

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 116**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007 E 07733392 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2041182**

54 Título: **Selección de marco**

30 Prioridad:

**03.07.2006 GB 0613209**

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

**11.08.2014**

73 Titular/es:

**UCB PHARMA S.A. (100.0%)  
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60  
1070 BRUSSELS, BE**

72 Inventor/es:

**ADAMS, RALPH;  
LAWSON, ALASTAIR DAVID GRIFFITHS;  
POPPELWELL, ANDREW GEORGE y  
TYSON, KERRY LOUISE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 484 116 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

Selección de marco.

La presente invención se refiere a métodos mejorados para la selección de regiones marco aceptor humano apropiadas para anticuerpos no humanos (donantes), y métodos para obtención de anticuerpos humanizados de afinidad alta utilizando tales marcos aceptores. La invención se refiere también a anticuerpos humanizados producidos utilizando estos métodos.

Las inmunoglobulinas son moléculas en forma de Y que comprenden dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Enlaces disulfuro unen entre sí los pares de cadenas pesada y ligera así como las dos cadenas pesadas. Cada cadena está constituida por un dominio variable que varía en secuencia y es responsable de la fijación de antígeno, conociéndose éstos como los dominios  $V_H$  y  $V_L$  para las cadenas pesada y ligera respectivamente. En la cadena ligera existe un solo dominio constante (CL) y en la cadena pesada existen tres (CH1, CH2 y CH3), siendo tales moléculas anticuerpos enteros.

Los residuos en los dominios variables de anticuerpos se enumeran convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (en lo sucesivo "Kabat *et al.* (supra)"). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva excepto donde se indica otra cosa. Debe observarse que las designaciones de residuos Kabat no siempre corresponden directamente a la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia lineal de aminoácidos real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales con respecto a la numeración Kabat estricta correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, sea región marco o región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura de dominio variable básica. La numeración Kabat correcta de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

Existen tres regiones dentro de los dominios variables que son hipervariables en secuencia ajustada dentro de cuatro regiones marco más altamente conservadas. Estas regiones hipervariables son fundamentalmente responsables del reconocimiento de antígeno y se hace referencia a ellas como 'regiones determinantes de la complementariedad' (CDRs).

Las CDRs del dominio variable de la cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2), y residuos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M.J. Mol. Biol., 1987, 196:901-917), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 al residuo 32. Así pues 'CDR-H1', como se utiliza en esta memoria, incluye también una CDR localizada en los residuos 26 a 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucle topológico de Chothia.

Las CDRs del dominio variable de la cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Las altas especificidad y afinidad de los anticuerpos hacen que los mismos sean agentes ideales de diagnóstico y terapéuticos, particularmente para modulación de las interacciones proteína:proteína. Los anticuerpos enteros y fragmentos de anticuerpos están demostrando ser agentes terapéuticos versátiles, como se ve por el reciente éxito de productos tales como ReoPro (fragmento Fab de anticuerpo quimérico), Rituxan (IgG1 quimérica), Remicade™ (IgG1 quimérica), Herceptina (IgG1 humanizada) y Humira (IgG1 humana). De interés particular son anticuerpos humanizados, que están orientados a reducir o eliminar la inmunogenicidad inherente asociada con los anticuerpos monoclonales no humanos.

El trabajo inicial acerca de la humanización de anticuerpos por injerto con CDR se llevó a cabo sobre anticuerpos monoclonales que reconocían antígenos sintéticos tales como el hapteno, NP (EP 0239400 y Jones *et al.*, 1986, Nature 321: 522-525). No obstante, se han descrito ejemplos en los cuales un anticuerpo monoclonal de ratón reconocedor de lisozima y un anticuerpo monoclonal de rata reconocedor de un antígeno de células T humanas se humanizaron por injerto con CDR (Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239:1534; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-327). Riechmann *et al.*, encontraron que la transferencia de las CDRs solas (como se define por Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA; Wu *et al.*, 1970, J. Exp. Med. 132:211-250 injertado en CDR) no era suficiente para proporcionar actividad satisfactoria de fijación de antígeno en el producto. Así pues, existe un problema en el sentido de que la transferencia de CDR sola no siempre da como resultado el mantenimiento de la integridad de la estructura tridimensional del sitio de fijación de antígeno, siendo el resultado una pérdida de la actividad de fijación de antígeno. Se encontró que cierto número de residuos marco aceptores tienen que alterarse a fin de que los mismos correspondan a los de la región marco del donante (véase, por ejemplo, Riechmann *et al.*, arriba). Protocolos para selección de residuos en las regiones marco aceptoras que pueden precisar ser cambiados se exponen en WO 90/07861 y WO 91/09967.

Con anterioridad, los investigadores sometieron a cribado anticuerpos donantes potenciales múltiples para determinar el que posea las características de fijación apropiadas, y humanizaron este anticuerpo utilizando la transferencia de CDR a un marco humano. Se han publicado numerosas revisiones que discuten los anticuerpos injertados en CDR con inclusión de Vaughan *et al.*, (1998), Nature Biotech. 16: 535-539).

5 Sin embargo, la transferencia de las CDRs de un anticuerpo monoclonal de afinidad alta a incluso un aceptor humano homólogo estrechamente apareado no produce fiablemente un anticuerpo humanizado con las características apropiadas de fijación bifuncionales. Esta invención reconoce que la eficiencia de las CDRs en sus marcos nativos puede no ser comparable a la eficiencia de las mismas secuencias CDR en marcos humanos. Así, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón con una afinidad de 50 pM para un antígeno dado puede, una vez humanizado por transferencia de CDR, tener una afinidad de 500 pM, mientras que otro anticuerpo monoclonal de ratón, con una afinidad de 100 pM para el mismo antígeno, puede retener toda esta actividad o incluso aumentar la afinidad en el formato transferido en CDR. La consideración importante es la eficiencia de las CDRs en el marco humano final, no en el marco nativo original. Por consiguiente, la invención hace posible la producción de un anticuerpo humanizado de afinidad alta sin relación con la afinidad del anticuerpo donante original. La presente invención utiliza el intervalo completo de regiones variables de anticuerpos donantes múltiples. Por ejemplo, los grandes números de anticuerpos donantes proporcionados por utilización del método del anticuerpo linfocítico seleccionado (SLAM; véase Babcook *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 7843-7848; WO 92/02551; WO 2004106377) se utilizan plenamente empleando los métodos de la invención. Así pues, se proporciona un método rápido para testar un gran número de CDRs en marcos humanos con vistas a la obtención de uno o más anticuerpos humanizados con las características de fijación y funcionales apropiadas, y específicamente una afinidad alta. Así pues, la invención integra humanización en el proceso de descubrimiento de la región variable y proporciona un método que consume menos tiempo y es más fiable para obtención de un anticuerpo humanizado de afinidad alta, preferiblemente en donde sólo las CDRs del anticuerpo donante han sido transferidas al marco aceptor.

