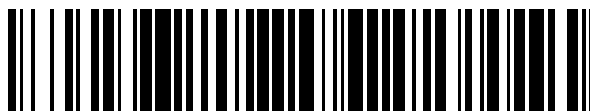


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 885**

51 Int. Cl.:

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>C07K 16/42</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 39/395</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 39/145</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 39/00</b>  | (2006.01) |
| <b>C12P 21/08</b>  | (2006.01) |
| <b>C07K 16/10</b>  | (2006.01) |

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2011 PCT/US2011/038970**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11153380**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2011 E 11790430 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2575882**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanizados y métodos de uso**

30 Prioridad:

**02.06.2010 US 350790 P**

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

**08.01.2018**

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.  
(100.0%)  
450 Brookline Avenue  
Boston, MA 02215, US**

72 Inventor/es:

**SUI, JIANHUA;  
AVNIR, YUVAL y  
MARASCO, WAYNE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 648 885 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales humanizados y métodos de uso

## 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere generalmente a anticuerpos humanizados anti VH 1-69 humano así como a los métodos de uso de los mismos para aumentar la respuesta inmune a la infección microbiana.

## 10 Antecedentes de la invención

Una pandemia de gripe representa una de las mayores amenazas infecciosas agudas para la salud humana. La pandemia de gripe de 1918-1919 causó aproximadamente 500.000 muertes en los Estados Unidos, por lo que es el evento más fatal en toda la historia de los Estados Unidos. La propagación de la gripe aviar altamente patógena (HPAI) gripe H5N1 en Asia y ahora en Medio Oriente y el norte de África crea un riesgo sustancial para que surja una nueva pandemia.

La variación natural así como los mutantes de escape sugieren que la evolución continua del virus debería afectar la decisión sobre qué cepa(s) debe(n) usarse para la inmunización pasiva y activa. Aunque se han reportado un número importante de estudios de escape de neutralización y mapeo de epítomos, se necesitan nuevos anticuerpos neutralizantes y estudios estructurales relacionados para desarrollar estrategias de inmunización para desarrollar una "vacuna universal" contra una amplia variedad de virus de la gripe del Grupo 1. Los desafíos para desarrollar una vacuna protectora contra la gripe del Grupo 1 son formidables y se necesitan nuevos enfoques para prevenir y tratar la infección humana por un enemigo en constante cambio. Existe una necesidad de desarrollar rápidamente estrategias terapéuticas para obtener la inmunidad protectora del huésped, tanto pasiva como activamente. El documento de patente núm. WO 2007/035857 describe el tratamiento de enfermedades de células B que usan agentes de unión anti anticuerpo de la línea germinal. Corti, D. y otros, J Clin Invest.2010; 120(5):1663-73 describe anticuerpos neutralizantes heterosubtípicos producidos por individuos inmunizados con una vacuna contra la gripe estacional.

## 30 Resumen de la invención

La invención se define de conformidad con las reivindicaciones adjuntas y se basa en el descubrimiento de anticuerpos monoclonales que se unen al gen VH1-69 de la línea germinal en la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina humana. El anticuerpo monoclonal es completamente humano. En varios aspectos, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo bivalente, un anticuerpo monovalente, un anticuerpo monocatenario o fragmento de este. Los anticuerpos monoclonales ilustrativos incluyen un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal murino G6.

Los anticuerpos monoclonales pueden tener una afinidad de unión que es 1 nM o menos.

El anticuerpo monoclonal tiene una secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada que contiene la sec. con. núms. de ident.:2 o 12, y/o una secuencia de aminoácidos variable de cadena ligera que contiene la sec. con. núm. de ident.:4. El anticuerpo monoclonal tiene una secuencia de ácido nucleico variable de cadena pesada que contiene la sec. con. núms. de ident.:1 u 11, y/o una secuencia de ácido nucleico variable de cadena ligera que contiene la sec. con. núm. de ident.:3.

Se describe además un anticuerpo monoclonal o fragmento de este con el gen VH1-69 de la línea germinal en la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, donde el anticuerpo tiene un CDRH1:GYTFTSYW (sec. con. núm. de ident.: 5); CDRH2:VSPGNSDT (sec. con. núm. de ident.: 6); y CDRH3:TRSRYGNNALDY (sec. con. núm. de ident.: 7) y un CDRL1:QGISSNIWW (sec. con. núm. de ident.: 8); CDRL2:HGT (sec. con. núm. de ident.: 9); y CDRL3:VQYSQFPPT (sec. con. núm. de ident.: 10).

En algunos aspectos, el anticuerpo de conformidad con la invención se une covalentemente a un antígeno. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo monocatenario y el antígeno es la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe.

Se describen además los métodos para aumentar la respuesta inmune de un sujeto a un antígeno mediante la administración al sujeto de un anticuerpo idiotipo anti gen de la línea germinal en la región variable de inmunoglobulina y un inmunógeno capaz de inducir una reacción inmune al antígeno. En algunos aspectos, el anticuerpo se enlaza covalentemente al antígeno. El gen de la línea germinal codifica para un polipéptido de cadena ligera o un polipéptido de cadena pesada. Preferentemente, el gen de la línea germinal de la región variable es VH1-69. El antígeno es un virus, una bacteria o un hongo. Por ejemplo, el virus es un virus de la gripe. Preferentemente, el inmunógeno es la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe o fragmento de este. Con preferencia superlativa, el inmunógeno contiene la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe. El anticuerpo puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración del inmunógeno.

- A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen más abajo. En caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción, que incluye las definiciones. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.
- Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.
- Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 muestra el modelo de homología de la cadena pesada (VH) del anticuerpo G6 de ratón y la cadena ligera (VL) generada usando el modelado de anticuerpos Web (WAM). VH de color azul y VL de color verde con las CDR resaltadas en rojo.
- La Figura 2 muestra la comparación de la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos huG6.1 y mG6.
- La Figura 3 muestra el modelo de homología de VH y VL del anticuerpo G6.1 humano. a), modelo de anticuerpo G6.1 humano, VH en azul y VL en verde con las CDR en rojo. b), el modelo de homología de G6.1 humano después de la minimización de la energía del campo de fuerza GROMOS, visualizado en el programa DeepView, se resaltan en diferentes colores, los residuos que exhiben geometría distorsionada o choques estéricos.
- La Figura 4 muestra los residuos con geometría distorsionada y choques estéricos entre los residuos dentro de las regiones marco, así como entre los residuos marco y CDR usando el programa Pymol.
- La Figura 5 muestra la comparación de la actividad de unión a antígeno de scFv-Fc de huG6.2 y de mG6.
- La Figura 6 es un análisis de unión de Interferometría Bio-Capa en tiempo real de HuG6.2 (Rojo) y G6 de ratón (Azul) al scFv-Fc de D80 biotinilado.
- La Figura 7 es un análisis de unión en Interferometría Bio-Capa en tiempo real de HuG6.2 y HuG6.3 (mutante Thr73Lys) al scFv-Fc de D80 biotinilado.
- La Figura 8 muestra la unión de los anticuerpos anti-H5 endógeno a H5 mediante ELISA de competición. Se mezclaron 3 ng de anticuerpos purificados F10 biotinilados (Bio-F10) con cada muestra de suero en diversas diluciones y se añadieron a placas revestidas con H5 (H5-VN04), se lavaron y se siguieron incubaciones con HRP-estreptavidina para detectar F10 biotinilado unido a H5. La mayoría de las muestras de suero, excepto la núm. 8, muestran la capacidad de inhibir la unión de Bio-F10 a H5, lo que indica la presencia de anticuerpos anti-H5 endógenos en muestras de suero de individuos sanos.
- La Figura 9 muestra la unión de anticuerpos anti-H5 endógenos a H5 mediante ELISA de competición. Se mezclaron los anticuerpos purificados biotinilados-F10 (Bio-F10) con muestras de suero obtenidas antes o después de la vacunación de individuos sanos con H5N1. La mezcla se añadió a placas revestidas con H5 (H5-VN04), se lavaron y se siguió por incubación con HRP-estreptavidina para detectar F10 biotinilado unido a H5. La mayoría de las muestras de suero prevacunadas muestran la capacidad de inhibir la unión de Bio-F10 a H5, lo que indica la presencia de anticuerpos anti-H5 endógenos en los individuos sanos. La vacunación con H5N1 refuerza la producción de anticuerpos anti-H5 en todos los individuos. El efecto del refuerzo es más fuerte en los individuos con menor cantidad de anticuerpos anti-H5 endógenos.
- La Figura 10 muestra la unión *in vitro* de fracciones anti-H5 eluidas con ácido y eluidas con F10 biotinilado (Bio-F10) a partir de muestras de inmunoglobulina intravenosa (IVIG). Se evaluaron anticuerpos F10 purificados, fracciones anti-H5 eluidas con ácido y eluidas con F10 biotinilado (Bio-F10) a varias concentraciones para determinar la unión a varios HA revestidos en una placa de ELISA.(A) Tanto las fracciones eluidas con ácido como las eluidas con Bio-F10 reconocen H1-NY18 como lo hacen los anticuerpos de control F10.(B) Tanto las fracciones eluidas con ácido como las eluidas con Bio-F10 reconocen a H5-VN04 como lo hacen los anticuerpos de control F10.(C) Solo el control H3M3 y la fracción eluida con ácido reconocen H3-BR07, pero no la fracción eluida con Bio-F10.(D) A diferencia del anticuerpo de control anti-H7, la fracción eluida con ácido solo se une a H7-NL219 a alta concentración, y la fracción eluida con Bio-F10 no reconoce H7-NL219.
- La Figura 11 muestra el análisis FACS de varias fracciones de eluato anti-H5 que se unen a H1, H2, H5 (Grupo H1a); y H8 (Grupo H9). Se transfectaron transitoriamente células 293T con diferentes plásmidos que expresan HA, y se analizó la unión del anticuerpo a las células mediante FACS. El anticuerpo 80R específico a H5 es el control negativo y el anticuerpo F10 con especificidad más amplia es el control positivo. Tanto la fracción eluida con ácido como la fracción

anti-H5 de Bio-F10 pueden unirse a H1, H2 y H5.No muestran mucha diferencia en la unión a H1, H2 y H5. Las designaciones de cepa viral completa son: H1-SC1918 (A/Carolina del Sur/1/1918 (H1N1)), H2-JP57 (A/Japón/305/57 (H2N2)), HS-TH04 (A/Tailandia/2-SP-33/2004 (HSN1)); H8-ON68 (A/ Turquía/Ontario/6118/68).

