejor ajuste preferido determinado en el momento de esta comparación. La última línea muestra la secuencia que se hubiera preferido usando el enfoque de mejor ajuste de FR.

50 En la realización de esta comparación, se pueden observar los beneficios del enfoque de mejor ajuste de FR revisando el número global de sustituciones de aminoácidos necesarias, el número de restos de vernier que

necesitaron cambio y la puntuación de homología global. Al minimizar el número de sustituciones de aminoácidos, se reducen el tiempo, coste y trabajo implicado en la propia humanización. Mediante la identificación de las FR en las cuales los restos de vernier se mantienen como el aminoácido preferido, los efectos dañinos sobre la confirmación de las CDR se minimizan lo cual debería conducir a efectos mínimos sobre la afinidad de unión de anticuerpo. Una puntuación de homología global mejor (es decir,% de homología) para los armazones de cadena ligera y pesada se observa para el enfoque de mejor ajuste de FR en comparación con los otros enfoques basados en armazón.

Para el anticuerpo anti-TAC, la humanización original se basó en la selección de 035921 y 035918 como los armazones con el mejor ajuste para la cadena ligera y la cadena pesada respectivamente. Esta humanización requirió la sustitución de 28 (cinco de los cuales son restos de vernier) de los 86 aminoácidos en el armazón de cadena ligera y 29 (cinco de los cuales son restos de vernier) de 87 aminoácidos en el armazón de cadena pesada. Usando la base de datos de Kabat expandida, el armazón CEA4-8A (004752) tuvo el mejor ajuste para la cadena ligera y el anticuerpo A10 (045903) tuvo el mejor ajuste para la cadena pesada (usando criterios relajados que asumen que los armazones de dominio variable de cadena ligera y pesada no tienen que venir del mismo anticuerpo). Esto dio como resultado un mejor ajuste en comparación con el anti-TAC humanizado original y requeriría menor número de sustituciones totales (30 frente a 57) y menor número de cambios en los restos de la zona de vernier (4 frente a 10) y una mejor homología. Pero el mejor ajuste de FR da el resultado superior, necesitando únicamente 23 sustituciones de aminoácidos, de los cuales únicamente 3 son restos de vernier. La homología global entre el anti-TAC murino y el anti-TAC humanizado original fue el 74,3%. La homología global mejora al 86,5% con la base de datos expandida pero mejora al 89,6% cuando se aplica el enfoque de mejor ajuste de FR.

Comparación de enfoques de humanización para cadena ligera de anti-TAC

	Cambios de aa	Vernier	% Homología
huAnti-TAC	28/106	5	73,6%
CEA4-8A (004752)	24/106	3	77,4%
Mejor ajuste de FR	18/106	2	83%

Comparación de enfoques de humanización para cadena pesada de anti-TAC

	Cambios de aa	Vernier	% Homología
huAnti-TAC	29/116	5	75%
A10 (045903)	6/116	1	94,8%
Mejor ajuste de FR	S/116	1	95,7%

Comparación global de enfoques de humanización para dominios variables de anti-TAC

	Cambios de aa	Vernier	% Homología
huAnti-TAC	57/222	10	74,3%
A10 (045903)	30/222	4	86,5%
Mejor ajuste de FR	23/222	3	89,6%

Tabla 11. Comparación de cadena ligera de anti-TAC humanizado (huAnti-TAC) (SEC ID N°: 154), muAnti-TAC (SEC ID N°: 153) y CEA4-8A (SEC ID N°: 155) mediante enfoques incluyendo el enfoque del mejor ajuste de FR (SEC ID N°: 156)

Tabla 11A	
Nombres	LC-FR1 (23 aa)
muAnti-TAC	1 10 20 35 49 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITC WFQQKPGTSPKLWIY
huAnti-TAC	D QM STL V DR Y KA LM
CEA4-8A	E SSL V DR Y KA L
	004752
Mejor ajuste de FR	E TL V DR M KA L
	ABO.B1 (047269) G3D10K (005121)

Tabla 11B						
Nombres	LC-FR3 (32aa)			LC-FR4 (10aa)		
muAnti-TAC	57	60	70	80	98	107
	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYC			FGSGTKLELK		
huAnti-TAC	S	I	EFT	SLQPD	F	Q V V
CEA4-8A	S		DFT	SLQP	F	G VDI
	004752					
Mejor ajuste de FR	D		SF	SLQ	V	Q
	FRA(037670)			HSC13(036038)		

Tabla 12. Comparación de cadena pesada de anti-TAC humanizado (huAnti-TAC) (SEC ID N°: 158), muAnti-TAC (SEC ID N°: 157) y A10 (045903) (SEC ID N°: 159) mediante enfoques incluyendo el enfoque de mejor ajuste de FR (SEC ID N°: 160)

Tabla 12A						
Nombres	HC-FR1 (30 aa)					
muAnti-TAC	1	10	20	30	36	49
	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFT			WVKQRPGQGLEWIG		
huAnti-TAC	V	VK	S	V	G	S R A M
A10 (045903)	V		V	D	Sin cambios	
Mejor ajuste de FR			V	V	D	Sin cambios
	A10			A10		

Tabla 12B						
Nombres	HC-FR3 (32 aa)			HC-FR4 (11 aa)		
muAnti-TAC	67	75	85	95	107	117
	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYYCAR			WGQGTTLTVSS		
huAnti-TAC	RV	I E	TN	E	RS	T F F G EYN GLV
A10 (045903)	V			S		V
Mejor ajuste de FR		V		S		Sin cambios
	A10 (045903)			SCF11 (041948)		

Ejemplo 7. Comparación *in silico* de humanización del anticuerpo Mc3 con el enfoque de mejor ajuste de la invención.

- 10 Al igual que en el ejemplo anterior, un segundo anticuerpo humanizado se examina nuevamente *in silico* en este ejemplo para comparar el enfoque de humanización usado para este anticuerpo frente a la humanización mediante el enfoque de mejor ajuste de FR. Se llevó a cabo una búsqueda de mejor ajuste revisada y los resultados se presentaron con el fin de corregir la desviación introducida como un resultado de la base de datos expandida.
- 15 En este ejemplo, la comparación se realizó para el anticuerpo Mc3. La humanización *in silico* se presenta en las Tablas 13 y 14. En la primera línea de cada tabla, se presenta la secuencia del anticuerpo murino de partida y la segunda línea es la secuencia del anticuerpo humanizado original de (Patente de Estados Unidos N° 5.639.641). La tercera línea de cada tabla muestra el armazón de mejor ajuste preferido determinado en el momento de esta comparación. La última línea muestra la secuencia que se hubiera preferido usando el enfoque de mejor ajuste de FR.