15 WO 03/105782 da a conocer un método de identificación de residuos de aminoácidos en secuencias marco humanas para retro-mutación a un residuo donante.

25 En EP 0460167, Adair *et al.*, detallan una jerarquía de residuos de aminoácidos donantes y aceptores que se consideran esenciales para la producción de anticuerpos humanizados. Dichos investigadores no sugieren la jerarquía de los residuos presentados en la invención descrita en esta memoria. La invención descrita en esta memoria proporciona por tanto un método más sencillo y rápido para gestionar grandes números de anticuerpos donantes y su selección para humanización.

30 De acuerdo con ello, se proporciona un método para obtención de al menos un anticuerpo humanizado con especificidad para un antígeno seleccionado que comprende:

- (1) proporcionar secuencias de región  $V_H$  y/o  $V_L$  de anticuerpos donantes múltiples, cada una con especificidad para el antígeno seleccionado;
- 35 (2) seleccionar una secuencia marco aceptora de región  $V_H$  y/o  $V_L$  humana apropiada para cada secuencia donante, en donde la selección comprende realizar una alineación de homología entre la secuencia donante  $V_H$  y secuenciasceptoras de la región  $V_H$  humana, y/o la secuencia donante  $V_L$  y las secuenciasceptoras de la región  $V_L$  humana, y seleccionar aquellas secuenciasceptoras humanas que:

(I) para  $V_H$ :

40 (i) comparten identidad con la secuencia donante en al menos cinco residuos seleccionados de un grupo de seis residuos constituidos por los residuos 24, 49, 71, 73, 78 y 93, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y

(ii) comparten identidad con la secuencia donante en al menos veintidós residuos seleccionados del grupo constituidos por 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 23, 25, 36, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 67, 69, 76, 87, 89, 91 y 94, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y/o

(II) para  $V_L$  (Kappa):

(i) comparten identidad con la secuencia donante en al menos dos residuos seleccionados del grupo constituido por 46, 48 y 58, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y

50 (ii) comparten identidad con la secuencia donante en al menos veintiún residuos seleccionados del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 6, 35, 36, 37, 38, 44, 45, 47, 49, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 85 y 87, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;

- (3) transferir CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 de cada anticuerpo donante a cada una de las secuencias marcoceptoras humanas apropiadas seleccionadas para obtener un panel de secuencias de anticuerpos humanizados, en donde sólo las CDRs de cada anticuerpo donante se transfieren a cada una de

las secuencias marco aceptoras humanas apropiadas seleccionadas y el panel de secuencias de anticuerpo humanizados tienen todas ellas especificidad para el mismo antígeno seleccionado;

- (4) expresar las secuencias de anticuerpo humanizados en donde sólo se han transferido las CDRs de cada anticuerpo donante;
- 5 (5) cribar el anticuerpo expresado respecto a actividad de fijación de antígeno; y
- (6) seleccionar al menos un anticuerpo humanizado de afinidad alta.

En una realización, el paso (3) anterior incluye la transferencia adicional de uno o más residuos (residuos donantes) de la secuencia donante a la secuencia marco aceptora humana apropiada seleccionada.

- 10 El término "panel de secuencias de anticuerpo humanizados" incluye al menos 5, más preferiblemente al menos 10 a 20, y aún más preferiblemente al menos 20 a 30, 40 ó 50 o más anticuerpos. Los anticuerpos humanizados múltiples pueden expresarse luego simplemente y cribarse en cuanto a fijación de antígeno y se seleccionan uno o más anticuerpos humanizados de afinidad alta. Tales anticuerpos pueden utilizarse para desarrollo en anticuerpos terapéuticos.

- 15 En un ejemplo, los métodos de la presente invención permiten la expresión de anticuerpos humanizados sin necesidad de producir anticuerpos quiméricos intermedios. Así pues, no hay necesidad alguna de monitorizar el progreso de la actividad de fijación de antígeno de los anticuerpos donantes múltiples, debido a la fiabilidad del método en la permisión de la producción de anticuerpos humanizados de afinidad alta. Por tanto, la invención utiliza anticuerpos donantes múltiples con especificidad para un antígeno seleccionado y permite la separación de éstos hasta un número manejable para humanización (el panel).

- 20 Anticuerpos donantes monoclonales para uso en los métodos de la invención pueden obtenerse de cualquier fuente, por ejemplo, de células de hibridoma. En particular, la invención puede utilizar eficientemente la corriente de salida del proceso SLAM para obtención de secuencias de dominios variables de anticuerpos monoclonales. Así, muy preferiblemente los anticuerpos donantes para uso en la invención se han generado utilizando SLAM (véase arriba) y el método descrito en WO 2004106377.

- 25 Los anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier especie e incluyen moléculas monoclonales de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de dichas moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno (sitio de fijación de epítipo) que fija específicamente un antígeno. Los anticuerpos utilizados en la invención pueden ser de cualquier clase (v.g. IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

- 30 Un anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo producido por transferencia de CDR sólo o por transferencia de CDR más transferencia de uno o más residuos donantes, e incluye por tanto una molécula de anticuerpo en la cual la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs de un anticuerpo donante no humano (v.g. de murino o rata u otro anticuerpo monoclonal) injertado en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpo humanizados utilizadas en la invención pueden ser anticuerpos enteros, o pueden ser fragmentos, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFvs, y fragmentos de fijación de epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136). Así pues, los anticuerpos humanizados proporcionados por los métodos de la invención pueden comprender un dominio V<sub>H</sub> o un dominio V<sub>L</sub>, pero más preferiblemente comprenden un dominio V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> y, aún más preferiblemente, comprenden dos dominios V<sub>H</sub> y dos V<sub>L</sub>. En un ejemplo preferido, los anticuerpos humanizados comprenden una región V<sub>H</sub> y una región V<sub>L</sub> en donde CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 se han transferido desde un anticuerpo donante. Así pues, la persona experta apreciará que un panel de anticuerpos humanizados puede contener anticuerpos humanizados en los que las seis CDRs de un anticuerpo donante han sido transferidas. Muy preferiblemente, cada uno de los anticuerpos en un panel ha sido producido por transferencia de las seis CDRs de un anticuerpo donante, a saber, tres CDRs de cadena pesada y tres CDRs de cadena ligera.