5 La Figura 12 muestra la neutralización *in vitro* de varias fracciones de eluato anti-H5. Se evaluaron anticuerpos F10 purificados, fracciones anti-H5 eluidas con ácido y eluidas con F10 biotinilado (Bio-F10) a varias concentraciones para neutralizar la actividad contra el virus de la gripe del individuo. El anticuerpo 80R específico a H5 es el control negativo y el anticuerpo F10 con especificidad más amplia es el control positivo.(A) Tanto las fracciones eluidas con ácido como las eluidas con Bio-F10 pueden neutralizar H1-SC1918.(B) Ni las fracciones eluidas con ácido ni las eluidas con Bio-F10 pueden neutralizar H2-JP57.(C) Tanto las fracciones eluidas con ácido como las eluidas con Bio-F10 pueden neutralizar H5-TH04.(D) Tanto las fracciones eluidas con ácido como las eluidas con Bio-F10 pueden neutralizar H6-NY98 [H6-NY98 (A/Pollo/Nueva York/14677-13/1998 (H6N2))].

15 La Figura 13 muestra los principales codones de nucleótidos de la línea germinal que distinguen las diferentes variantes del gen VH1-69. Entre 13 alelos, los alelos \*01, \*03, \*05, \*06, \*12, y \*13 se relacionan con 51p1.

20 La Figura 14 muestra la distribución de los anticuerpos que se aislaron mediante el uso de G6 para formar un molde contra la biblioteca no inmune Mehta I/II.(A) 84% de los anticuerpos que se unieron a G6 fueron IGHV1-69 y se componen principalmente por los alelos \*01 y \*05 que codifican la Phe55 crítica (Figura 6) que se inserta en el bolsillo hidrofóbico en el tallo HA (Sui, NSMB '09). Estos datos sugieren que este antiidiotipo solo reconoce los alelos 51p1 pero no los alelos hv1263.(B) El surtido aleatorio de cadenas VL indica que el idiotipo G6 solo se expresa en VH pero no en VL.

25 La Figura 15 muestra el número de mutaciones somáticas de los anticuerpos codificados VH-69 que se unen a G6.

30 La Figura 16 muestra la gráfica de frecuencia de los diferentes aminoácidos que se encontraron en cada una de las posiciones del Abs codificado VH1-69 que se une a G6. El marco con bordes sólidos indica la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) y el marco con bordes discontinuos indica el CDR2. Tenga en cuenta que existe mucha menos variabilidad de aminoácidos críticos que son aminoácidos de contacto importantes para la unión a HA, como la GGT en HCDR1 y Phe55 en CDR2.

35 La Figura 17 muestra motivos basados en WRCY Deaminasa inducida por activación (AID) en VH1-69. El marco con bordes sólidos indica la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) y el marco con bordes discontinuos indica el CDR2. Los datos muestran que existe una escasez de motivos WRCY en las mismas regiones que se necesitan para mutar que permiten la rotación de Phe55 que se inserta en el bolsillo hidrofóbico (que se muestra en las figuras más abajo).

40 La Figura 18 muestra la unión *in vitro* de anticuerpos anti-H5. Seis BnAb anti-H5 se evaluaron para la unión a mAb de ratón antiidiotípico G6. Solo D8 muestra unión positiva a G6.

La Figura 19 muestra la unión *in vitro* de VH1-69/F10 a G6. (A) El dibujo ilustra los dominios principales de F10 y los dominios de la construcción quimérica VH1-69/F10. (B) VH1-69/F10 puede unirse a G6, pero no puede a F10. Estos datos confirman que el idiotipo G6 se localiza en el segmento Vh.

45 La Figura 20 muestra esquemas de diferentes construcciones F10 quiméricas y sus capacidades de unión a H5. La sustitución de Pro con Ala fuera del dominio de unión aumenta la unión a H5 (++++). Sin embargo, la unión se pierde completamente cuando el CDR2 se sustituye con su forma de la línea germinal. La introducción de Ser de nuevo a la secuencia recupera el 90% de la unión. La sustitución de las regiones marco (FR) con la forma de la línea germinal además disminuye la unión. La restauración de algunos residuos de unión clave en el fondo de la línea germinal rescata su capacidad de unión.

#### Descripción detallada

55 La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales humanizados específicos contra el gen VH1-69 de la línea germinal en la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina humana. En particular, la descripción proporciona un anticuerpo G6 humanizado anti-idiotipo VH1-69 humano (referido en la presente descripción como huG6).Más específicamente, la descripción proporciona un método para aumentar una respuesta inmune a un antígeno al enfocar una respuesta inmune a un gen de la línea germinal en la región variable humana en combinación con la estimulación antigénica.

60 Específicamente, esta invención se basa en un trabajo previo en el que se identificaron los mAb antihemaglutinina humana de alta afinidad, de subtipo cruzado, ampliamente neutralizante.(Ver, documento de patente núm., WO 2009/086514). Se usó una biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos humanos y ectodominio de hemaglutinina (HA) H5 para seleccionar diez mAb neutralizantes (nAb) con un intervalo notablemente amplio entre los virus de gripe de Grupo 1, que incluyen cepas de HSN1 "gripe aviar" y H1N1 "gripe española" y "gripe porcina". Estos nAb inhiben el

proceso de fusión posterior a la unión al reconocer un epítipo neutralizante novedoso y altamente conservado (denominado en la presente descripción el epítipo F10) dentro de la región del tallo en un punto donde los elementos claves del cambio conformacional - el péptido de fusión y la superficie expuesta de la hélice  $\alpha A$  - se ponen en aposición cercana.

5 Sorprendentemente, estos nAb aislados utilizan el mismo gen de la línea germinal VH, IGHV1-69\*01, y codifican un bucle CDR3 que contiene una tirosina en una posición equivalente a Y102, de una biblioteca no inmune. Esto indicó que preexiste una amplia inmunidad cruzada anti-HA en la población virgen H5. El uso recurrente de este segmento VH de la línea germinal, la comunidad de la tirosina de CDR3 introducida a través de la inserción de N y/o el ensamblaje del gen D de la línea germinal, y el uso promiscuo de los genes VL por los nAb descubiertos indican que la frecuencia precursora de los segmentos VH reorganizados que podría reconocer este epítipo es significativo. Esto indica que con una exposición adecuada al epítipo F10, estos nAb de amplio espectro pueden inducirse fácilmente *in vivo*.

15 La hemaglutinina del virus de la gripe tiene funciones esenciales para el inicio de la infección por el virus de la gripe e involucra dos regiones estructuralmente distintas, la cabeza globular y la región del tallo. La región de la cabeza globular contiene los principales determinantes antigénicos en los que surgen las mutaciones antigénicas. Sin embargo, se conserva la región del tallo. Así, el hallazgo de estos mAb antihemaglutinina humana de neutralización amplia sugiere que con una estimulación antigénica adecuada, los seres humanos son capaces de provocar una amplia respuesta neutralizante antigripe.

20 Los anticuerpos antiidiotipo (denominados Ab2) son anticuerpos dirigidos contra la región variable (sitio de unión a antígeno) de otro anticuerpo (Ab1), el idiotipo. A su vez, la inmunización con anticuerpos Ab2 puede inducir anticuerpos con especificidades similares a los anticuerpos originales. En la presente invención, se propone inmunizar con un anticuerpo antiidiotípico que es específico para el gen de la línea germinal en la región variable de inmunoglobulina para estimular clonotípicamente una respuesta inmune del gen de la línea germinal. Esto, de hecho, preparará el sistema inmune activando las células B específicas del gen de la línea germinal.

25 Por consiguiente, se describe en la presente descripción un método para aumentar una respuesta inmune en un sujeto a un antígeno administrando al sujeto un anticuerpo antiidiotipo del gen de la línea germinal en la región variable de inmunoglobulina y un inmunógeno capaz de inducir una reacción inmune al antígeno. Por ejemplo, el gen de la línea germinal en la región variable es VH1-69.

35 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a la proteína de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina humana codificada por el gen de la línea germinal VH1-69. El anticuerpo huG6 es monovalente o bivalente y comprende una cadena simple o doble. Funcionalmente, la afinidad de unión del anticuerpo huG6 es menor que 250 nM, menor que 1 00 nM, menor que 1 0 nM, menor que 1 nM o menor que 100 pM. Preferentemente, la afinidad de unión está dentro de un intervalo de 100 pM - 1nM. La secuencia del anticuerpo se modifica genéticamente y, así, puede comprender una o más regiones de unión a antígeno del anticuerpo murino G6. El anticuerpo huG6 se une al mismo epítipo que el Mab G6 murino. Además, el anticuerpo comprende un inmunógeno (es decir, antígeno) que incluye, pero no se limita a, la proteína de hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe o fragmento de esta. Por ejemplo, el inmunógeno comprende la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe.