25 Para el anticuerpo Mc3, la humanización original se desveló en la Patente de Estados Unidos N° 5.639.641. Esta humanización requirió la sustitución de 16 restos (ninguno de los cuales eran restos de vernier) de los 107 aminoácidos en el armazón de cadena ligera y 14 restos (ninguno de los cuales eran restos de vernier) de 117 aminoácidos en el armazón de cadena pesada. Usando la base de datos de Kabat expandida, el armazón del clon 47 de VL (024300) tenía el mejor ajuste para el dominio variable de cadena ligera y el anticuerpo A10 (045903) tenía el mejor ajuste para el dominio variable de cadena pesada (usando criterios relajados que asumen que los armazones de dominio variable de cadena ligera y pesada no tienen que venir del mismo anticuerpo). Aún cuando se usan estos armazones, el anticuerpo "humanizado" *in silico* resultante no es tan bueno como el anticuerpo humanizado originalmente. Esto se debe al hecho de que se recomendaron cambios adicionales por el método originalmente para el Mc3 humanizado original. El armazón de mejor ajuste a partir de la humanización *in silico* requeriría 35 sustituciones de aminoácidos, en comparación con los 30 cambios de aminoácidos que se requirieron por la humanización original. No son necesarios cambios en los restos de la zona vernier en ninguna humanización. Pero el enfoque de mejor ajuste de FR de la invención da el resultado superior, necesitando únicamente 26

ES 2 436 209 T3

sustituciones de aminoácidos y ningún cambio de restos de vernier. La homología global entre el Mc3 murino y el ejemplo humanizado *in silico* es del 82,2% y el 85% para el Mc3 humanizado original. El mejor global es el 89,7% para el presente enfoque de mejor ajuste de FR.

5 Comparación de enfoques de humanización para cadena ligera de Mc3

	Cambios de aa	Vernier	% Homología
huMc3 (037000)	16/107	0	85%
Armazón (024300)	19/107	0	82,2%
Mejor ajuste de FR	11/107	0	89,7%
huMc3 (037000)	14/117	0	88%
Armazón (045903)	16/117	0	86,3%
Mejor ajuste de FR	15/117	0	87,2%

Comparación global de enfoque de humanización para dominios variables de Mc3

	Cambios de aa	Vernier	% Homología
huMc3 (037000)	30/224	0	86,6%
Armazón	35/224	0	84,4%
Mejor ajuste de FR	26/224	0	88,4%

10 **Tabla 13.** Comparación de cadena ligera de Mc3 humanizada (HuMc3-LC) (SEC ID N° 162) y Mc3-LC (SEC ID N° 161) usando moldes de Immunogen frente a mejor ajuste de armazón (SEC ID N° 163) frente a enfoque de mejor ajuste de FR (SEC ID N°: 164)

Tabla 13A	
Nombres	LC-FR1 (23 aa)
Mc3-LC	1 10 20 35 49
HuMc3-LC	DIVMTQSHKFMSTSEGDWVSITC WYQQKPGQSPKLLIY
Armazón	PDSLAV L ERAT Sin cambios
Mejor ajuste de FR	037000 037000
	PSSL A V R T KA
	024300 Sin cambios
	PSSL A V R 047246
	047664 047246
Tabla 13B	
Nombres	LC-FR3 (32aa) LC-FR4 (10aa)
MC3-LC	57 60 70 80 88 98 107
HuMc3-LC	GVPDRFSGSGGTDFITISSVQAEDLAVYYC FGSGTNLEIK
Armazón	L L V KV
Mejor ajuste de FR	037000 037000
	S L L P F T G KV
	024300
	t L L V Q
	005062 047666

Tabla 14. Comparación de cadena pesada de Mc3 humanizado (HuMc3-HC) (SEC ID N°: 166) y Mc3-HC (SEC ID N°: 165) usando moldes de Immunogen frente a mejor ajuste de armazón (SEC ID N°: 167) frente a enfoque de mejor ajuste de FR (SEC ID N°: 168)

Tabla 14A						
Nombres	HC-FR1 (30 aa)					
Mc3-HC	1	10	20	30	36	44
HuMc3-HC	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCEASGYSFT			WVKQSHGMNLEWIG		
Armazón	V	A VK	V V K	P		
Mejor ajuste de FR	037010					
	Q	A	V L K D T	RP QG		
	045903					
	V	A VK	V V K	RP QG		
	050357			045903		
Tabla 14B						
Nombres	HC-FR3 (32aa)			HC-FR4 (11aa)		
Mc3-HC	67	75	85	95	107	117
HuMc3-HC	KATLTVDKSSGTAYMELLSLTSEDSAVYFCAR			WGQGTSVTVSS		
Armazón		TS	S R T	L		
Mejor ajuste de FR	037010					
		S	Q S	Y	T	
	045903					
		S	Q S	Y	Sin cambios	
	045903				041935	

5 **Ejemplo 8.** Comparación *in silico* de humanización de anticuerpo anti-FT: enfoque de armazón frente a mejor ajuste de FR.

Se puede realizar otra comparación de métodos de humanización usando el anticuerpo del Ejemplo 1 descrito anteriormente. Se realiza una comparación para el mejor ajuste entre el enfoque de armazón entero y se compara con el enfoque de mejor ajuste de FR para el anticuerpo anti-FT. Nuevamente esta comparación se llevó a cabo *in silico* más recientemente en comparación con la humanización original y el mejor ajuste resultante no es siempre idéntico a los resultados presentados en el Ejemplo 1 debido a la expansión de la base de datos de Kabat que proporciona FR con mejores ajustes. Sin embargo, la conclusión permanece que el enfoque de mejor ajuste de FR proporciona ventajas con respecto a los enfoques de mejor ajuste de armazón.

15 Cuando se lleva a cabo la búsqueda para identificar el armazón de mejor ajuste, los resultados son como se muestra más adelante en las Tablas 15 y 16. La primera línea en la tabla es la secuencia de anticuerpo monoclonal murino original, la segunda línea muestra la secuencia de mejor ajuste de FR original para el anticuerpo anti-FT humanizado del Ejemplo 1, la tercera línea es la secuencia para el armazón de mejor ajuste y la cuarta línea es el mejor ajuste determinado más recientemente usando el enfoque de mejor ajuste de FR. El armazón de mejor ajuste para la cadena ligera de anticuerpo anti-FT (Tabla 15) es scF11 (041950) que podría requerir 13 sustituciones de aminoácidos, cambiando un resto de la zona vernier y una homología del 87,9%. Los mejores ajustes de FR actualizados para la cadena ligera del anticuerpo anti-FT son 041950 para FR1, 019308 para FR2, 038233 para FR3, y 036038 para FR4 que requeriría 10 sustituciones de aminoácidos, cambiando 0 restos de la zona de vernier y una homología del 90,7%. El armazón de mejor ajuste para la cadena pesada de anticuerpo anti-FT (Tabla 16) es A10 (045903) que requeriría 20 sustituciones de aminoácidos, cambiando 1 resto de la zona de vernier y una homología del 82,9%. El enfoque de mejor ajuste de FR para la cadena pesada de anticuerpo anti-FT es 000042 para FR1, 023960 para FR2, 045903 para FR3 y 047722 para FR4 que requerirían 15 sustituciones de aminoácidos, cambiando 0 restos de la zona de vernier y una homología del 87,2%. El enfoque de mejor ajuste de FR global requiere 25 sustituciones de aminoácidos, sin cambiar ningún resto de la zona de vernier y una homología del 88,8% en comparación con el enfoque de mejor ajuste de armazón que requeriría 33 sustituciones de aminoácidos, cambiando 2 restos de la zona de vernier y una homología del 85,3%.