- 45 Las CDRs de un anticuerpo donante monoclonal pueden incorporarse en una secuencia aceptora humana utilizando métodos de biología molecular conocidos por la persona experta en la técnica. Otros métodos incluyen los descritos por de Wildt *et al.*, 1997, J. Immunol. Methods 207:61-67 y Lagerkvist *et al.*, 1995, BioTechniques 18(5):862-869. Así pues, pueden prepararse anticuerpos humanizados como se conocen en la técnica por transferencia de al menos una de las CDRs de un anticuerpo individual donante a un marco aceptor humano. Las CDRs pueden injertarse en cualquier secuencia marco de región variable aceptora apropiada que tenga relación con la clase/tipo del anticuerpo donante del que se derivan las CDRs, e incluyen regiones marco de primate y humanas

- 55 Para obtención de anticuerpos humanizados, las regiones marco "apropiadas" son regiones marco variables humanas. Ejemplos de marcos humanos apropiados que pueden utilizarse en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, PUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, arriba). Alternativamente, pueden utilizarse secuencias de la línea germinal humana. Éstas están disponibles de la base de datos MRC vbase disponible en: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/>, introduciendo el término "vbase" en el enlace de búsqueda de sitio y accediendo al enlace vbase. Marcos humanos apropiados pueden obtenerse también a partir de una base de datos de secuencias de

inmunoglobulina humanas que incluye una base de datos o secuencias IgG reordenadas de individuos 'normales' de diverso origen étnico.

5 En la presente invención, el anticuerpo aceptor tiene preferiblemente cadenas homólogas al anticuerpo donante que son, de acuerdo con ello, el marco más apropiado; véase, por ejemplo, WO 90/07861 donde Queen propone que un criterio para la selección de un marco apropiado consiste en seleccionar un marco que es extraordinariamente homólogo al anticuerpo donante. Alternativamente, puede seleccionarse como el marco más apropiado un marco de región variable de consenso procedente de muchos anticuerpos humanos. En una realización, las cadenas pesada y ligeraceptoras no se derivan del mismo anticuerpo sino que pueden, en caso deseado, comprender cadenas compuestas que tienen regiones marco de región variable derivadas de cadenas diferentes, que son, por tanto, el marco más apropiado.

10 Si bien las alineaciones proporcionan identidad de secuencia, se apreciará que ciertas diferencias entre donante y aceptor tienen más probabilidad de ser aceptadas que otras debido a semejanza de residuos (por ejemplo, tamaño o carga). Así, es posible seleccionar una secuencia marco variable aceptor que no posee el apareamiento de identidad óptimo, pero que tiene cambios de aminoácidos conservadores o semiconservadores. Así, los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina pueden sustituirse a menudo uno por otro (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). De estas posibles sustituciones, se prefiere que se utilicen glicina y alanina una en sustitución de otra (dado que las mismas tienen cadenas laterales relativamente cortas) y que se utilicen valina, leucina e isoleucina unas en sustitución de otras (debido a que tienen cadenas laterales alifáticas más largas que son hidrófobas). Otros aminoácidos que pueden emplearse a menudo uno en sustitución de otro incluyen, pero sin carácter limitante:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas);
- serina y treonina (aminoácidos que tienen una cadena lateral hidroxil); y
- 25 • cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

30 En una realización específica de la presente invención, el marco de región variable más apropiado puede seleccionarse teniendo en cuenta la homología de un marco aceptor humano con la secuencia donante, pero, lo que es más importante, se seleccionarán aquellos marcos de región variable en los cuales se tienen en cuenta residuos específicos (que son residuos donantes forzados, es decir, les es asignado un peso dado (véase Tabla 1). Así pues, cuanto mayor es el número de estos residuos donantes a los que se ha asignado peso (importantes) que están presentes ya en un marco humano homólogo, tanto más apropiado es el marco humano con indiferencia de si la homología global es algo menor que la de otro marco con menos residuos con peso asignado coincidentes. Un experto en la técnica apreciará por tanto que puede seleccionarse un marco diferente como "apropiado" para cada anticuerpo donante individual.

35 De acuerdo con ello, la invención proporciona además un método para seleccionar una secuencia aceptor de región  $V_H$  humana apropiada, que comprende:

- (i) realizar una alineación de homología entre una secuencia donante  $V_H$  y secuencias de región  $V_H$  humanas; y
- (ii) seleccionar aquellas secuencias humanas que comparten identidad con la secuencia donante en al menos cinco residuos seleccionados del grupo constituido por los residuos 24, 49, 71, 73, 78 y 93, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
- 40

Convenientemente, el número de residuos (residuos Nivel 1H, véase Tabla 1) con identidad compartida en el paso (ii) anterior, para la región  $V_H$  es cinco, y muy preferiblemente la totalidad de los seis residuos comparten identidad.

45 Se comprenderá por la persona experta en la técnica que 'peso' se refiere a importancia, de tal modo que los residuos Nivel 1 son los más importantes, seguidos por los residuos Nivel 2, y así sucesivamente (véase Tabla 1). De este modo, se seleccionan como apropiadas aquellas secuencias aceptoras que coinciden en el número mínimo de residuos Nivel 1. Por consiguiente, será evidente que puede seleccionarse como apropiada más de una secuencia aceptor después de la alineación de homología.

50 Así pues, donde marcos  $V_H$  apropiados múltiples son evidentes, es decir tienen el mismo número de identidades, se asigna peso a un segundo subconjunto de residuos. De acuerdo con ello, la selección de una secuencia marco aceptor  $V_H$  humana apropiada puede comprender adicionalmente:

- (iii) evaluar la homología entre la secuencia donante  $V_H$  y dos o más secuencias humanas seleccionadas en el paso (ii) anterior; y

- (iv) seleccionar aquellas secuencias humanas que comparten identidad con la secuencia donante en al menos veintidós residuos seleccionados del grupo constituido por los residuos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 23, 25, 36, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 67, 69, 76, 87, 89, 91 and 94, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

5 Preferiblemente, el número de residuos en el Nivel 2H con identidad compartida en el paso (iv) anterior, para la región  $V_H$  es veintitrés, aún más preferiblemente veinticuatro residuos o veinticinco residuos, y, muy preferiblemente, la totalidad de los veintiséis residuos comparten identidad.