45 El anticuerpo monocatenario G6 (muG6) murino (1567) se construyó a partir del clon de células de hibridoma G6. Tras la clonación, se descubrió que el hibridoma G6 codificó tres genes diferentes de cadena ligera variable. Todas las cadenas ligeras fueron Vk. Las secuencias de aminoácido y ácido nucleico de VH y VL de G6 murino son las siguientes:

Secuencia de nucleótido VH de muG6:(sec. con núm. de ident.: 13)

50 CAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGGACTGTGCTCGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCTTGCAAGGCTTCT  
GGCTACACCTTTTACCAGTTACTGGATGCACTGGGTAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATPGGCGCT  
GTTTCTCCTGGAAATAGTGATACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGTCACATCC  
ACCAGCACTGCCTACATGGAGTTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAAGTCGA  
TATGGTAACAATGCTTTGGACTACTGGGGCAAGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA

55 Secuencia de aminoácido VH de muG6:(sec. con núm. de ident.: 14)

QVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWVHVKQRPGGLEWIGAVSPGNSDTSYNQKFKGKATLTAVTS  
TSTAYMEFSSLTNEEDSAVYYCTRSRYGNALDYWGQGTIVTVSS

60 Secuencia de nucleótido VL de muG6 -19:(sec. con núm. de ident.: 15)

GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATAACAGGGCC  
AGCAAAAGTGTACAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTC  
CTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC  
ACCCTCAACATCCATCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTGACACATTAAGGAGCTTACACG  
65 TTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

## ES 2 648 885 T3

Secuencia de nucleótido V<sub>L</sub> de muG6 -30:(sec. con núm. de ident.:16)

5 GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGAGCC  
AGCGCAAGTGTGATAATATAGGCATTAGTTTTATGAACCTGGTTCCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC  
CTCATCTATGCTGCATCCAACCAAGGATCCGGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGCCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC  
AGCCTCAACATCCATCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAACCTATTACTGTGACACATTAaggGAGCTTACACG  
TTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

Secuencia de nucleótido V<sub>L</sub> de muG6 -39:(sec. con núm. de ident.: 17)

10 GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAGTCAACATCACTTGCCGTGCA  
AGTCAGGGCATTAGCAGTAATATAGTGTGGTGCAGCAGAAACCAGGGAAGTCATTTAAGGGCCTGATCTATCAT  
GGGACCAATTTGGAAGATGGAGTTCATCAAGGTTTCACTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATC  
AGCAGCTGGAATCTGAGGATTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATTCTCAGTTTCTCCACGTTCCGGCTCG  
15 GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

Secuencia de aminoácido V<sub>L</sub> de muG6:(sec. con núm. de ident.:18)

20 DIELTQSPSSMSVSLGDTVNITCRASQGISSNIVWLQQKPKGSKGLIYHGTNLEDGVPSRFRSGSGGADYSLTI  
SSLESEDFADYYCVQYSQFPPTFGSGTKLELK

25 Las CDR de cadena pesada del anticuerpo huG6 tienen las siguientes secuencias:CDRH1:GYTFTSYW (sec. con núm. de ident.: 5); CDRH2:VSPGNSDT (sec. con núm. de ident.: 6); y CDRH3:TRSRYGNNALDY (sec. con núm. de ident.: 7). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo huG6 tienen las siguientes secuencias:CDR1:QGISSNIVW (sec. con núm. de ident.: 8); CDRL2:HGT (sec. con núm. de ident.: 9); y CDRL3:VQYSQFPPT (sec. con núm. de ident.: 10). Las secuencias de nucleótidos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se optimizaron para el uso de codones de mamíferos.

Secuencia de nucleótido V<sub>H</sub> de huG6.2:(sec. con núm. de ident.:1)

30 CAGGTCAGCTCGTCCAGTCCGGCGCTGAAGTGGTGAACCCGGGGCATCCGTCAAAGTCTCTTGTAAGGCTAGT  
GGCTACACCTTCACATCCTACTGGATGCATTGGGTGAAACAGGCACCTGGCCAGGGACTCGAATGGATCGGAGCC  
GTGTCTCCTGGAAATTCGACACCTCCTACAACGAAAAATTCAGGGCAAGGCAACCCTCACTGTGGATACTAGT  
GCTTCTACCGCTTACATGGAATCTCATCTCTCCGCTCTGAGGACACTGCCGTCTACTACTGTACTCGGTACCGA  
35 TACGGGAACAACGCTCTCGATTACTGGGGACAGGGCACACTGGTCACTGTCTCT

Secuencia de aminoácido V<sub>H</sub> de huG6.2:(sec. con núm. de ident.:2)

40 QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGAVSPGNSDTSYNEKFKGKATLTVD  
ASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSRYGNNALDYWGQGLVTVS

Secuencia de nucleótido V<sub>L</sub> de huG6.2 y V<sub>L</sub> huG6.3:(sec. con núm. de ident.: 3)

45 GATATTCAGCTCACACAGAGCCCATCTTCTCTGTCTGCTTCTGTGGGCGATCGAGTGACAATCACTTGTGGGCT  
AGTCAGGGCATTCTAGCAACATTGTGTGGTCCAGCAGAAACCTGGCAAAGCCCCAAAAGGCCTCATCTACCAC  
GGAACCAACCTGGAATCTGGCGTGCCATCTCGGTTTAGTGGATCTGGATCCGGGACCGATTACACACTCACCATC  
TCTTCACTGGAACCTGAGGATTTGCCACCTACTACTGTGTCCAGTACTCCAGTTTCCACCCACTTTTGGACAG  
GGAACCAACTCGAGATCAA

Secuencia de aminoácido V<sub>L</sub> de huG6.2 y V<sub>L</sub> de huG6.3:(sec. con núm. de ident.:4)

50 DIQLTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISSNIVWLQQKPKKAPKGLIYHGTNLESVPSRFRSGSGSDTYTLTI  
SSLEPEDFATYYCVQYSQFPPTFGQGTKLEIK

Secuencia de nucleótido V<sub>H</sub> de huG6.3:(sec. con núm. de ident.: 11)

55 CAGGTCAGCTCGTCCAGTCCGGCGCTGAAGTGGTGAACCCGGGGCATCCGTCAAAGTCTCTTGTAAGGCTAGT  
GGCTACACCTTCACATCCTACTGGATGCATTGGGTGAAACAGGCACCTGGCCAGGGACTCGAATGGATCGGAGCC  
GTGTCTCCTGGAAATTCGACACCTCCTACAACGAAAAATTCAGGGCAAGGCAACCCTCACTGTGGACAAATCT  
GCCTTACCGCTTACATGGAATCTCATCTCTCCGCTCTGAGGATACTGTGTGTACTACTGTACCCGGTACCGA  
60 TACGGCAATAACGCCCTCGATTACTGGGGCAGGGAACCTCTGGTCACTGTGTCT

Secuencia de aminoácido V<sub>H</sub> de huG6.3:(sec. con núm. de ident.: 12)

65 QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGAVSPGNSDTSYNEKFKGKATLTVD  
ASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSRYGNNALDYWGQGLVTVS

## Anticuerpos

Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen (inmunoreacciona con) específicamente a un antígeno. Por "se une específicamente" o "inmunorreacciona con" se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos. Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a policlona, monoclonal, quimérico, dAb (anticuerpo de dominio), monocatenarios, fragmentos,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$  y  $F_{(ab)2}$ , los scFv, y bibliotecas de expresión  $F_{ab}$ .

Una molécula de polipéptido Fv de cadena simple ("scFv") es un heterodímero  $V_H::V_L$  covalentemente enlazado, que puede expresarse a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican  $V_H$  y  $V_L$  enlazados mediante un enlazador que codifica un péptido. (Ver Huston y otros (1988) Proc Nat Acad Sci USA 85(16):5879-5883). Se han descrito un número de métodos para discernir estructuras químicas para convertir las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas, naturalmente agregadas, pero químicamente separadas, de una región V de anticuerpo en una molécula scFv, que se pliega en una estructura tridimensional esencialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos núms. 5,091,513; 5,132,405; y 4,946,778.

Se han creado y pueden crearse bibliotecas de scFv humanas vírgenes muy grandes para ofrecer una gran fuente de genes de anticuerpos reorganizados frente a una plétora de moléculas objetivo. Pueden construirse bibliotecas más pequeñas a partir de individuos con enfermedades infecciosas para aislar anticuerpos específicos de la enfermedad. (Ver Barbas y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43 (1992); Zebedee y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3175-79 (1992)).

En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas de seres humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, tales como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, y otros. Además, en los humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda. El término "sitio de unión a antígeno" o "porción de unión" se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno se forma por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales ("V") de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas "regiones hipervariables", se interponen entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones marco" o "FR". Así, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en las inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se disponen una respecto de la otra en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones determinantes de complementariedad," o "CDR". Específicamente, las CDR de las cadenas pesadas de anticuerpo se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente. De manera similar, las CDR de las cadenas ligeras de anticuerpo se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente.