Comparación global de enfoques de humanización para dominios variables anti-FT

	Cambio de aa	Vernier	% Homología
Ejemplo 1	30/224	0	86,6
Armazón	33/224	2	85,3
Mejor ajuste de FR	25/224	0	88,8

35

Tabla 15. Comparación de cadena ligera anti-FT humanizada (cH36-LC) (SEC ID N°: 72) y (LC-Humana) (SEC ID N°: 79) usando enfoque de mejor ajuste de armazón (SEC ID N°: 169) frente a enfoque de mejor ajuste de FR (SEC ID N°: 170)

Tabla 15A	
Nombres	LC-FR1 (23 aa)
cH36-LC	1 10 20 35 49 DIQMTQSPASQSASLGESVTITC WYQOKPGKSPQLLIY
LC-Humana	L V DR L
Armazón	005191 019308 L V T Q V
Mejor ajuste de FR	041950 L V T L 019308
Tabla 15B	
Nombres	LC-FR3 (32aa) LC-FR4 (10 aa)
CH36-LC	57 60 70 80 88 98 107 GVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYC FGAGTKLELK
LC-Humana	D T P AT Q I
Armazón	038233 041950 Q L N P GS S I
Mejor ajuste de FR	038233 D T P AT Q 036038

Tabla 16. Comparación de cadena pesada anti-FT humanizada (cH36-HC) (SEC ID N°: 83) y (HC-Humana) (SEC ID N°: 91) usando enfoque de mejor ajuste de armazón (SEC ID N°: 171) frente a enfoque de mejor ajuste de FR (SEC ID N°: 172)

Tabla 16A	
Nombres	HC-FR1 (30 aa)
cH36-HC	1 10 20 30 36 49 EIQ LQQSGPELVKPGASVQV SCKTSGYSFT WVRQSHGKSLEWIG
HC-Humana	Q V G VK R A P G
Armazón	000042 023960 QV A KL A D T K RP QG
Mejor ajuste de FR	A10 (045903) Q V G VK R A P G 023960
Tabla 16B	
Nombres	HC-FR3 (32 aa) HC-FR4 (11 aa)
cH36-HC	67 75 85 95 107 117 KATLTVDKSSTTAFMHLNSLTSDDSAVYFCAR WGQGTTLTVSS
HC-Humana	TS Y E S R E T V
Armazón	037010 000049 S Y Q S E Y V
Mejor ajuste de FR	A10 (045903) S Y Q S E Y Sin cambios 047722

5 **Ejemplo 9.** Comparación *in silico* de humanización de anticuerpo anti-LTA: enfoque de armazón frente a mejor ajuste de FR.

Otra comparación de los métodos de humanización se puede realizar usando el anticuerpo del Ejemplo 3 descrito anteriormente. Se realiza una comparación para el mejor ajuste mediante el enfoque de armazón entero y se compara con el enfoque de mejor ajuste de FR para el anticuerpo anti-LTA (A110). Al igual que en el Ejemplo 8, esta

10

comparación se llevó a cabo *in silico* más recientemente en comparación con la humanización original y el mejor ajuste resultante puede no haber sido idéntico a los resultados presentados en el Ejemplo 3 debido a la expansión de la base de datos de Kabat que proporciona FR con mejores ajustes. En este caso particular las FR con el mejor ajuste son idénticas tanto en la humanización anterior como en esta comparación *in silico* más reciente. Sin embargo los resultados apoyan la conclusión de que el enfoque de mejor ajuste de FR proporciona ventajas con respecto a los enfoques de mejor ajuste de armazón.

Quando la búsqueda se lleva a cabo para identificar el armazón de mejor ajuste, los resultados son como se muestran más adelante en las Tablas 17 y 18. La primera línea en la tabla es la secuencia de anticuerpo monoclonal murino original, la segunda línea muestra la secuencia de mejor ajuste de FR original para el anticuerpo anti-LTA humanizado del Ejemplo 4, el cual resulta ser el mismo resultado que cuando se condujo la búsqueda de mejor ajuste de FR más recientemente y la tercera línea es la secuencia para el armazón de mejor ajuste determinado recientemente. El armazón de mejor ajuste para el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-LTA (Tabla 17) es 036047 el cual requeriría 13 sustituciones de aminoácidos de los 107 aminoácidos, cambiando 2 restos de la zona de vernier y una homología del 87,9%. Los mejores ajustes de FR para la cadena ligera del anticuerpo anti-LTA son 036047 para FR1, 037658 para FR2, 036047 para FR3 y 004763 para FR4 que requerirían 9 sustituciones de aminoácidos, sin cambiar ningún resto de la zona de vernier y una homología del 91,6%. El armazón de mejor ajuste para el dominio variable de cadena pesada de anticuerpo anti-LTA (Tabla 18) es 028897 que requeriría 15 sustituciones de aminoácidos de los 123 aminoácidos, cambiando 4 restos de la zona de vernier y una homología del 87,8%. El enfoque de mejor ajuste de FR para la cadena pesada de anticuerpo anti-LTA es 000468 para FR1, 000565 para FR2, 000628 para FR3 y 031571 para FR4 que requeriría 9 sustituciones de aminoácidos, cambiando 2 restos de la zona de vernier y una homología del 92,7%. En conjunto el enfoque de mejor ajuste de FR requiere 18 sustituciones de aminoácidos, cambiando 2 restos de la zona de vernier y una homología del 92,2% en comparación con el enfoque de mejor ajuste de armazón que requeriría 28 sustituciones de aminoácidos, cambiando 6 restos de la zona vernier y una homología del 87,8%.

Tabla 17. Comparación de cadena ligera anti-LTA humanizada (A110-LC) (SEC ID N°: 109) y (LC-Humana) (SEC ID N°: 127) usando mejor ajuste de armazón (SEC ID N°: 173)

Tabla 17A	
Nombres	LC-FR1 (23 aa)
A110-LC	1 10 20 35 49 DIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC WYQQKPGSSPKPWIS
LC-Humana	Q T M D I Q 036047 037658
Armazón	Q T M D I F T L Y 036047
Tabla 17B	
Nombres	LC-FR3 (32 aa)
A110-lc	57 60 70 80 88 98 107 GVPARFSGSGSGT S YSLTISRVEAEDAATYYC FGGGTMLEIK
LC-Humana	AM K 036047 004763
Armazón	AM S K 036047

Tabla 18. Comparación de cadena pesada anti-LTA humanizada (HC-A110) (SEC ID N°: 118) y (HC-Humana) (SEC ID N°: 123) usando mejor ajuste de armazón (SEC ID N°: 174)