Más preferiblemente, el número de residuos en el Nivel 2H que comparten identidad en el paso (iv) anterior, para la región  $V_H$  es veintidós o veintitrés, aún más preferiblemente veinticuatro residuos o veinticinco residuos, y, muy preferiblemente, la totalidad de los veintiséis residuos comparten identidad.

10

En un ejemplo específico, puede darse un peso diferente a los residuos del Nivel 2H del paso (iv) anterior, dividiendo así el Nivel 2H en dos; Nivel 2H' y Nivel 3H (véase Tabla 1). Así, donde son evidentes marcos  $V_H$  apropiados múltiples, es decir dos o más secuencias tienen el mismo número de identidades, se asigna peso a un segundo subconjunto de residuos (Nivel 2H'). De acuerdo con ello, la selección de una secuencia marco aceptora  $V_H$  humana apropiada puede comprender además:

15

- (v) evaluar la homología entre la secuencia donante  $V_H$  y dos o más secuencias humanas seleccionadas en el paso (ii) anterior; y

(vi) seleccionar aquellas secuencias humanas que comparten identidad con la secuencia donante en al menos siete residuos seleccionados del grupo constituido por 36, 37, 39, 45, 47, 48, 76, 89, 91 and 94, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

20

Preferiblemente, el número de residuos con identidad compartida en el paso (iv) anterior, para la región  $V_H$  es ocho o nueve, y muy preferiblemente la totalidad de los diez residuos comparten identidad.

Donde marcos  $V_H$  apropiados múltiples son de nuevo evidentes, es decir tienen el mismo número de identidades, se asigna peso al tercer subconjunto de residuos (Nivel 3H). De acuerdo con ello, el método puede comprender además:

25

- (vii) evaluar la homología entre la secuencia donante  $V_H$  y dos o más secuencias humanas seleccionadas en el paso (vi) anterior; y

(viii) seleccionar aquellas secuencias humanas que comparten identidad con la secuencia donante en al menos trece residuos seleccionados del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 23, 25, 38, 41, 44, 46, 67, 69 y 87 numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

30

Preferiblemente, el número de residuos con identidad compartida en el paso (viii) anterior, para la región  $V_L$  es catorce o quince, y muy preferiblemente la totalidad de los dieciséis residuos comparten identidad.

Se proporciona adicionalmente por la presente invención un método para selección de una secuencia aceptora  $V_L$  humana apropiada de acuerdo con la parte (2) anterior, que comprende:

35 (ix) realizar una alineación de homología entre una secuencia  $V_H$  donante y secuencias marco  $V_L$  humanas;

- (x) seleccionar aquellas secuencias humanas que comparten identidad con la secuencia donante en al menos dos residuos seleccionados del grupo constituido por 46, 48 and 58, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

40 Muy preferiblemente, el número de residuos con identidad compartida en el paso (x) anterior, es la totalidad de los tres residuos (residuos de Nivel 1L).

Donde marcos  $V_L$  apropiados múltiples son evidentes, es decir, tienen el mismo número de identidades, se asigna peso a un segundo subconjunto de residuos (Nivel 2L). De este modo, la selección de una secuencia marco aceptora  $V_L$  humana apropiada puede comprender además:

45 (xi) evaluar la homología entre la secuencia  $V_L$  donante y dos o más secuencias humanas seleccionadas en el paso (x) anterior;

(xii) seleccionar aquellas secuencias humanas que comparten identidad con la secuencia donante en al menos veintiún residuos seleccionados del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 6, 35, 36, 37, 38, 44, 45, 47, 49, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 85 y 87, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

50

Más preferiblemente, el número de residuos en el Nivel 2L con identidad compartida en el paso (xii) anterior, para la región  $V_L$  es veintidós o veintitrés residuos, aún más preferiblemente veinticuatro o veinticinco residuos, y muy preferiblemente la totalidad de los veintiséis residuos comparten identidad.

5 En un ejemplo específico, puede asignarse un peso diferente a los residuos del Nivel 2L del paso (xii) anterior, dividiendo así el Nivel 2L en dos; Nivel 2L' y Nivel 3L (véase Tabla 1). Así, donde marcos  $V_L$  apropiados múltiples son evidentes, es decir dos o más secuencias tienen el mismo número de identidades, se asigna peso a un segundo subconjunto de residuos (Nivel 2L'). De acuerdo con ello, la selección de una secuencia marco aceptora  $V_L$  humana apropiada puede comprender además:

- 10 (xiii) evaluar la homología entre la secuencia donante  $V_L$  y dos o más secuencias humanas seleccionadas en el paso (x) anterior; y
- (xiv) seleccionar aquellas secuencias humanas que comparten identidad con la secuencia donante en al menos quince residuos seleccionados del grupo constituido por 2, 6, 35, 36, 38, 44, 49, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 85 y 87, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

15 Más preferiblemente, el número de residuos con identidad compartida en el paso (xiv) anterior, para la región  $V_L$  es dieciséis o diecisiete residuos. Muy preferiblemente, la totalidad de los dieciocho comparten identidad.

Donde marcos  $V_L$  apropiados múltiples son de nuevo evidentes, es decir que tienen el mismo número de identidades, se asigna peso a un tercer subconjunto de residuos. De acuerdo con ello, el método puede comprender además:

- 20 (xv) evaluar la homología entre la secuencia donante  $V_L$  y dos o más secuencias humanas seleccionadas en el paso (xiv) anterior; y
- (xvi) seleccionar aquellas secuencias humanas que comparten identidad con la secuencia donante en al menos seis residuos seleccionados del grupo constituido por 1, 3, 4, 37, 45, 47, 60 y 70, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

25 Preferiblemente, el número de residuos con identidad compartida en el paso (xvi) anterior, para la secuencia  $V_L$  es al menos siete. Muy preferiblemente, la totalidad de los ocho residuos comparten identidad.