Un idiotipo es la variación genéticamente determinada de estructuras intramoleculares en las regiones variables de inmunoglobulinas. Sin embargo, la variación del idiotipo implica la secuencia de aminoácidos y la estructura de la proteína (los llamados determinantes) especialmente en el área del sitio de unión al antígeno, también denominado "idiotipo". El término "idiotipo" designa el conjunto completo de determinantes de una región variable de una molécula de anticuerpo.

Puede generarse un anticuerpo antiidiotipo con un proceso que usa un anticuerpo monoclonal humano purificado o una línea celular de hibridoma humano que expresa un anticuerpo monoclonal humano. Por ejemplo, un proceso para la generación de un anticuerpo antiidiotipo puede implicar cultivar una línea celular de hibridoma humano que segrega un anticuerpo monoclonal humano en su sobrenadante y purificar este anticuerpo, por ejemplo, por medio del uso de cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel o una de sus combinaciones. Este anticuerpo monoclonal humano purificado puede usarse después para inmunizar un mamífero no humano, tal como un ratón o una rata, por medio de, por ejemplo, de una inyección intraperitoneal o in vitro directamente sobre linfocitos B aislados. Después pueden aislarse linfocitos B del mamífero no humano sacrificado hasta cuatro días después de la última inmunización, y los linfocitos B aislados pueden ponerse en contacto con células de mieloma de la misma especie (por ejemplo, ratón o rata) en condiciones que conducen a la fusión de las células de mieloma con los linfocitos B para generar una célula de hibridoma no humana. Estas células de hibridoma no humanas pueden después cultivarse y analizarse (por ejemplo, por medio de ELISA) para la expresión de anticuerpos Ig idiotipo, por ejemplo, anticuerpos IgM, IgA o IgG, después de, por ejemplo, tres semanas de cultivo. Estos anticuerpos Ig pueden probarse para determinar la unión específica a las células de hibridoma humano y a diversos anticuerpos, que incluyen el anticuerpo monoclonal humano usado para inmunizar al mamífero no humano.

Como se usa en la presente descripción, el término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de la unión específica a una inmunoglobulina, un scFv, o un receptor de células T. Los determinantes epitípicos por lo

general consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y por lo general tienen características específicas de estructura tridimensional, así como las características específicas de carga. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos contra péptidos N-terminales o C-terminales de un polipéptido.

5 Como se usa en la presente descripción, los términos "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológicas" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica puede expresarse en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, en donde una  $K_d$  más pequeña representa una afinidad mayor. Las propiedades de unión inmunológica de los polipéptidos seleccionados pueden cuantificarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de tales métodos implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo de unión a antígeno/sitio antígeno, en donde esas velocidades dependen de las concentraciones de las parejas complejas, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que igualmente influyen en la velocidad en ambas direcciones. Así, tanto la "constante de velocidad de asociación" ( $K_{on}$ ) como la "constante de velocidad de disociación" ( $K_{off}$ ) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Ver Nature 361:186-87 (1993)). La relación de  $K_{off}/K_{on}$  permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación  $K_d$ . (Ver, en general, Davies y otros (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un epítipo cuando la constante de unión en equilibrio ( $K_d$ ) es  $\leq 1 \mu\text{M}$ , preferentemente  $\leq 100 \text{ nM}$ , con mayor preferencia  $\leq 10 \text{ nM}$ , y con preferencia superlativa  $\leq 100 \text{ pM}$  a aproximadamente de  $1 \text{ pM}$ , según lo medido por ensayos tales como ensayos de unión de radioligando o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

25 Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin una experimentación excesiva, si un anticuerpo monoclonal humano tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal de la invención al determinar si el primero impide que este último se una a un polipéptido de la región variable de inmunoglobulina humana. Si el anticuerpo monoclonal humano que se prueba compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, como se muestra por una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal de la invención, entonces es probable que los dos anticuerpos monoclonales se unan al mismo, o a un epítipo íntimamente relacionado.

30 Pueden usarse varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra una proteína de la descripción, o contra derivados, fragmentos, homólogos análogos u ortólogos de estos. (Ver, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

35 Los anticuerpos pueden purificarse mediante técnicas bien conocidas, tales como la cromatografía de afinidad que usa la proteína A o la proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del suero inmune. Posteriormente, o alternativamente, el antígeno específico que es el objetivo de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo de este, puede inmovilizarse en una columna para purificar el anticuerpo inmune específico mediante cromatografía de inmunoafinidad. La purificación de inmunoglobulinas se discute, por ejemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia PA, Vol. 14, Núm. 8 (abril 17, 2000), págs. 25-28).

45 El término "anticuerpo monoclonal" o "MAB" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente descripción, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto único de gen de cadena ligera y un producto génico de cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los MAB contienen un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por él.

50 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando los métodos del hibridoma tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal huésped adecuado, típicamente se inmuniza con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

55 El agente inmunizante típicamente incluirá el antígeno de proteína, un fragmento de este o una proteína de fusión de este. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de nódulo linfático si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103).  
60 Las líneas celulares inmortalizadas por lo general son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Por lo general, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de



cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

5 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficiente, soportan una expresión estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Centro de Distribución de Células del Instituto Salk, San Diego, California y la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia. Se han descrito además líneas celulares de mieloma humano y heteromioma humano ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur y otros, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63)).

15 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede analizarse después para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal.Biochem., 107:220 (1980). Además, en aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales, es importante identificar anticuerpos que tengan un alto grado de especificidad y una alta afinidad de unión por el antígeno objetivo.

20 Después de que se identifican las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecer mediante métodos estándar. (Ver Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

25 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

30 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse además por métodos de ADN recombinante, tales como se describen en la patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención pueden aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, los cuales se transfectan después en las células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de cualquier otra forma no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN puede modificarse además, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Ver la Patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. Un polipéptido no inmunoglobulínico de ese tipo puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

35 Los anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpos en las que la secuencia completa tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluidas las CDR, surge de genes humanos. Tales anticuerpos se denominan "anticuerpos humanizados", "anticuerpos humanos", o "anticuerpos completamente humanos" en la presente descripción. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos usando la técnica de trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (Ver Kozbor, y otros, 1983 Immunol Today 4: 72); y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Ver Cole, y otros, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos y pueden producirse usando hibridomas humanos (Ver Cote, y otros, 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con Virus de Epstein Barr *in vitro* (Ver Cole, y otros, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

40 Además, los anticuerpos humanos pueden producirse además usando técnicas adicionales, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos. (Ver Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y otros, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). De manera similar, los anticuerpos humanos pueden hacerse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluido el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos núms.

5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en Marks y otros, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg y otros, *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild y otros, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern.Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

5 Los anticuerpos humanos pueden producirse adicionalmente usando animales transgénicos no humanos que se modifican para producir anticuerpos completamente humanos en lugar de los anticuerpos endógenos del animal en respuesta a la exposición por un antígeno. (Ver publicación PCT de documento de patente núm. WO94/02602). Los genes endógenos que codifican las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina en el huésped no humano han sido incapacitados, y los loci activos que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humana se insertan en el genoma del huésped. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, usando cromosomas artificiales de levadura que contienen los segmentos de ADN humano requeridos. Un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas se obtiene después como progenie cruzando animales intermedios transgénicos que contienen menos que el complemento completo de las modificaciones. El animal no humano preferido de este tipo es un ratón, y se denomina Xenomouse™ como se describe en publicaciones PCT de documento de patente núm. WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Los anticuerpos pueden obtenerse directamente del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, una preparación de un anticuerpo policlonal, o alternativamente de células B inmortalizadas derivadas del animal, tales como hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Además, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o pueden modificarse adicionalmente para obtener análogos de anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas Fv de cadena simple (scFv).

Un ejemplo de un método para producir un huésped no humano, ejemplificado como un ratón, que carece de expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena se describe en la Patente de los Estados Unidos núm. 5.939.598. Puede obtenerse mediante un método, que incluye eliminar los genes del segmento J de al menos un locus de cadena pesada endógeno en una célula madre embrionaria para prevenir la reordenación del locus y evitar la formación de una transcripción de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada, la eliminación se efectúa mediante un vector de direccionamiento que contiene un gen que codifica un marcador seleccionable; y que produce a partir de la célula madre embrionaria un ratón transgénico cuyas células somáticas y germinales contienen el gen que codifica el marcador seleccionable.

Un método para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, se describe en la Patente de los Estados Unidos núm. 5.916.771. Este método incluye introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada en una célula huésped de mamífero en cultivo, introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera en otra célula huésped de mamífero y fusionar las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena ligera.

En una mejora adicional de este procedimiento, un método para identificar un epítipo clínicamente relevante en un inmunógeno, y un método correlativo para seleccionar un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al epítipo relevante con alta afinidad, se describen en publicación PCT documento de patente núm. WO 99/53049.

El anticuerpo puede expresarse mediante un vector que contiene un segmento de ADN que codifica el anticuerpo monocatenario descrito anteriormente.

Estos pueden incluir vectores, liposomas, ADN desnudo, ADN asistido por adyuvante, pistola de genes, catéteres, etc. Los vectores incluyen conjugados químicos tales como los descritos en documento de patente núm. WO 93/64701, que tiene una porción de direccionamiento (por ejemplo un ligando a un receptor de superficie celular) y una porción de unión a ácido nucleico (por ejemplo polilisina), vector viral (por ejemplo un vector viral de ADN o ARN), proteínas de fusión tales como las descritas en documento de patente núm. PCT/US 95/02140 (documento de patente WO 95/22618) que es una proteína de fusión que contiene una porción objetivo (por ejemplo un anticuerpo específico para una célula objetivo) y una porción de unión a ácido nucleico (por ejemplo una protamina), plásmidos, fago, etc. Los vectores pueden ser cromosómicos, no cromosómicos o sintéticos.