Tabla 18A	
Nombres	HC-FR1 (25aa)
A110-HC	1 10 20 16 49 EVMLVESGGGLVQPGSLKLSCAAS WVRQAPGKGLEWYA
HC-Humana	Q G Sin cambios 000168 000565
Armazón	Q K R R G 028397

Tabla 18B						
Nombres HC-FR3 (32aa)						
A110-HC	67	75	85	95	107	117
HC-Humana	RFTISRDDSQSMLYLQMNLRKTEDTAMYCYVR				NGQGTSLTVSS	
		KNS	S	V A		V
Marco	000528				011571	
		KNT	S	V TT	G LV	
	028897					

LISTADO DE SECUENCIAS

5 (1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE:

10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Método de humanización de moléculas del sistema inmune

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 26

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

- 15 (A) DESTINATARIO
 (B) CALLE:
 (C) CIUDAD
 (D) ESTADO:
 (E) PAÍS:
 20 (F) CÓDIGO POSTAL:

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
 (B) ORDENADOR: IBM Compatible
 (C) SISTEMA OPERATIVO: DOS
 (D) SOFTWARE: FastSEQ Versión 1.5

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN
 (C) CLASIFICACIÓN:

35 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

40 (viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:

- 45 (A) NOMBRE:
 (B) NÚMERO DE REGISTRO:
 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE:

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

- 50 (A) TELÉFONO:
 (B) TELEFAX:
 (C) TELEX:

2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 321 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

10

```
GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCTGCCTCC CAGTCTGCAT CTCTGGGAGA AAGTGTCACC 60
ATCACATGCC TGGCAAGTCA GACCATTGAT ACATGGTTAG CATGGTATCA GCAGAAACCA 120
GGGAAATCTC CTCAGCTCCT GATTTATGCT GCCACCACT TGGCAGATGG GGTCCCATCA 180
AGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGCACAAA TTTTCTTTCA AGATCAGCAG CCTACAGGCT 240
GAAGATTTTG TAAATTATTA CTGTCAACAA GTTTACAGTT CTCCATTCAC GTTCGGTGCT 300
GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 321
```

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 107 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
 (vi) FUENTE ORIGINAL:

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 351 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

45

- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 3:

```
GAGATCCAGC TGCAGCAGTC TGGACCTGAG CTGGTGAAGC CTGGGGCTTC AGTGCAGGTA 60
TCCTGCAAGA CTTCTGGTTA CTCATTCACT GACTACAACG TGTACTGGGT GAGGCAGAGC 120
CATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGATAT ATTGATCCTT ACAATGGTAT TACTATCTAC 180
GACCAGAACT TCAAGGGCAA GGCCACATTG ACTGTTGACA AGTCTTCCAC CACAGCCTTC 240
ATGCATCTCA ACAGCCTGAC ATCTGACGAC TCTGCAGTTT ATTTCTGTGC AAGAGATGTG 300
ACTACGGCCC TTGACTTCTG GGGCCAAGGC ACCACTCTCA CAGTCTCCTC A 351
```

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 117 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:

20

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

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 5:

40

```
Leu Ala Ser Gln Thr Ile Asp
 1           5
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 6:

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 7:

Gln Gln Val Tyr Ser Ser Pro Phe Thr
 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8:

Thr Asp Tyr Asn Val Tyr
 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 9:

5

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15
Gly

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 10:

25

Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 11:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 11:
CTGGCAAGTC AGACCATTGA T 21

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50

- (A) LONGITUD: 21 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 12:

60

GCTGCCACCA ACTTGGCAGA T 21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 13:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 13:
CAACAAGTTT ACAGTTCTCC ATTACG T 28

15

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 14:
ACTGACTACA ACGTGTAC 18

30

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 51 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 15:
TATATTGATC CTTACAATGG TATTACTATC TACGACCAGA ACTTCAAGGG C 51

45

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

55

60

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 16:
 GATGTGACTA CGGCCCTTGA CTTC 24

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 23 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 17:
 GCACCTCCAG ATGTTAACTG CTC 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 20 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

35 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 18:
 GAARTAVCCC TTGACCAGGC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 19:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 35 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO:

(vi) FUENTE ORIGINAL:

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 19:
 GGAGGCGGCG GTTCTGACAT TGTGMTGWCM CARTC 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 45 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 20:

5 ATTTTCAGGCC CAGCCGGCCA TGGCCGARGT YCARCTKCAR CARYC 45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 21:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 21:

20 CCCGGGCCAC CATGKCCCCW RCTCAGYTYC TKG 33

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 22:

35 CCCGGGCCAC CATGGRATGS AGCTGKGTMA TSCTC 35

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 52 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO:
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 23:

50 ATATACTCGC GACAGCTACA GGTGTCCACT CCGAGATCCA GCTGCAGCAG TC 52

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 24:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

65

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 24:
 GACCTGAATT CTAAGGAGAC TGTGAGAGTG G 31

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 29 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 25:
 25 TTAATTGATA TCCAGATGAC CCAGTCTCC 29

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 45 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (v) TIPO DE FRAGMENTO:
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 26:
 TAATCGTTTCG AAAAGTGTAC TTACGTTTCA GCTCCAGCTT GGTCC 45

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un dominio variable (V) de anticuerpo humanizado, donde el método comprende:
 - 5 a) comparar la secuencia de aminoácidos de una región flanqueante (FR) de un dominio variable (V) de anticuerpo no humano con una colección de secuencias de aminoácidos de armazón de anticuerpo humano,
 - b) seleccionar una secuencia de FR humana a partir de la colección que tenga la mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la FR no humana,
 - 10 c) mutagenizar ADN de la FR no humana para codificar una FR humanizada (huFR) que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 75% idéntica a la FR humana seleccionada de la etapa b),
 - d) repetir las etapas a) a c) para cada una de las FR en el dominio V no humano para producir una pluralidad de secuencias de ADN en las cuales cada secuencia de ADN codifica una FR humanizada,
 - e) sustituir en un primer vector que codifica al menos el dominio V del anticuerpo no humano, cada una de las secuencias de ADN de huFR de la etapa d) por las FR no humanas correspondientes codificadas por el vector;
 - 15 donde la sustitución se operativamente cada una de las huFR con su región determinante de complementariedad correspondiente (CDR), y
 - f) expresar el primer vector en células hospedadoras y en condiciones que conduzcan a preparar el dominio V de anticuerpo humanizado.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, donde el dominio V es de una cadena ligera de anticuerpo no humano.
3. El método de la reivindicación 1, donde el dominio V se obtiene a partir de una cadena pesada de anticuerpo no humano.
- 25 4. El método de la reivindicación 2 o reivindicación 3, donde la región flanqueante (FR) del dominio V de cadena ligera o pesada, respectivamente, de la etapa a) es FR1.