**Tabla 1. Residuos de Nivel**

Nivel	Residuo de Nivel; numerado de acuerdo con Kabat
1H	24, 49, 71, 73, 78, 93
2H	1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 23, 25, 36, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 67, 69, 76, 87, 89, 91, 94
2H'	36, 37, 39, 45, 47, 48, 76, 89, 91, 94
3H	1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 23, 25, 38, 41, 44, 46, 67, 69, 87
1L	46, 48, 58
2L	1, 2, 3, 4, 6, 35, 36, 37, 38, 44, 45, 47, 49, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 85, 87
2L'	2, 6, 35, 36, 38, 44, 49, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 85, 87
3L	1, 3, 4, 37, 45, 47, 60, 70

H = cadena pesada; L = cadena ligera

30 En una realización muy preferida, las alineaciones y los apareamientos se realizan en un solo paso, preferiblemente de una manera automática. Puede utilizarse un BLAST estándar como se conoce en la técnica. Así, puede utilizarse un programa de computadora para identificar los residuos compartidos dentro de los Niveles 1 a 3 anteriores, asignando el peso máximo a los residuos de Nivel 1 y el peso mínimo a los residuos de Nivel 2. Así pues, los métodos de la invención pueden realizarse de forma manual, consecutiva o secuencial, y muy preferiblemente, de manera automática (v.g. utilizando una computadora), consecutiva o secuencialmente.

En otra realización, se asigna el peso máximo a los residuos de Nivel 1, asignándose menor peso a los residuos del Nivel 2' y el peso mínimo a los residuos del Nivel 3. De acuerdo con ello, los expertos en la técnica deben entender que el apareamiento óptimo, es decir la secuencia más apropiada será aquella o aquellas secuencias que coincide(n) totalmente en el Nivel 1H o 1L. Varios apareamientos requieren alineación de 2º Nivel, es decir al menos  
 5 21 residuos de Nivel 2H o 22 residuos de Nivel 2L. Un apareamiento mejor aún será aquella secuencia que haga coincidir la totalidad de los residuos del Nivel 1H o 1L, y 23, 24 ó 25 residuos del Nivel 2H, o 22, 23, 24 ó 25 residuos del Nivel 2L. El apareamiento óptimo será aquella secuencia que haga coincidir la totalidad de los residuos de Nivel 1H o 1L, y la totalidad de los residuos del Nivel 2H o 2L. El mismo razonamiento es aplicable donde se asignan tres Niveles. En el caso en que existan todavía dos o más marcos apropiados, la secuencia con la homología máxima  
 10 entre los residuos sin Nivel será generalmente la secuencia marco óptima.

Los procedimientos anteriores pueden utilizarse para seleccionar un marco o marcosceptor(es) de región variable apropiado(s), que comprende(n) los marcos 1, 2 y 3. El marco 4 es proporcionado por la región J. una secuencia de región J humana apropiada puede seleccionarse por un método de alineación similar. Muchos de los residuos importantes del marco 4 tienden a estar conservados entre especies (v.g. los residuos numerados Kabat de cadena pesada 103, 104 y 106; los residuos numerados Kabat de cadena ligera 98, 99 y 101), de tal modo que es menos  
 15 necesidad necesario asignar más peso a ciertos residuos que a otros. Puede utilizarse una simple alineación de identidad para seleccionar la secuencia de la región J humana más semejante, como estará claro para la persona experta en la técnica. Preferiblemente, se utiliza en estas alineaciones una secuencia de región J que forma el extremo C terminal de CDR-H3 y CDR-L3 para seleccionar la región J humana más próxima.

En un ejemplo específico, donde no todos los residuos marco aceptores humanos dentro de un Nivel dado coinciden con la secuencia donante, aquellos residuos no coincidentes pueden alterarse para hacer coincidir con el donante, es decir una transferencia del residuo donante a secuencia aceptora. Así, por ejemplo pero sin carácter limitante, si en el Nivel 1H los residuos 24 y 93 de la secuencia aceptora no coinciden con la secuencia donante, puede realizarse una transferencia de los residuos donantes 24 y/o 93 para alterar la secuencia aceptora. Esto último  
 20 es simplemente un ejemplo y no debe considerarse en modo alguno como limitante. De acuerdo con ello, los métodos de la invención pueden comprender además la alteración de uno o más residuos aceptores no coincidentes en cualquier Nivel para hacerlos coincidir con la secuencia donante.

Así, una ventaja particular de la presente invención es especialmente evidente donde el número de anticuerpos donantes con especificidad para el antígeno seleccionado es grande, por ejemplo pero sin carácter limitante, más de  
 30 20, 30, 40, 50 o más anticuerpos, y entonces dichos anticuerpos pueden filtrarse por realización de una o más alineaciones de homología con marcos humanos, asignándose peso a aquéllos que tienen residuos en los Niveles 1H, 2H, 2H', 3H, 1L, 2L, 2L' y 3L anteriores. Así, aquellos anticuerpos donantes con menor número de identidades, es decir aquéllos con los apareamientos mínimos dentro de un Nivel o Niveles, pueden separarse por cribado, dejando a la persona experta en la técnica con aquellos anticuerpos que tienen los apareamientos mejores/óptimos  
 35 para uso en la constitución del panel de anticuerpos humanizados. De este modo, la invención proporciona un medio sólido de selección de aquellos anticuerpos donantes para los cuales pueden encontrarse marcos apropiados. Aquéllos que tienen apareamientos deficientes utilizando los métodos de selección descritos pueden desecharse. Los métodos son, por tanto, particularmente útiles en la selección de aquellos anticuerpos donantes que pueden someterse a transferencia sólo de CDR. El proceso global de humanización se hace más sencillo y más fácil dado que se requiere injerto mínimo (convenientemente la totalidad de las 6 CDRs de la especie donante).

De acuerdo con ello, se proporciona un método para obtención de anticuerpos humanizados con especificidad para un antígeno seleccionado, que comprende:

- (1) proporcionar secuencias de la región  $V_H$  y/o  $V_L$  de anticuerpos donantes múltiples, cada una con especificidad para el antígeno seleccionado;
- 45 (2a) seleccionar una secuencia de la región aceptora  $V_H$  marco humana apropiada para cada secuencia donante en donde dicha selección comprende realizar una alineación de homología entre una secuencia  $V_H$  donante y secuencias de región  $V_H$  humanas y seleccionar aquellas secuencias humanas que :
  - (i) comparten identidad con la secuencia donante en al menos cinco residuos seleccionados de un grupo de seis residuos constituido por los residuos 24, 49, 71, 73, 78 y 93, numerados de acuerdo con el  
 50 sistema de numeración de Kabat; y
  - (ii) comparten identidad con la secuencia donante en al menos veintidós seleccionados del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 23, 25, 36, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 67, 69, 76, 87, 89, 91 y 94, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y/o
- 55 (2b) seleccionar una secuencia de la región aceptora  $V_L$  marco humana apropiada para cada secuencia donante en donde dicha selección comprende realizar una alineación de homología entre una secuencia  $V_L$  donante y secuencias marco  $V_L$  humanas y seleccionar aquellas secuencias humanas que:

- (i) comparten identidad con la secuencia donante en al menos dos residuos seleccionados del grupo constituido por 46, 48 y 58, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
- (ii) comparten identidad con la secuencia donante en al menos veintiún residuos seleccionados del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 6, 35, 36, 37, 38, 44, 45, 47, 49, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 85 and 87, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y/o
- (3) transferir CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 de cada anticuerpo donante a cada una de las secuencias marco humanas apropiadas seleccionadas para obtener un panel de secuencias de anticuerpos humanizados, en donde únicamente las CDRs de cada anticuerpo donante se transfieren a cada una de las secuencias marco aceptoras humanas apropiadas seleccionadas y el panel de secuencias de anticuerpo humanizados tienen todas ellas especificidad para el mismo antígeno seleccionado;
- (4) expresar cada secuencia de anticuerpo humanizado en donde únicamente las CDRs de cada anticuerpo donante han sido transferidas;
- (5) cribar las secuencias expresadas en cuanto a actividad de fijación de antígeno; y
- (6) seleccionar al menos un anticuerpo humanizado de afinidad alta.
- En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para obtención de anticuerpos humanizados con especificidad para un antígeno seleccionado que comprende:
- (1) proporcionar secuencias de la región  $V_H$  y/o  $V_L$  de anticuerpos donantes múltiples, cada una con especificidad para el antígeno seleccionado;
- (2a) seleccionar una secuencia de la región aceptora  $V_H$  marco humana apropiada para cada secuencia donante en donde dicha selección comprende realizar una alineación de homología entre la secuencia  $V_H$  donante y secuencias de la región  $V_H$  humanas y seleccionar aquellas secuencias humanas que :
- (i) comparten identidad con la secuencia donante en al menos cinco residuos seleccionados de un grupo de seis residuos constituidos por los residuos 24, 49, 71, 73, 78 y 93, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
- (ii) comparten adicionalmente identidad con la secuencia donante en al menos siete residuos seleccionados del grupo constituido por 36, 37, 39, 45, 47, 48, 76, 89, 91 y 94, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y
- (iii) comparten identidad con la secuencia donante en al menos trece residuos seleccionados del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 23, 25, 38, 41, 44, 46, 67, 69 y 87, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y/o
- (2b) seleccionar una secuencia de región aceptora  $V_L$  marco humana apropiada para cada secuencia donante en donde dicha selección comprende realizar una alineación de homología entre una secuencia  $V_L$  donante y secuencias  $V_L$  humanas, y seleccionar aquellas secuencias humanas que:
- (i) comparten identidad con la secuencia donante en al menos dos residuos seleccionados del grupo constituido por 46, 48 y 58, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
- (ii) comparten adicionalmente identidad con la secuencia donante en al menos quince residuos seleccionados del grupo constituido por 2, 6, 35, 36, 38, 44, 49, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 85 y 87, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y
- (iii) comparten identidad con la secuencia donante en al menos seis residuos seleccionados del grupo de constituido por 1, 3, 4, 37, 45, 47, 60, y 70, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
- (3) transferir al menos una CDR seleccionada de la región  $V_H$  y/o  $V_L$  de cada anticuerpo donante a cada una de las secuencias marco humanas apropiadas seleccionadas para obtener un panel de secuencias de anticuerpos humanizados;
- (4) opcionalmente, transferir uno o más de cualesquiera residuos donantes no apareados de las partes (i), (ii) y/o (iii) a las secuencias marco seleccionadas;
- (5) expresar cada secuencia de anticuerpo humanizado;
- (6) cribar las secuencias expresadas respecto a actividad de fijación de antígeno; y
- (7) seleccionar al menos un anticuerpo humanizado de afinidad alta.

Convenientemente, el panel de anticuerpos utilizado en los métodos de la invención tiene especificidad para un solo antígeno, a saber el antígeno utilizado para generar la respuesta inmune in vivo.

Después de la transferencia de CDR, los anticuerpos pueden cribarse respecto a actividad de fijación de antígeno y puede seleccionarse un anticuerpo de afinidad alta apropiado. Debe entenderse que la actividad de fijación de antígeno incluye no sólo afinidad, sino también una actividad, tal como citotoxicidad mediada por las células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), actividad de bloqueo, por ejemplo bloqueo de la fijación de ligandos, o bloqueo de la actividad del antígeno directamente, o indirectamente, por ejemplo por bloqueo de un camino aguas abajo en el cual está implicado el antígeno. Debe entenderse también que aquélla incluye actividad estimuladora, tal como estimulación de la actividad del antígeno, directa o indirectamente.

Muy preferiblemente, los métodos de la invención utilizan anticuerpos humanizados que se expresan eficientemente, expresándose por ejemplo eficientemente en *E. coli* y/o en células de mamífero. Así, cuando se selecciona un anticuerpo de afinidad alta, puede tenerse en cuenta la capacidad de dicho anticuerpo para expresarse eficientemente. De acuerdo con ello, el panel de anticuerpos humanizados puede filtrarse excluyendo aquellos anticuerpos que se expresan deficientemente.

Como se utiliza en esta memoria, 'bien expresado' incluye anticuerpos humanizados que se expresan a una concentración de al menos 250 mg a 500 mg por litro de fermentación, por ejemplo por litro de fermentación microbiana, y 500 mg a 1000 mg o más por litro de células de mamífero.

Métodos generales por los cuales pueden construirse los vectores, métodos de transfección y métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y al Maniatitis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing. Cualquier sistema adecuado célula hospedadora/vector puede utilizarse para expresión de las secuencias de DNA que codifican las moléculas de anticuerpo. Pueden utilizarse sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o pueden utilizarse también sistemas de expresión en células hospedadoras eucariotas, por ejemplo células de mamífero. Células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen CHO y NSO. Las líneas de células pueden expresar de manera transitoria o estable las moléculas de anticuerpos humanizados. Los tipos de sistemas de expresión disponibles para producir las moléculas de anticuerpo humanizados incluyen sistemas de expresión bacterianos, de levadura, de insecto y de mamífero, los métodos para los cuales son bien conocidos en la técnica (Verma *et al.*, 1998, *J. Immunol. Methods*, 216, 165-181; Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 2002, 263, 133-147).