Los vectores preferidos incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina moloney. Se prefieren los vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores pox tales como vectores ortopox o avipox, vectores herpesvirus tales como un vector del virus del herpes simple (Ver Geller, A. I. y otros, *J. Neurochem.* 64:487 (1995); Lim, F., y otros, en *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford Inglaterra) (1995); Geller, A. I. y otros, *Proc Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 90:7603 (1993); Geller, A. I., y otros, *Proc Natl. Acad. Sci USA* 87:1149 (1990), Vectores de Adenovirus (Ver LeGal LaSalle y otros, *Science*, 259:988 (1993); Davidson, y otros, *Nat.Genet* 3:219 (1993); Yang, y otros, *J. Virol.* 69:2004 (1995) y vectores de virus adenoasociados (Ver Kaplitt, M. G. y otros, *Nat.Genet.* 8:148 (1994).

Los vectores virales Pox introducen el gen en el citoplasma de las células. Los vectores del virus Avipox resultan solo una expresión a corto plazo del ácido nucleico. Se prefieren los vectores adenovirus, vectores de virus adenoasociados

5 y vectores de virus del herpes simple (HSV) para introducir el ácido nucleico en las células neuronales. El vector de adenovirus resulta en una expresión de término más corto (aproximadamente 2 meses) que el virus adenoasociado (aproximadamente 4 meses), que a su vez es más corta que los vectores de HSV. El vector particular elegido dependerá de la célula objetivo y la afección que se trate. La introducción puede ser mediante técnicas estándar, por ejemplo infección, transfección, transducción o transformación. Ejemplos de modos de transferencia génica incluyen por ejemplo, ADN desnudo, precipitación con CaPO<sub>4</sub> DEAE dextrano, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección celular y vectores virales.

10 El vector puede emplearse para atacar esencialmente cualquier célula objetivo deseada. Por ejemplo, la inyección estereotóxica puede usarse para dirigir los vectores (por ejemplo adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Además, las partículas pueden suministrarse mediante infusión intracerebroventricular (icv) usando un sistema de infusión de minibomba, como un sistema de infusión SynchroMed. Un método basado en el flujo a granel, denominado convección, ha demostrado además la eficacia en el suministro de moléculas grandes a áreas extendidas del cerebro y puede ser útil para suministrar el vector a la célula objetivo. (Ver Bobo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison y otros, Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)). Otros métodos que pueden usarse incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y vías de administración oral u otras conocidas.

20 Las técnicas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para una proteína antigénica de la descripción (ver por ejemplo, Patente de los Estados Unidos núm. 4,946,778). Además, los métodos pueden adaptarse para la construcción de bibliotecas de expresión F<sub>ab</sub> (ver por ejemplo, Huse, y otros, 1989 Science 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos F<sub>ab</sub> monoclonales con la especificidad deseada para una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de esta. Los fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos para un antígeno de proteína pueden producirse por técnicas conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a: (i) un fragmento F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub> producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento F<sub>ab</sub> generado al reducir los puentes disulfuro de un fragmento F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub>; (iii) un fragmento F<sub>ab</sub> generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos F<sub>v</sub>.

30 Los anticuerpos heteroconjugados están además dentro del alcance de la presente descripción. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos de manera covalente. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir las células del sistema inmune a las células no deseadas (ver Patente de los Estados Unidos núm. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección por HIV (ver documento de patente núm. WO 91/00360; documento de patente núm. WO 92/200373; documento de patente núm. EP 03089). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* mediante métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que involucran los agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse mediante una reacción de intercambio de disulfuro o por la formación de un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos núm. 4,676,980.

40 Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo el(los) residuo(s) de cisteína(s) puede(n) introducirse en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede haber mejorado la capacidad de internalización y/o aumentado la muerte celular mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). (Ver Caron y otros, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, puede modificarse genéticamente un anticuerpo que tenga dos regiones de Fc y puede tener de ese modo las capacidades de lisis de complemento y de la ADCC mejoradas. (Ver Stevenson y otros, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

50 La descripción se refiere además a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de esta), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

55 Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de estas que pueden usarse incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP S-), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionuclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y, y <sup>186</sup>Re.

60 Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetilo adipimidato HCL), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina

puede prepararse como se describe en Vitetta y otros, Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. (Ver documento de patente núm. WO94/11026).

5 Los expertos en la técnica reconocerán que puede acoplarse una gran variedad de porciones posibles a los anticuerpos resultantes o a otras moléculas de la invención. (Ver, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, Nueva York, (1989)).

10 El acoplamiento puede lograrse mediante cualquier reacción química que unirá a las dos moléculas siempre que el anticuerpo y la otra porción retengan sus respectivas actividades. Este enlace puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y formación de complejos. La unión preferida es, sin embargo, unión covalente. La unión covalente puede lograrse ya sea mediante condensación directa de cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas de puente externas. Muchos agentes de enlaces bivalentes o polivalentes son útiles en el acoplamiento de moléculas de proteína, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica, sino más bien, es ilustrativa de los agentes de acoplamiento más comunes. (Ver Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen y otros, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); y Vitetta y otros, Science 238:1098 (1987)). Los enlazadores preferidos se describen en la literatura. (Ver, por ejemplo, Ramakrishnan, S. y otros, Cancer Res. 44:201-208 (1984) que describen el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Ver además, la Patente de los Estados Unidos núm. 5.030.719, que describe el uso del derivado de acetilhidrazida halogenada acoplado a un anticuerpo por medio de un enlazador oligopéptido. Los enlazadores particularmente preferidos incluyen: (i) clorhidrato de EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida, (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa- (2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem.Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidil-6[3-(2-piridil-ditio)propionamido]hexanoato (Pierce Chem. Co., núm. de cat. 21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6 [3-(2-piridil-ditio)-propianamida] hexanoato (Pierce Chem. Co. núm. de cat. 2165-G), y (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., núm. de cat. 24510) conjugado con EDC.

30 Los enlazadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen diferentes atributos, lo que conduce así a conjugados con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los enlazadores que contienen ésteres de NHS son menos solubles que los ésteres de sulfo-NHS. Además, el enlazador SMPT contiene un enlace disulfuro estéricamente impedido, y puede formar conjugados con mayor estabilidad. Los enlaces disulfuro, en general, son menos estables que otros enlaces debido a que el enlace disulfuro se escinde *in vitro*, lo que resulta en un menor conjugado disponible. Sulfo-NHS, en particular, puede mejorar la estabilidad de los acoplamientos de carbodimida. Los acoplamientos de carbodiimida (tal como EDC) cuando se usan junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodimida sola.

40 Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden formularse además como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein y otros, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 82:3688 (1985); Hwang y otros, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 77:4030 (1980); y Patente de los Estados Unidos núms. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un tiempo de circulación mejorado se describen en la Patente de los Estados Unidos núm. 5,013,556.

45 Particularmente, los liposomas útiles pueden generarse por el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidil etanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas son extrudidos a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a los liposomas como se describe en Martin y otros, J. Biol.Chem., 257:286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro.

#### Métodos de tratamiento

55 Los anticuerpos pueden usarse para prevenir, diagnosticar o tratar trastornos médicos en un sujeto, especialmente en humanos. La descripción proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un sujeto en riesgo de (o susceptible a) o que tiene una infección. La infección es viral, bacteriana, fúngica o parasitaria.

60 La presente descripción proporciona métodos para aumentar la respuesta inmune de un sujeto a un antígeno que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo o fragmento de este que reconoce un gen VH1-69 de la línea germinal en la región variable de la cadena pesada humana y un inmunógeno capaz de inducir una inmunidad reacción a dicho antígeno. En algunos aspectos, el anticuerpo es huG6.2. En otro aspecto, el anticuerpo es huG6.3. En algún aspecto, el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada (sec. con. núms. de ident.: 2 o 12), codificada por la secuencia de ácido nucleico sec. con. núms. de ident.:1 u 11, y una región variable de cadena ligera (sec. con. núm. de ident.: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico sec. con. núm. de ident.:3. Las CDR de cadena pesada del

anticuerpo tienen las siguientes secuencias: sec. con núms. de ident.:5, 6 y 7. Las CDR de cadena ligera del anticuerpo tienen las siguientes secuencias:sec. con núms. de ident.:8, 9 y 10. Preferentemente, las tres CDR de cadena pesada incluyen una secuencia de aminoácidos de al menos 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99%, o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núms. de ident.:5, 6 y 7 y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos de al menos 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99%, o más, idéntica a la secuencia de aminoácidos de sec. con. núms. de ident.:8, 9 y 10.

En algunos aspectos, el inmunógeno se enlaza covalentemente al anticuerpo. El antígeno podría ser un virus, una bacteria, un hongo o un parásito. El inmunógeno es de origen viral (por ejemplo, gripe, HIV), bacteriano y fúngico. Por ejemplo, el inmunógeno es la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe o fragmento de esta. Preferentemente, el inmunógeno comprende la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe. El anticuerpo de esta invención puede administrarse antes, a la vez o después de la administración del inmunógeno.