5. El método de la reivindicación 4, donde la identidad de secuencia entre la FR1 y la FR de armazón humano seleccionada es al menos el 70%.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, donde la etapa d) comprende además comparar una segunda región flanqueante (FR2) del dominio V de cadena ligera o pesada no humano con la colección y seleccionar una FR humana que tenga al menos el 70% de identidad de secuencia.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, donde la etapa d) comprende además comparar una tercera región flanqueante (FR3) del dominio V de cadena ligera o pesada no humano con la colección y seleccionar una FR humana que tenga al menos el 70% de identidad de secuencia.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, donde la etapa d) comprende además comparar una cuarta región flanqueante (FR4) del dominio V de cadena ligera o pesada no humano con la colección y seleccionar una FR humana que tenga al menos el 70% de identidad de secuencia.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, donde el dominio V de cadena ligera o pesada humanizado comprende unidos covalentemente en secuencia: huFR1-CDR1-huFR2-CDR2-huFR3-CDR3-huFR4
- 50 10. El método de la reivindicación 2-9, donde los restos de aminoácidos de la zona de vernier en cada FR son idénticos en la FR no humana y humana del dominio V de cadena ligera o pesada de anticuerpo.
11. El método de la reivindicación 3, donde el primer vector comprende además un dominio constante de cadena pesada humano o fragmento del mismo unido covalentemente al dominio V de cadena pesada humanizado.
12. El método de la reivindicación 1, donde la colección de secuencias de aminoácidos humanas comprende secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos completamente secuenciados.
- 55 13. El método de la reivindicación 12, donde la colección comprende además secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos parcialmente secuenciados.
14. El método de la reivindicación 11, donde el fragmento de cadena pesada humanizado tiene una longitud de aminoácidos de entre 95 y 540 aminoácidos.
- 60 15. Un método como se indica en la reivindicación 1 para preparar un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, donde el método comprende:
 - 65 a) comparar la secuencia de aminoácidos de una región de armazón de dominio variable (V) de cadena ligera de anticuerpo no humano (1-FR) con una colección de secuencias de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo humano,

- b) seleccionar una secuencia de FR humana a partir de la colección que tenga la mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la 1-FR,
 c) mutagenizar ADN de la 1-FR para codificar una FR humanizada de cadena ligera (L-huFR) que tenga una secuencia de aminoácidos al menos el 75% idéntica a la FR humana seleccionada de la etapa b),
 5 d) repetir las etapas a) a c) para cada una de las FR en el dominio V de cadena ligera para producir una pluralidad de secuencias de ADN en las cuales cada secuencia de ADN codifica una L-huFR,
 e) sustituir en un primer vector que codifica al menos el dominio V de cadena ligera del anticuerpo no humano, cada una de las secuencias de ADN de L-huFR de la etapa d) para las 1-FR correspondientes codificadas por el vector; donde la sustitución une operativamente cada una de las L-huFR con una región determinante de
 10 complementariedad correspondiente (CDR),
 f) comparar la secuencia de aminoácidos de una región flanqueante de un dominio variable (V) de cadena pesada de anticuerpo no humano (h-FR) con una colección de secuencias de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo humano, o fragmentos de las mismas,
 g) seleccionar una secuencia de FR humana a partir de la colección que tenga la mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la h-FR,
 15 h) mutagenizar ADN de la h-FR para codificar una FR de cadena pesada humanizada (H-huFR) que tenga una secuencia de aminoácidos al menos el 75% idéntica a la FR humana seleccionada de la etapa g),
 i) repetir las etapas f) a h) para cada una de las h-FR en la región V de cadena pesada no humana para producir una pluralidad de secuencias de ADN en las cuales cada secuencia de ADN codifica una H-huFR,
 20 j) sustituir en dicho primer vector o un segundo vector que codifica al menos el dominio V de cadena pesada del anticuerpo no humano, cada una de las secuencias de ADN de H-huFR de la etapa i) por las h-FR correspondientes codificadas por el vector; donde la sustitución une operativamente cada una de las H-huFR con una CDR de cadena pesada correspondiente, y
 k) expresar el vector o vectores en las mismas células hospedadoras y en condiciones que conduzcan a producir cadenas ligera y pesada humanizadas y preparar el anticuerpo humanizado o el fragmento del mismo.
 25
16. El método de la reivindicación 15, donde los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada humanizadas o fragmentos de las mismas están contenidos en dicho primer vector y se co-expresan en el mismo hospedador.
- 30 17. Los métodos de las reivindicaciones 15 y 16, donde el hospedador es un mamífero, planta, ave o microbio.
18. El método de la reivindicación 2 o 15, donde el primer vector comprende además un dominio constante de cadena ligera humana o un fragmento del mismo unido covalentemente al dominio V de cadena ligera humanizada.
- 35 19. El método de la reivindicación 18, donde el dominio constante de cadena ligera es C_{κ} , C_{γ} o un fragmento del mismo.
20. El método de la reivindicación 19, donde el fragmento de cadena ligera humanizado tiene una longitud de aminoácidos de entre desde 95 hasta 235 aminoácidos.
 40
21. El método de la reivindicación 15, donde el segundo vector comprende además un dominio constante de cadena pesada humano o fragmento del mismo unido covalentemente al dominio V de cadena pesada humanizado.
- 45 22. El método de la reivindicación 11 o 21, donde el dominio constante de cadena pesada humana es uno de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