La expresión de anticuerpos puede realizarse como se conoce generalmente en la técnica. En un ejemplo, los vectores apropiados contienen regiones constantes de cadena pesada y/o ligera o partes de los mismos tales que pueden producirse anticuerpos enteros o fragmentos de anticuerpo, tales como Fab o Fab'. Con cada  $V_L$  y/o  $V_H$  en vectores separados es posible co-transfectar fácilmente cada combinación  $V_H$  y/o  $V_L$  en células CHO. Por ejemplo, la región V puede subclonarse en los vectores de expresión pMRR10 y pMRR14 (véase, por ejemplo, WO 2004/072116). Estos son vectores separados para expresión de la cadena ligera y/o pesada respectivamente y contienen DNA genómico que codifica genes de región constante para la cadena ligera kappa y la cadena pesada gamma-4 humanas, respectivamente. Estos vectores pueden co-transfectarse luego en células CHO y producirse anticuerpos enteros por cultivo de las células CHO.

Alternativamente, cada par  $V_H$  y  $V_L$  puede expresarse en el mismo vector sea como anticuerpos enteros o como fragmentos, con inclusión de scFvs.

El término 'afinidad', como se utiliza en esta memoria, se refiere a la fuerza con la que el anticuerpo se fija al antígeno seleccionado. Los anticuerpos de afinidad alta tienen una constante de tasa de disociación baja. Los anticuerpos seleccionados utilizando los métodos de la invención tienen afinidad alta para el antígeno seleccionado. Preferiblemente, los anticuerpos de afinidad alta incluyen anticuerpos con afinidad en el intervalo nanomolar, y más preferiblemente en el intervalo picomolar. Más preferiblemente, los anticuerpos seleccionados utilizando los métodos de la invención tienen afinidad para el antígeno seleccionado en el intervalo de 1 pM, o menos, hasta 10 nM, aún más preferiblemente en el intervalo de 1 pM, o menos, hasta 500 pM, y muy preferiblemente 1 pM, o menos, hasta 200 pM.

La afinidad de un anticuerpo y la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno pueden determinarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como el análisis BIAcore o ensayos de fijación competitiva. Así, el cribado y la selección de las partes (i) y (ii) anteriores, es decir concernientes a la actividad de fijación de antígeno, pueden realizarse utilizando estos métodos. Un ejemplo de un ensayo de fijación competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno radiomarcado (v.g., 3H o 125I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno sin marcar, y la detección del anticuerpo fijado al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés para un antígeno particular y las tasas de disociación de la fijación pueden determinarse a partir de los datos por análisis de gráficas Scatchard. Preferiblemente se utiliza BIAcore para determinar la afinidad de los anticuerpos de la presente invención. BIAcore es un sistema automático de biosensores que puede utilizarse para medir interacciones moleculares (Karlsson *et al.*, 1991, *J. Immunol.*

Methods, 145, 229-240). En este método, la concentración de antígeno no necesita ser determinada exactamente en muchos casos, y es posible obtener medidas de la tasa de disociación para anticuerpos que tienen ya afinidad alta.

ADCC y CDC pueden medirse como se conoce en la técnica, por ejemplo por observación de la destrucción de células en presencia del anticuerpo de test comparado con un anticuerpo de control.

## 5 EJEMPLOS

### 1. Preparación de un panel de anticuerpos humanizados (anticuerpos injertados con CDR)

Se inmunizaron ratas con una proteína humana, antígeno X (hX) y se prepararon células B. Éstas se sometieron a SLAM y se aislaron 77 anticuerpos. Esto puede realizarse como se describe en Babcook *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 7843-7848, y WO 92/02551, con ensayos de cribado como se describe en WO2004/051268, WO2004/106377, WO2005/019823. Las CDRs de las secuencias de la región V del gen de las cadenas ligera y pesada se transfirieron a marcos humanos apropiados que se seleccionaron utilizando pesos para residuos del Nivel 1H, 2H y el Nivel 1L y 2L. A partir de un panel de 29 anticuerpos anti-hX aislados por el proceso SLAM, se seleccionaron 15 para transferencia de CDR sólo. Se obtuvieron cuatro anticuerpos de afinidad alta a partir de los 15. Para los otros 14 mAbs se realizaron injertos que contenían al menos 1 residuo donante.

La Tabla 2 indica el número de residuos apareados por realización de la alineación de homología de acuerdo con los métodos de la invención entre las secuencias de la región variable del anticuerpo de cadena pesada donante y las secuencias marco de la región variable de la cadena pesada y el anticuerpo humano de 4 anticuerpos obtenidos del panel de doce.

**Tabla 2. Identidades de los Donantes con Residuos Marco Aceptores Humanos**

Anticuerpo Anti-X	Marco	Número de Residuos		
		Nivel 1	Total de Niveles 1 & 2	Nivel 2
71b	VH3 1-3 3-07	6/6	30/32	24/26
	VK1 2-1-(1) O12	2/3	23/29	21/26
271b	VH3 1-3 3-07	6/6	28/32	22/26
	VK1 2-1-(1) O12	3/3	24/29	21/26
1160b	VH3 1-3 3-23	5/6	27/32	22/26
	VK1 2-1-(1) O12	3/3	24/29	21/26
1189	VH3 1-3 3-07	6/6	30/32	24/26
	VK1 2-1-(1) O12	2/3	24/29	22/26

### 2. Expresión de IgG humanizada (anticuerpos injertados sólo con CDR)

La secuencia de la región V del gen de la cadena ligera se sub-clonó en el vector de expresión pKH10.1 de cadena ligera humana de UCB-Celltech, que contiene DNA codificante de la región constante C-Kappa humana (alotipo Km3), expresada a partir del promotor hCMV. La secuencia de la región V de la cadena pesada se sub-clonó en el vector de expresión gamma-4 humano UCB-Celltech en el laboratorio de los inventores, pV<sub>H</sub>g4P FL, que contiene DNA codificante de la región constante gamma-4 humana que contiene la mutación bisagra estabilizadora S241P (Angal *et al.*, Mol. Immunol. 1993, 30 (1): 105-8). Este método emplea también el promotor hCMV. La co-transfección de estos plásmidos de células CHO da como resultado la expresión del anticuerpo humanizado.