En la descripción se incluyen métodos para aumentar o potenciar una respuesta inmune a un antígeno. Una respuesta inmune se aumenta o potencia mediante la administración al sujeto un anticuerpo anti idiotipo del gen de la línea germinal de la región variable de la inmunoglobulina y un inmunógeno. En una modalidad preferida, el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada (sec. con. núms. de ident.: 2 o 12), codificada por la secuencia de ácido nucleico sec. con. núms. de ident.:1 u 11, y una región variable de cadena ligera (sec. con. núm. de ident.: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico sec. con. núm. de ident.:3. Las CDR de cadena pesada del anticuerpo tienen las siguientes secuencias: sec. con. núms. de ident.:5, 6 y 7. Las CDR de cadena ligera del anticuerpo tienen las siguientes secuencias: sec. con. núms. de ident.:8, 9 y 10. Preferentemente, las tres CDR de cadena pesada incluyen una secuencia de aminoácidos de al menos 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99%, o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con. núms. de ident.:5, 6 y 7 y una cadena ligera con tres CDR que incluyen una secuencia de aminoácidos de al menos 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99%, o más, idéntica a la secuencia de aminoácidos de sec. con. núms. de ident.:8, 9 y 10.

En algunos aspectos, el gen de la línea germinal es VH1-69. En algunos aspectos, el anticuerpo es huG6.2. En otro aspecto, el anticuerpo es huG6.3. El antígeno podría ser un virus, una bacteria, un hongo o un parásito. El inmunógeno es de origen viral (por ejemplo, gripe, HIV), bacteriano y fúngico. Por ejemplo, el inmunógeno es la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe o fragmento de esta. Preferentemente, el inmunógeno comprende la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe. El anticuerpo de esta invención puede administrarse antes, a la vez o después de la administración del inmunógeno.

#### Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos o agentes descritos en la presente descripción (además denominados en la presente descripción "compuestos activos"), y los derivados, fragmentos, análogos y homólogos de estos, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Tales composiciones típicamente comprenden el anticuerpo o agente y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se pretende que incluya cualquiera y todos los solventes, medio de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónico y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo. Los ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humano al 5%. Pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones que se usan para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir dispersiones o soluciones acuosas estériles (solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor TM EL (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En

5 todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos tales como bacteria y hongos. El portador puede ser un medio de dispersión o solvente que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse por varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato aluminico y gelatina.

15 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización con filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución estéril de este previamente filtrada.

20 Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales pueden prepararse además usando un portador fluido para su uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica por vía oral. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tales como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tales como almidón o lactosa, un agente desintegrante tales como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tales como estearato de magnesio o esterotes; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tales como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tales como yerbabuena, salicilato de metilo, o sabor de naranja.

35 Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en la forma de una atomización de aerosol a partir de un dispersador o contenedor presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

40 La administración sistémica puede ser además por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación, penetrantes adecuados para la barrera que se penetra. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal puede lograrse a través del uso de atomizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas que se conocen generalmente en la técnica.

45 Los compuestos pueden prepararse además en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

50 En una modalidad, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluyen sistemas de suministro microencapsulados e implantes. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales pueden obtenerse además comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) pueden usarse además como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de conformidad con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos núm. 4,522,811.

60 Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria como se usa en la presente descripción se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitarias de la invención se dictan por, y dependen directamente de, las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición tal como un compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

- 5 Esta descripción se refiere además a nuevos agentes identificados por cualquiera de los ensayos de tamizaje mencionados anteriormente y sus usos para tratamientos como se describen en la presente descripción.

Ejemplos

- 10 Ejemplo 1. Humanización del anticuerpo G6 de ratón.

1. Modelo de homología del anticuerpo G6 de ratón usando el Modelado de Anticuerpo Web (WAM).

- 15 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de G6 de ratón se enviaron al programa de modelado de anticuerpos basado en la Web (WAM)<sup>1</sup> para generar el modelo de homología del anticuerpo G6 de ratón. El programa WAM tiene en cuenta varios parámetros que rigen diferentes conformaciones de los anticuerpos. En los anticuerpos, por lo general los residuos en la región marco se conservan en su mayor parte, mientras que los residuos que forman las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son las más variables. Como tal enfoque basado en la homología se usa, cinco de las seis CDR (excepto la cadena pesada CDR3) pueden categorizarse en clases de estructura canónica clásica. Además, los miembros de las mismas clases canónicas tienen una conformación de bucle muy similar. Esto se determina por la longitud del bucle, la presencia de ciertos residuos clave conservados no solo en las regiones marco sino además en las CDR.

- 25 Brevemente WAM llevó a cabo diferentes parámetros computacionales en su algoritmo para crear un modelo de homología de formato de anticuerpo G6 de ratón a partir de su secuencia de aminoácidos usando los siguientes criterios:

- a) Los residuos del marco de un anticuerpo G6 de ratón que no solo incluyen los residuos de la cadena principal sino además residuos de cadena lateral junto con residuos de cadena principal de bucle canónico se construyeron usando las estructuras de homología más conocidas (rayos X y RMN).
- 30 b) Usando un muestreo conformacional uniforme con el algoritmo iterativo CONGEN, se predijo la conformación de las cadenas laterales en los bucles para obtener la conformación más minimizada energéticamente<sup>2</sup>.
- c) Las regiones de bucle no canónicas se modelaron a través de una serie de conformaciones obtenidas a partir de la búsqueda de bases de datos de bancos de datos de proteínas (PDB) o usando una búsqueda de base de datos conformacional/estructura diferente para una conformación de bucle.
- 35 d) Fue minimizada además la energía de las diferentes conformaciones generadas usando la etapa anterior usando Eureka, que es una versión del campo de fuerza de valencia (VFF)<sup>3</sup> modificada con solvente. Además, se usó también el tamizaje de la desviación de la media cuadrática (R.M. S.D) que compara la similitud en r.m. S.d con las estructuras conocidas de CDR3 (H3) de cadena pesada que contienen la misma longitud que el candidato de modelado.

- 40 El modelo final del anticuerpo G6 de ratón se seleccionó de las primeras cinco conformaciones de energía más bajas. El algoritmo comparó los ángulos de torsión entre el modelo candidato y el conjunto original de bucles de una estructura conocida en el banco de datos de proteínas. El modelo final con la conformación más cercana al conjunto de ángulos de torsión se seleccionó y se mostró en la Figura 1.

- 45 2. Humanización de G6 de ratón y generación de la 1<sup>a</sup> versión de G6 humanizado (huG6.1) según la secuencia de la línea germinal humana más cercana de G6 y accesibilidad superficial de residuos en los marcos de modelo de homología G6 de ratón

- 50 El modelo de homología G6 de ratón generado a partir de WAM se usó como molde para identificar los residuos que son accesibles en la superficie (expuestos al disolvente) tal como se visualiza a través del programa DeepView, usando un límite umbral del 30%<sup>4-5</sup>. Posteriormente se buscaron residuos de cadenas pesadas variables (VH) y cadenas ligeras (VL) de ratón G6 usando IGBLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)) contra la base de datos de la línea germinal de IgG humana. Para humanizar el G6 de ratón, intercambiamos los residuos accesibles de la superficie en marcos tanto de VH como VL manualmente a los encontrados en la secuencia de la línea germinal humana seleccionada, generando así la versión 1 humanizada de G6 (hG6.1). La alineación de la secuencia se muestra más abajo (Cambios totales de 14 aminoácidos en VH y 15 en VL).
- 55







En resumen, hemos preparado G6.2 y G6.3 humanizado que tienen una actividad/cinética de unión similar o mejor en comparación con G6 de ratón. La afinidad estimada para ellos está dentro del intervalo de 100 pM-1 nM.

#### Referencias

- 5 1. Whitelegg, N. R. & Rees, A. R. WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Eng* 13, 819-824 (2000).
2. Brucoleri, R. E. & Karplus, M. Prediction of the folding of short polypeptide segments by uniform conformational sampling. *Biopolymers* 26, 137-168, doi:10.1002/bip.360260114 (1987).
- 10 3. Dauber-Osguthorpe, P. et al. Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* 4, 31-47 (1988).
4. Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723, doi:10.1002/elps.1150181505 (1997).
5. Guex, N., Peitsch, M. C. & Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis* 30 Supl 1, S162-173, (2009).
- 15 6. Daura, X., Oliva, B., Querol, E., Aviles, F. X. & Tapia, O. On the sensitivity of MD trajectories to changes in water-protein interaction parameters: the potato carboxypeptidase inhibitor in water as a test case for the GROMOS force field. *Proteins* 25, 89-103 (1996).

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal G6 murino humanizado aislado que se une específicamente a la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana codificada por el gen VH1-69 de la línea germinal o un fragmento de este, en donde dicho anticuerpo o dicho fragmento comprende:
- 5 a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:
- QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGAVS  
 PGNSDTSYNEKFKGKATLTVDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSRYGNNAL  
 10 DYWGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 2); y
- una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:
- DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSNIVWLQKPKGKAPKGLIYHGTNLES  
 15 GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCVQYSQFPPTFGQGTKLEIK (sec. con núm. de ident.: 4); o
- b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:
- QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVKQAPGQGLEWIGAVS  
 20 PGNSDTSYNEKFKGKATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSRYGNNAL  
 DYWGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 12); y
- una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:
- 25 DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSNIVWLQKPKGKAPKGLIYHGTNLES  
 GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFATYYCVQYSQFPPTFGQGTKLEIK (sec. con núm. de ident.: 4).
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es
- 30 a. monovalente o bivalente, o  
 b. un anticuerpo monocatenario.
3. Una composición que comprende un anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 35 4. La composición de conformidad con la reivindicación 3 que comprende además un antígeno, opcionalmente en donde dicho antígeno
- a. se enlaza covalentemente a dicho anticuerpo y preferentemente en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monocatenario, o
- 40 b. comprende la región del tallo de la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde dicho antígeno es un virus, una bacteria o un hongo, opcionalmente en donde dicho virus es un virus de la gripe.
- 45 6. La composición de la reivindicación 4, en donde dicho antígeno es la proteína hemaglutinina (HA) de un virus de la gripe o fragmento de este.
7. Una célula aislada que produce el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
8. Un anticuerpo o fragmento de este de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en la
- 50 terapia.
9. Un anticuerpo o fragmento de este de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y un inmunógeno capaz de inducir una reacción inmune a un antígeno para su uso en la terapia.