23. El método de cualquier reivindicación precedente, donde el método comprende además purificar el anticuerpo humanizado o dominio V de anticuerpo humanizado a partir de las células hospedadoras para producir una preparación sustancialmente pura del anticuerpo.
 50
24. El método de la reivindicación 23, donde el anticuerpo humanizado sustancialmente purificado se une específicamente a antígeno con una afinidad no menor de una décima parte de la del anticuerpo no humano parental.
- 55 25. El método de la reivindicación 24, donde el anticuerpo no humano parental es quimérico.
26. El método de la reivindicación 23, donde el anticuerpo reconoce específicamente y se une a ácido lipoteicoico o factor tisular humano.
- 60 27. El método de la reivindicación 15, donde el método comprende además preparar un anticuerpo de cadena única humanizado (sc-Fv) a partir de los dominios V humanizados.
28. El método de la reivindicación 15, 16 o 23, donde el fragmento del anticuerpo humanizado es uno de $F(ab')_2$, Fab' o Fab .

Fig. 1A. Dominio Variable de Cadena Ligera Anti-Factor Tisular de H36.D3.B7

GACATTCAGATGACCCAGTCTCCTGCCTCCCAGTCTGCATCTCTGGGAGAAAGTGTACCATCACATGC
 D I Q M T Q S P A S Q S A S L G E S V T I T C
CTGGCAAGTCAGACCATTGATACATGGTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTC
L A S Q T I D T W L A W Y Q Q K P G K S P Q L
 CTGATTTATGCTGCCACCAACTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACA
 L I Y A A T N L A D G V P S R F S G S G S G T
 AAATTTCTTTCAAGATCAGCAGCCTACAGGCTGAAGATTTTGTAAATTATPACTGTCAACAAGTTTAC
 K F S F K I S S L Q A E D F V N Y Y C Q Q V Y
AGTTCTCCATTACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
S S P F T F G A G T K L E L K

Fig. 1B. Dominio Variable de Cadena Pesada Anti-Factor Tisular de H36.D3.B7

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGCAGGTATCCTGCAAG
 E I Q L Q Q S G P E L V K P G A S V Q V S C K
 ACTTCTGGTTACTCATTCACTGACTACAACGTGTACTGGGTGAGGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAG
 T S G Y S F T D Y N V Y W V R Q S H G K S L E
 TGGATTGGATATATTGATCCTTACAATGGTATTACTATCTACGACCAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACA
 W I G Y I D P Y N G I T I Y D Q N F K G K A T
 TTGACTGTTGACAAGTCTTCCACCACAGCCTTCATGCATCTCAACAGCCTGACATCTGACGACTCTGCA
 L T V D K S S T T A F M H L N S L T S D D S A
 GTTIATTTCTGTGCAAGAGATGTGACTACGGCCCTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTC
 V Y F C A R D V T T A L D F W G Q G T T L T V
 TCCTCA
 S S

REGIONES CDR SUBRAYADAS (subrayado sencillo para secuencia de ácido nucleico y subrayado doble para secuencia de aminoácidos).

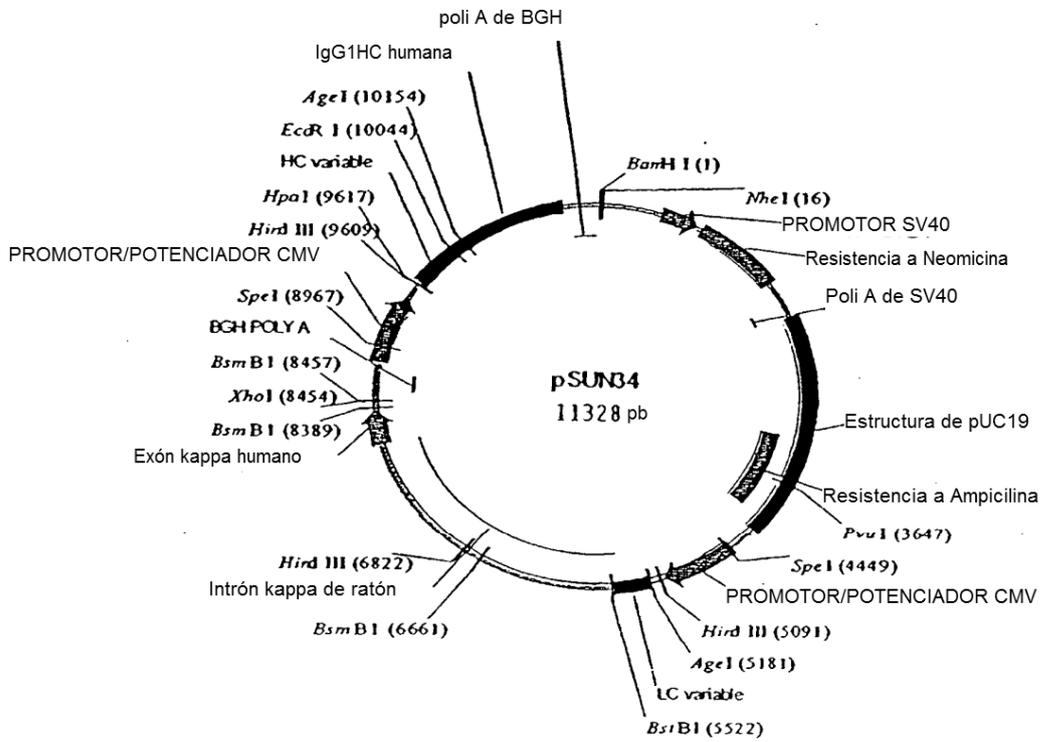


Fig. 2

Figura 3A.

FR1 (23 AA)	FR2 (15 AA)	FR3 (32 AA)	FR4 (10 AA)	Nombres
1 10 20	35 49 57 60 70	80 88	98 107	
DIQMTQSPASQASLGE SV TIIC	WYQOKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGAGTKLE IK	CH36-LC
DIQMTQSPASQASLGE SV TIIC	WYQOKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGAGTKLE IK	LC-03
DIQMTQSPASQASLGE SV TIIC	WYLQKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGAGTKLE IK	LC-04
DIQMTQSPASL S ASVGD R VTIIC	WYLQKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGQGT K LE IK	LC-05
DIQMTQSPASQASLGE SV TIIC	WYLQKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGQGT K LE IK	LC-06
DIQMTQSPASQASLGE SV TIIC	WYLQKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGQGT K LE IK	LC-07
DIQMTQSPASQASLGE SV TIIC	WYLQKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGQGT K LE IK	LC-08
DIQMTQSPASL S ASVGD R VTIIC	WYLQKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGQGT K LE IK	LC-09
DIQMTQSPASL S ASVGD R VTIIC	WYLQKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGQGT K LE IK	LC-10
DIQMTQSPASL S ASVGD R VTIIC	WYLQKPGKSPQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGQGT K LE IK	LC-11
DIQMTQSPASL S ASVGD R VTIIC	WYLQKPGQ S PQLLIY	GVPSRFSGSGSGTKFSPKISSLQAE DFV NY YC	FGQGT K LE IK	LC-12

Fig. 3A

Secuencias de CDR de cadena ligera de cH36

CDR1 (11 AA)	CDR2 (7 AA)	CDR3 (9 AA)
24 34	50 56	89 97
L A S Q T I D T W L A	A A T N L A D	Q Q V Y S S P F T

Fig. 3B

Fig. 3D

Notas:

1. Secuencia de aminoácidos en código de una letra
2. Inmediatamente a continuación del último resto del dominio variable de armazón 4 (FR4) se encuentra el primer resto del dominio constante de hOAT o hFAT.

Figura 4A

FR1 (30 AA)	FR2 (14 AA)	FR3 (32 AA)	FR4 (11 AA)	Nombres
1 10 20 30	36 49	67 75 85	107 117	
EIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSHGKSLLEWIG	KATLIVDKSSTTAFMHLNLSLTSDDSAVYFCAR	WGQGTTLTVSS	CH36-HC
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSHGKSLLEWIG	KATLIVDKSSTTAFMHLNLSLTSDDSAVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-01
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAFMHLNLSLTSDDSAVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-02
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAFMHLNLSRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-03
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAFMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-04
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-05
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-06
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-07
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-08
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-08R1
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-11
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-12
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-09