### 3. Expresión de Fabs Humanizados (Fabs injertados sólo con CDR)

Se sintetizó DNA que codificaba una cadena ligera humanizada (con el alotipo Km3 de la región constante kappa), una secuencia hipergénica y una secuencia V<sub>H</sub> humanizada. Esta se sub-clonó en el vector de expresión pTTOD (Fab) de UCB-Celltech preparado en el laboratorio de los inventores, (un derivado de pTTO-1, descrito en

Popplewell *et al.*, Methods Mol. Biol. 2005; 308: 17-30) que contiene DNA codificante de la región constante CH1 gamma-1 humana. Esto dio lugar a una configuración de genes dicistrónicos constituida por el gen para la cadena ligera humanizada seguido por el gen para el fragmento Fab de cadena pesada humanizada, bajo el control del promotor tac. El plásmido de expresión recombinante se transformó en la cepa W3110 de *E. coli* en la cual la expresión es inducida por adición de IPTG. Los experimentos de expresión se realizaron inicialmente en pequeña escala (volúmenes de cultivo de 5 ml) con adición de 200  $\mu$ M IPTG a DO(600 nm) de aproximadamente 0,5, se cosecharon las células 2 horas después de la inducción y se extrajeron durante una noche a 30°C en Tris/EDTA. Se utilizaron extractos clarificados para análisis de afinidad por Biacore. Los constructos que daban rendimientos de expresión y actividades prometedoras se seleccionaron para fermentación.

#### 10 4. Ensayo Biacore para el Antígeno X Anti-Humano (Anti-X)

Se realizó un análisis Biacore (Biacore 3000; Biacore AB) de muestras Fab anti-X e IgG preparadas por transferencia sólo de CDR de CDRs de cadena pesada y ligera de la región variable de rata en regiones marco humanas. El formato de ensayo consistía en la captura de la muestra anti-X por IgG anti-X inmovilizada y titulación subsiguiente de hX en la superficie capturada.

15 Se inmovilizó IgG anti-humana de cabra Affinipure en un Chip Sensor CM5 (Flowcell 2) por química de acoplamiento de aminas a un Nivel de 6000-7000RU. Se utilizó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 al 0,005%, Biacore AB) como el tampón de desplazamiento con una tasa de flujo de 10  $\mu$ l/min para captura de la muestra anti-hX, 30  $\mu$ l/min para fijación de hX y 10  $\mu$ l/min para regeneración.

20 Se utilizó una inyección de la muestra anti-hX para dar un Nivel de captura de aproximadamente 200 RU en la IgG anti-humana inmovilizada. Se tituló X humano sobre la superficie de anti-hX capturada a varias concentraciones. Se regeneró la superficie por una inyección de 10  $\mu$ l de HCl 40 mM seguido por una inyección de 5  $\mu$ l de NaOH 5 mM. La muestra anti-hX y hX se pasaron sobre una superficie de control en blanco (Flowcell 1) antes del anti-hlgG, y el sensograma resultante era la respuesta a Flowcell 2 – la respuesta a Flowcell 1.

El sensograma para la fijación de hX se corrigió con el sensograma del tampón de control.

25 Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando software de evaluación BIA 3.2.

Las constantes de afinidad y disociación de ambas muestras anti-X Fab e IgG se presentan en las Tablas 3a y 3b, respectivamente. Los resultados muestran que a partir de un panel de 12 anticuerpos se seleccionaron 2 Fabs de afinidad alta y 2 IgGs de afinidad alta. La afinidad de estos anticuerpos es tal que los mismos pueden utilizarse como candidatos terapéuticos potenciales.

#### 30 Tabla 3a. Afinidad de los anticuerpos para las muestras del antígeno hX-Fab

Anti-hX	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	KD (pM)
<b>71b</b>	2,44E+06	1,39E-04	5,70E-11	<b>57</b>
<b>271b</b>	2,03E+06	5,14E-05	2,53E-11	<b>25</b>

#### Tabla 3b. Afinidad de los anticuerpos para las muestras del antígeno hX-IgG

Anti-hX	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	KD (pM)
<b>1160b</b>	1,53E+06	5,26E-05	3,44E-11	<b>34</b>
<b>1189</b>	2,36E+06	9,66E-05	4,09E-11	<b>41</b>

35 De los 12 injertos con CDR sólo, se seleccionaron 4 anticuerpos de afinidad alta, Las afinidades de los cuatro eran todas ellas menores que 60 pM (véanse las Tablas 2 y 3a & b anteriores).

## REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener al menos un anticuerpo humanizado con especificidad para un antígeno seleccionado que comprende:

- 5 (a) proporcionar secuencias de región  $V_H$  y/o  $V_L$  de anticuerpos donantes múltiples, cada una con especificidad para el antígeno seleccionado;
- (b) seleccionar una secuencia marco aceptora de la región  $V_H$  y/o  $V_L$  humana apropiada para cada secuencia donante, en donde la selección comprende realizar una alineación de homologías entre la secuencia  $V_H$  donante y las secuenciasceptoras de la región  $V_H$  humanas, y/o la secuencia  $V_L$  donante y las secuenciasceptoras de la región  $V_L$  humana, y seleccionar aquellas secuenciasceptoras humanas que:
- 10 (I) para  $V_H$ :
- (i) comparten identidad con la secuencia donante de al menos cinco residuos seleccionados de un grupo de seis residuos constituidos por residuos 24, 49, 71, 73, 78 y 93, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y
- 15 (ii) comparten identidad con la secuencia donante de al menos veintidós residuos seleccionados del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 23, 25, 36, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 67, 69, 76, 87, 89, 91 y 94, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
- y/o
- (II) para  $V_L$  (Kappa):
- 20 (i) comparten identidad con la secuencia donante de al menos dos residuos seleccionados del grupo constituido por 46, 48 y 58, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat; y
- (ii) comparten identidad con la secuencia donante en al menos veintiún residuos seleccionados del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 6, 35, 36, 37, 38, 44, 45, 47, 49, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 25 69, 70, 71, 85 y 87, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
- (c) transferir CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de cada anticuerpo donante a cada una de las secuencias marcoceptoras humanas apropiadas seleccionadas para obtener un panel de secuencias de anticuerpos humanizados, en donde únicamente las CDRs de cada anticuerpo donante se transfieren a cada una de las secuencias marcoceptoras humanas apropiadas seleccionadas y el panel de secuencias de anticuerpos humanizados tienen todas ellas especificidad para el mismo antígeno seleccionado;
- 30 (d) expresar las secuencias de anticuerpos humanizados en donde únicamente las CDRs de cada anticuerpo donante han sido transferidas;
- (e) cribar las secuencias expresadas respecto a actividad de fijación de antígeno; y
- 35 (f) seleccionar al menos un anticuerpo humanizado de afinidad alta.