**Figura 1**

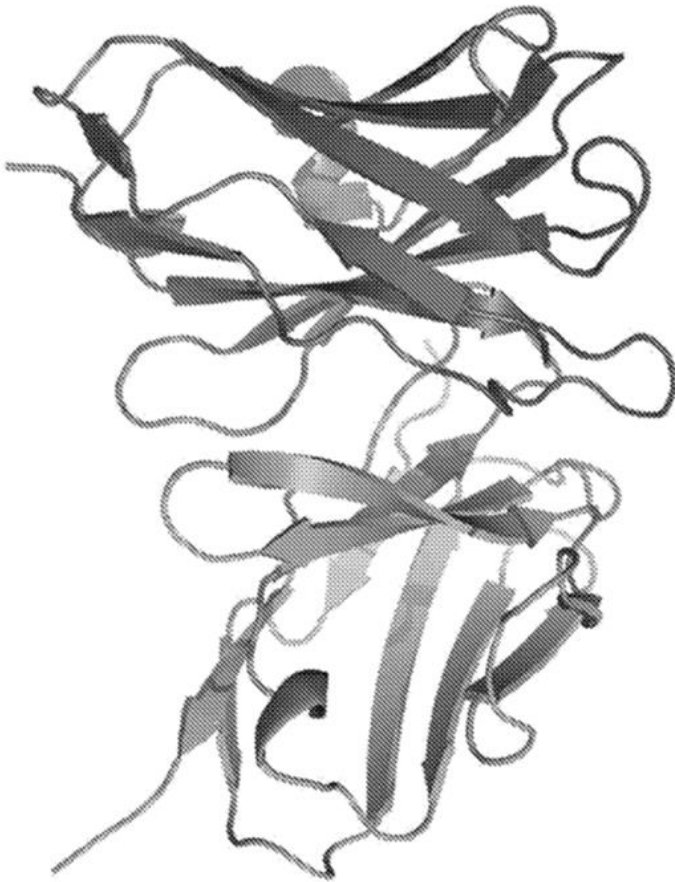
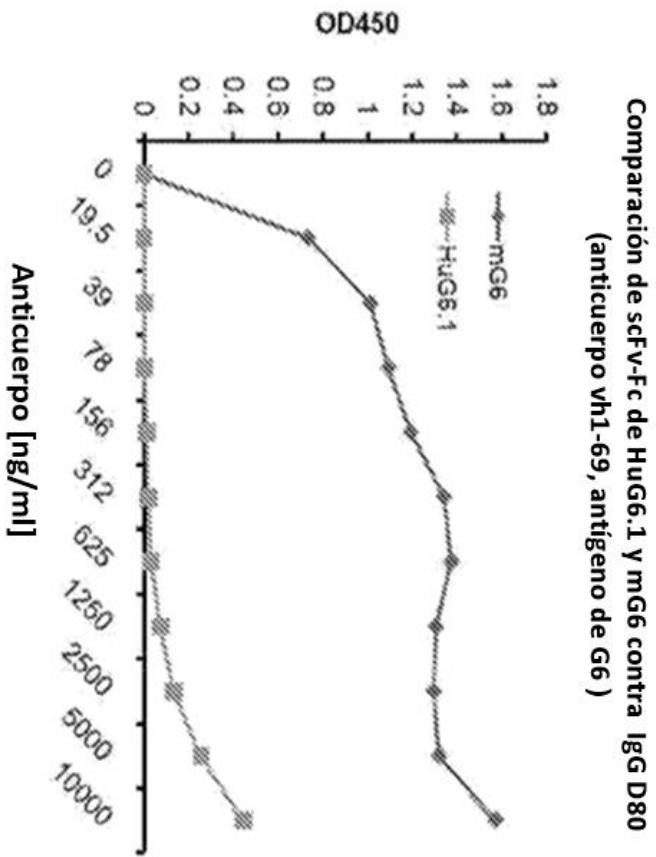