QIQLOQSGPELVKPGASVQVSCKTSGYSFT	WVRQSPGKGLEWIG	KATLIVDKSSTTAYMELSLRSED T AVYFCAR	WGQGTTLTVSS	HC-10

Fig. 4A

Secuencias de CDR de Cadena Pesada:

CDR1 (5 aa)	CDR2 (17 AA)	CDR3 (8AA)	Nombres
31 35 50	66 99 106		
D Y N V Y	Y I D P Y N G I T I Y D Q N F K G	D V T T A L D F	CH36
D Y N V Y	Y I D P Y N G I T I Y D Q N L K G	D V T T A L D F	HC-08

Fig. 4B

Fig. 4C

Fig. 4D

A excepción de HC-08, todos los otros mutantes de HC y cH36 contienen F en la posición 64 en CDR2. HC-08 tiene la mutación F64 a L (cambio de F a L en la posición 64).

Notas: Igual que en la Figura 3.

Figura 5A. Secuencia de Dominio Constante de Cadena Ligera kappa Humano:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKJH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 5B. Secuencia de Dominio Constante de Cadena Pesada de IgG1 Humana:

EFASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Notas:

1. Secuencia de aminoácidos en código de una letra.
2. Inmediatamente a continuación del último resto del dominio variable de armazón 4 (FR4) se encuentra el primer resto del dominio constante de OAT o FAT.
3. Las LC constantes son las mismas para hOAT y hFAT.

Figura 6A. Secuencia de Dominio Constante de Cadena Ligera Kappa Humano:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 6B. Secuencia de Dominio Constante de Cadena Pesada de IgG4 Humana:

EFASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY
 TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGV
 EVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPRFPQVYITLPPSQEEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLGK

Notas:

1. Secuencia de aminoácidos en código de una letra.
2. Inmediatamente a continuación del último resto del dominio variable de armazón 4 (FR4) se encuentra el primer resto del dominio constante de hOAT o hFAT.
3. El dominio constante de LC es el mismo para hOAT y hFAT.

Fig. 7A. Dominio Variable de Cadena Ligera Anti-LTA de A110

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

Fig. 7B. Dominio Variable de Cadena Pesada Anti-LTA de A110

GAAGTGATCGTGGTGGAGTCTGGTGGAGGATGGTGGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCATGTGCA
 E V M L V E S G G L V Q P K G S L K L S C A
 GCCCTGGATTACCTTCAATAACTACGCCCATGAATGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGTTTGGAA
A S G F T F N N Y A M N W V R Q A P G K G L E
 TGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAGTAATAATTATGCAACATTTATGCCGATTTCAGTGAAGACAGG
W V A R I R S K S N N Y A T F Y A D S V K D R
 TTCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAAATGAACRACTTGAAACTGAGGAC
 F T I S R D D S Q S M L Y L Q M N N L K T E D
 ACAGCCATGTATTACTGTGTGAGACGGGGCTTCAGGGATTGACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAA
T A M Y Y C V R R G A S G I D Y A M D Y W G Q
 GGAACCTCACTCACCCTCTCCTCA
 G T S L T V S S

Figura 8:

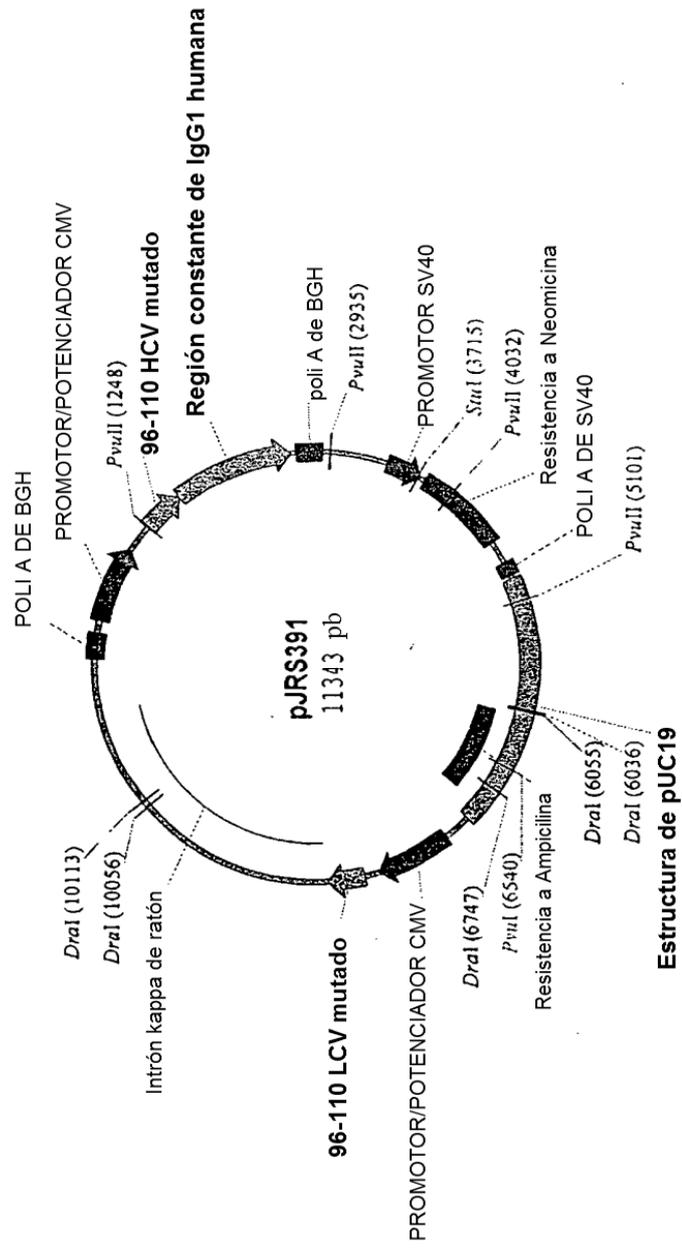


Figura 9A. Secuencias de Regiones Flanqueantes de Dominios Variables de Cadena Ligera de Anticuerpo A110 Parcialmente y Completamente Humanizado

FR1 (23 AA)	FR2 (15 AA)	FR3 (32 AA)	FR4 (10 AA)	Nombres
1 10 20 34 48 56 60 70 80 87 97 106				
DIVLSQSPAILSASPGEKVTMT	WYQKPGSSPKPWIS	GVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	FGGTMLEIK	A110-LC
QIVLTQSPAILSASPGEKVTMT	WYQKPGSSPKPWIS	GVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	FGGTKLEIK	PJRS374
QIVLTQSPAILSASPGEKVTMT	WYQKPGSQSPKPWIS	GVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	FGGTKLEIK	PJRS375
QIVLTQSPAILSASPGEKVTMT	WYQKPGSSPKPWIS	GVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	FGGTKLEIK	PJRS376
QIVLTQSPAILSASPGEKVTMT	WYQKPGSQSPKPWIS	GVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	FGGTKLEIK	PJRS377
QIVLTQSPAILSASPGEKVTIT	WYQKPGSQSPKPWIS	GVPARFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	FGGTKLEIK	PJRS384

CDR1 (10 AA)	CDR2 (7 AA)	CDR3 (9 AA)
24 33 49 55 88 96		
RASSSVNYMH	ATSNLAS	QOWSSNPPT

Fig. 9B Fig. 9C Fig. 9D

Figura 9E. Secuencias de Regiones Flanqueantes de Dominios Variables de Cadena Pesada de Anticuerpo A110 Parcialmente y Completamente Humanizado

FR1 (30 AA)	FR2 (14 AA)	FR3 (32 AA)	FR4 (11 AA)	Nombres
1 10 20 25 36 49 55 69 75 85 95 100 113 123				
EVMLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS	WVRQAPGKLEWVA	RFTISRDDSQSMLYLQMN SLK TKEDTAMYYCVR	WGQTS SLT VSS	A110-HC
EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS	WVRQAPGKLEWVA	RFTISRDDSQSMLYLQMN SLK TKEDTAMYYCVR	WGQTS SVT VSS	PJRS370
EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS	WVRQAPGKLEWVA	RFTISRDDSQSMLYLQMN SLK TKEDTAVYYCAR	WGQTS SVT VSS	PJRS364
EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS	WVRQAPGKLEWVA	RFTISRDDSQSMLYLQMN SLK TKEDTAVYYCAR	WGQTS SVT VSS	PJRS380
EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS	WVRQAPGKLEWVA	RFTISRDDSQSMLYLQMN SLK TKEDTAVYYCAR	WGQTS SVT VSS	PJRS381
EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS	WVRQAPGKLEWVA	RFTISRDDSKNSLYLQMN SLK TKEDTAVYYCAR	WGQTS SVT VSS	PJRS383

CDR1 (10 AA)	CDR2 (19 AA)	CDR3 (12 AA)
26 35 50 68 101 112		
GFTFNMYAMN	RIRSKSNNYATFYADSVKD	RGASGIDYAMDY

Fig. 9F Fig. 9G Fig. 9H

Figura 10. Construcciones de Plásmido que Producen A110 Humanizado para Evaluación

<u>Plásmido LC</u>	<u>LC N°</u>	Mutaciones
pJRS377	LC4	6
pJRS384	LC5	8
<u>Plásmido HC</u>	<u>HC N°</u>	Mutaciones
pJRS381	HC4	6
pJRS383	HC5	9
LC + HC		
<u>Plásmidos</u>		
pJRS391	LC4 + HC4	
pJRS392	LC4 + HC5	
pJRS393	LC5 + HC4	
pJRS394	LC5 + HC5	

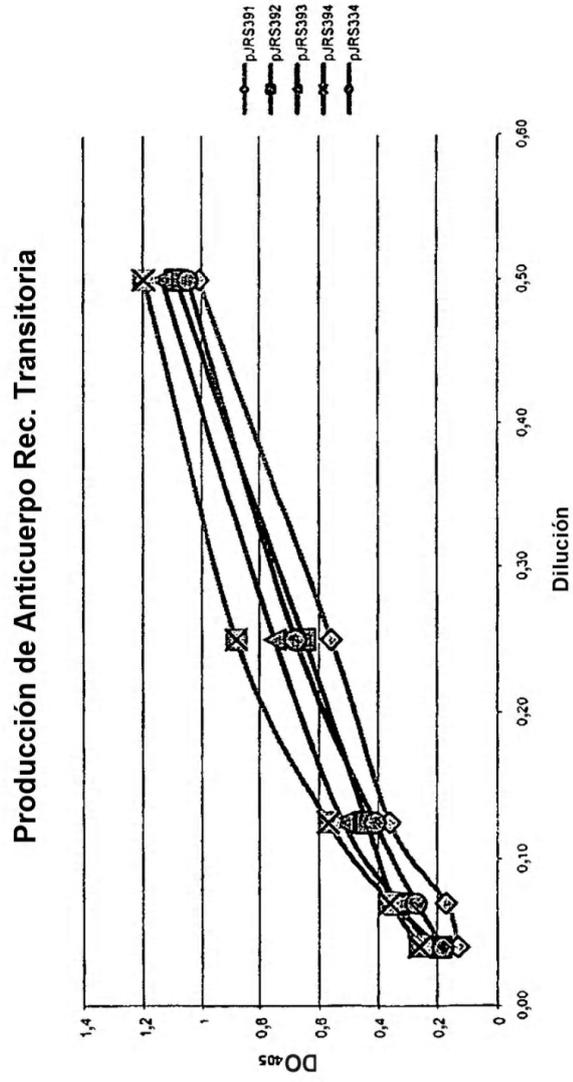
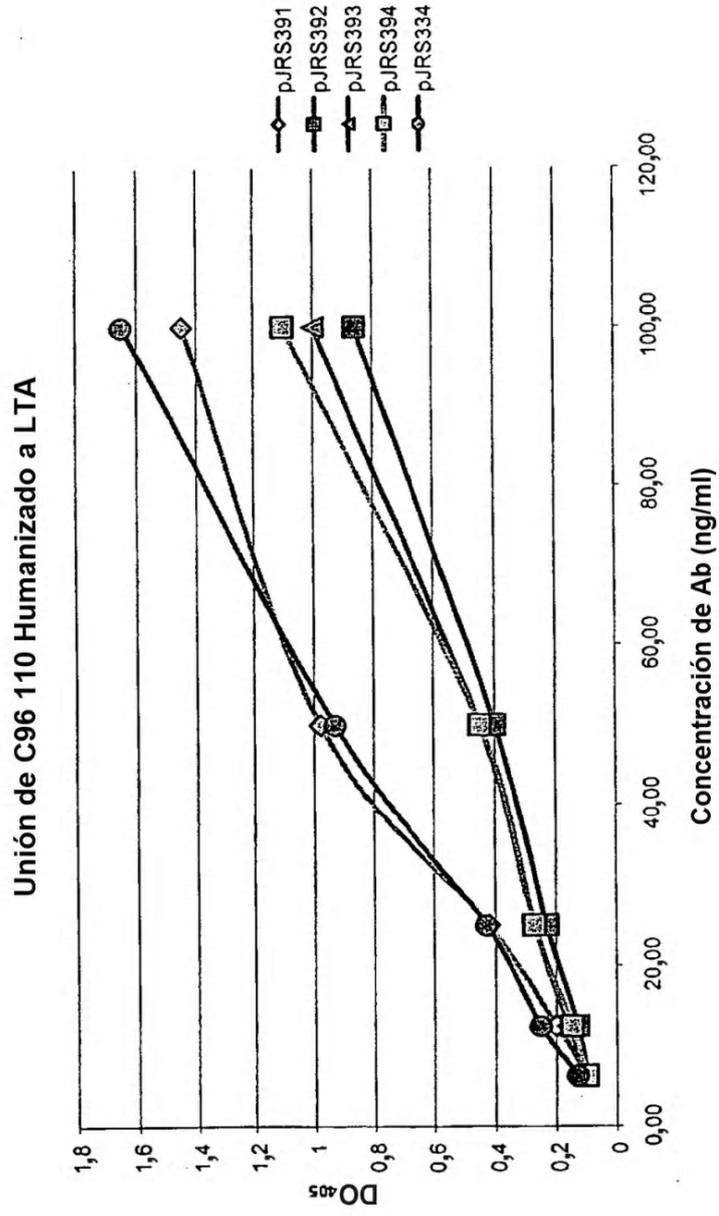


Figura 11

Figura 12 Determinación de Unión a LTA



Doc. 310003