Figura 2



**Figura 3**

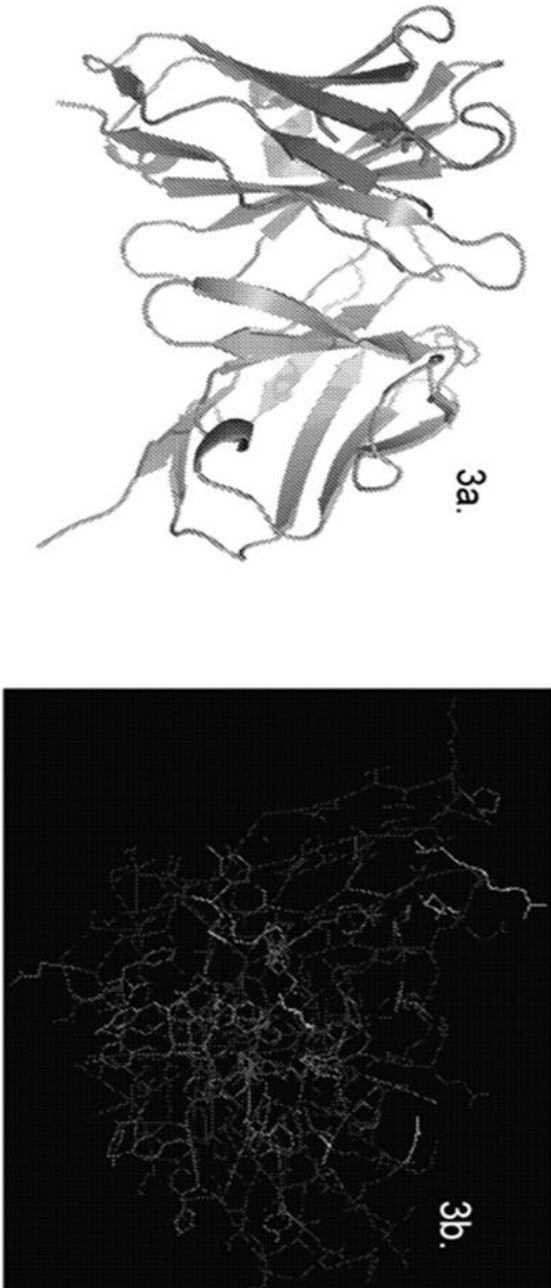


Figura 4

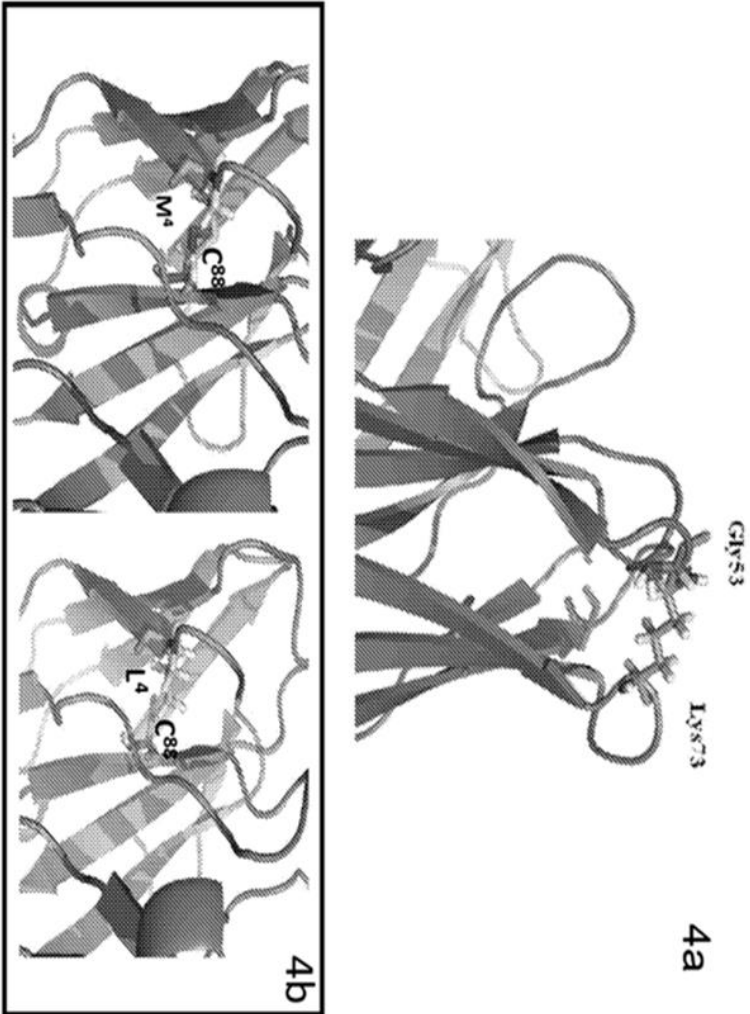


Figura 4-continuación

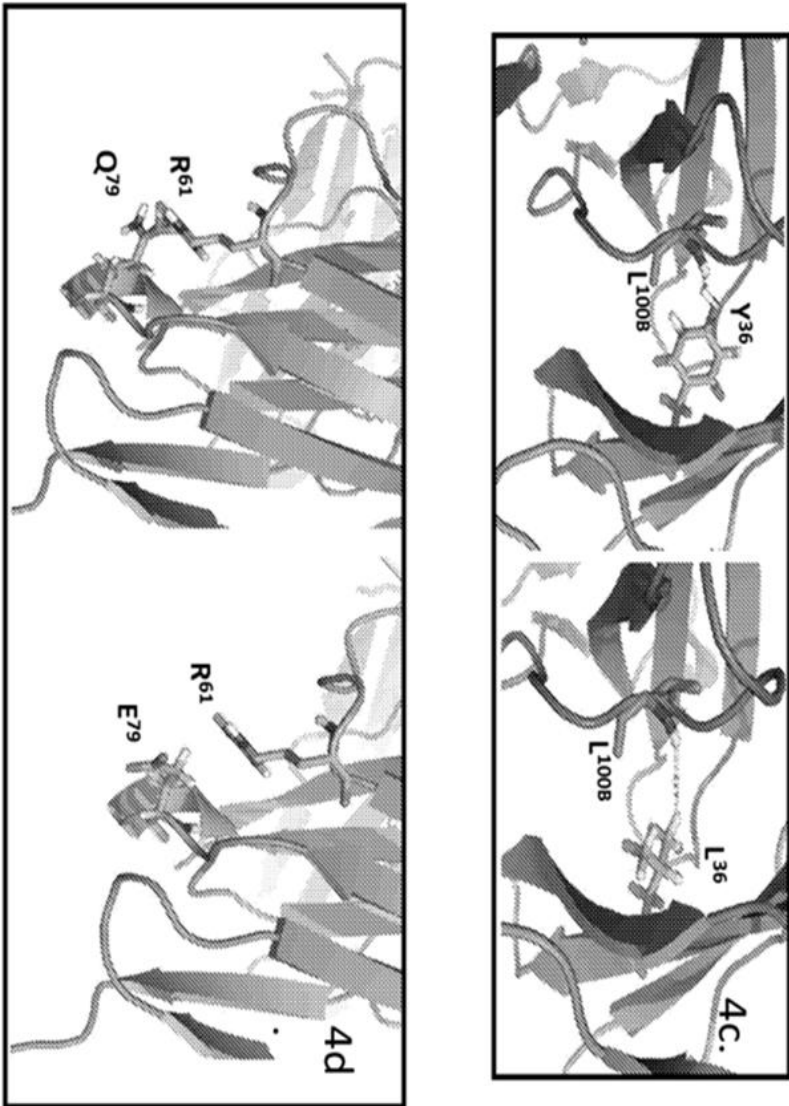




Figura 5

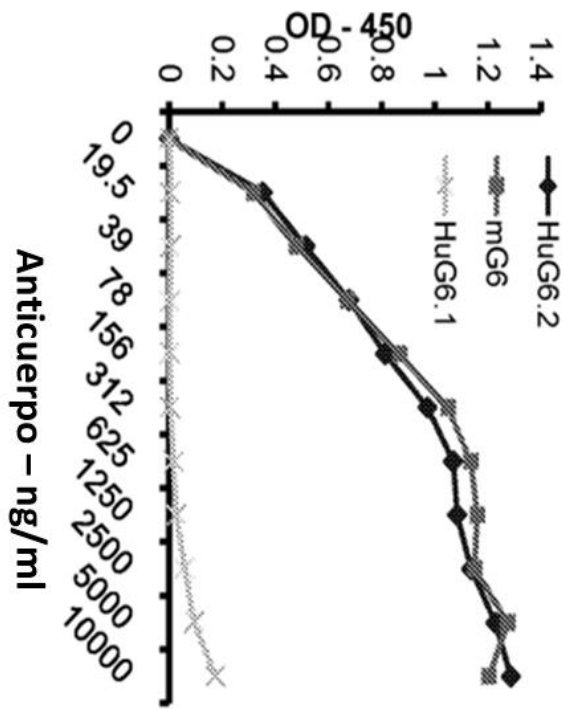


Figura 6

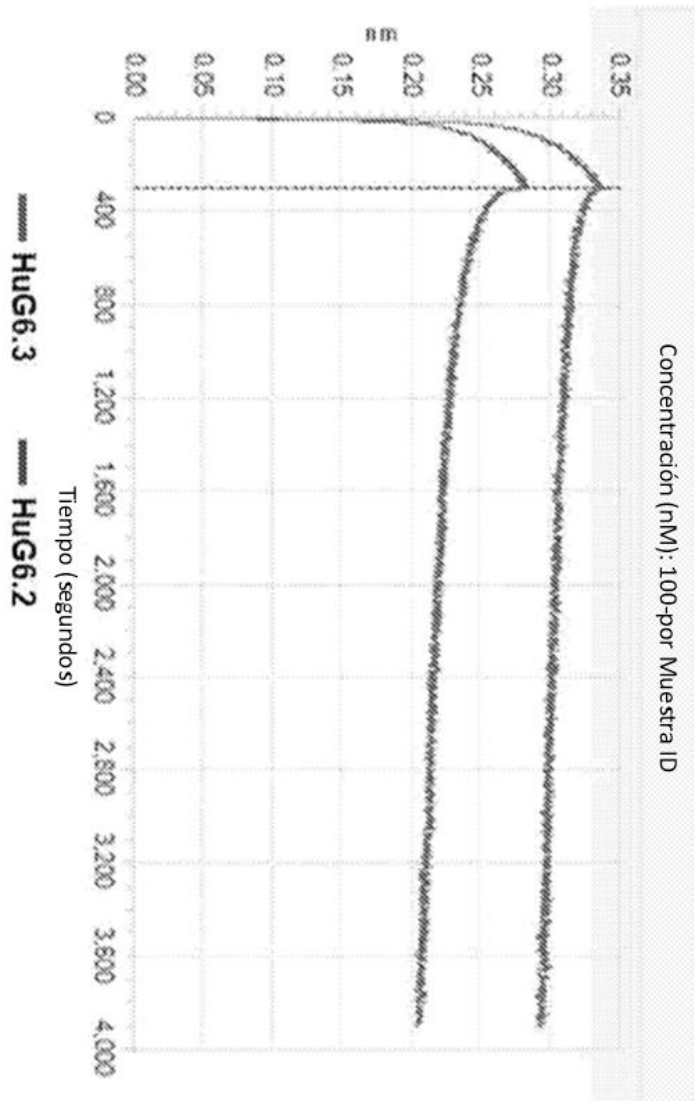


Figura 7

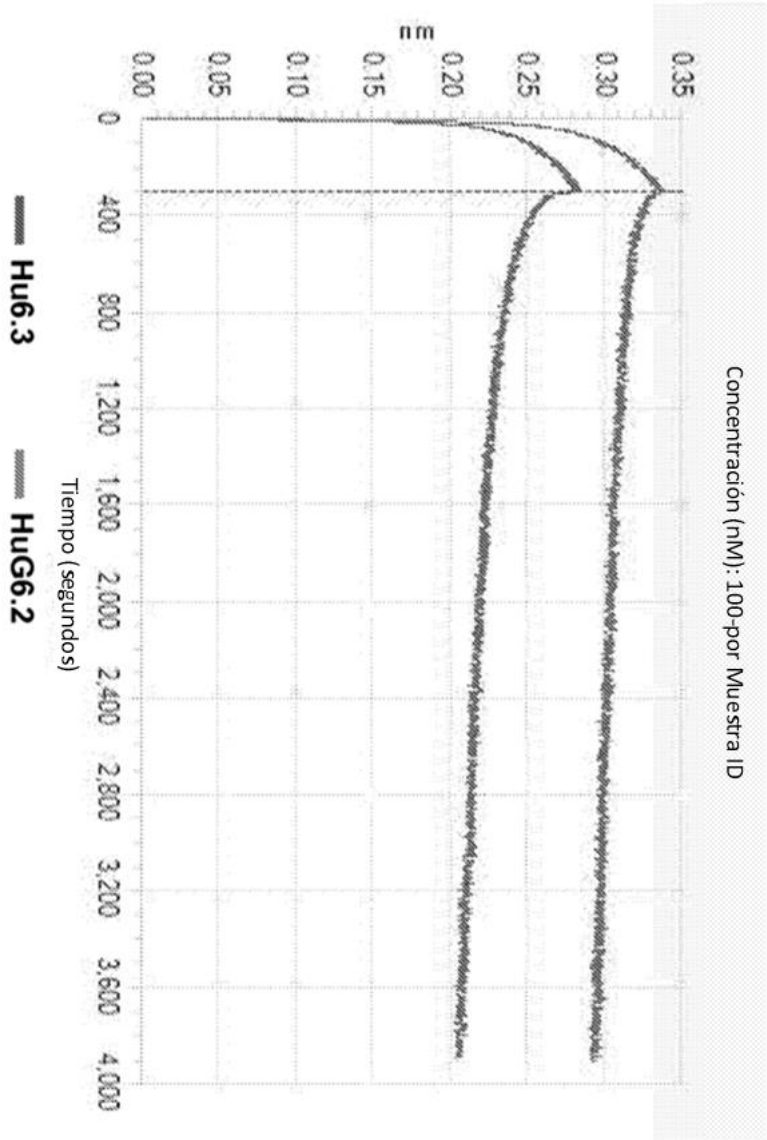
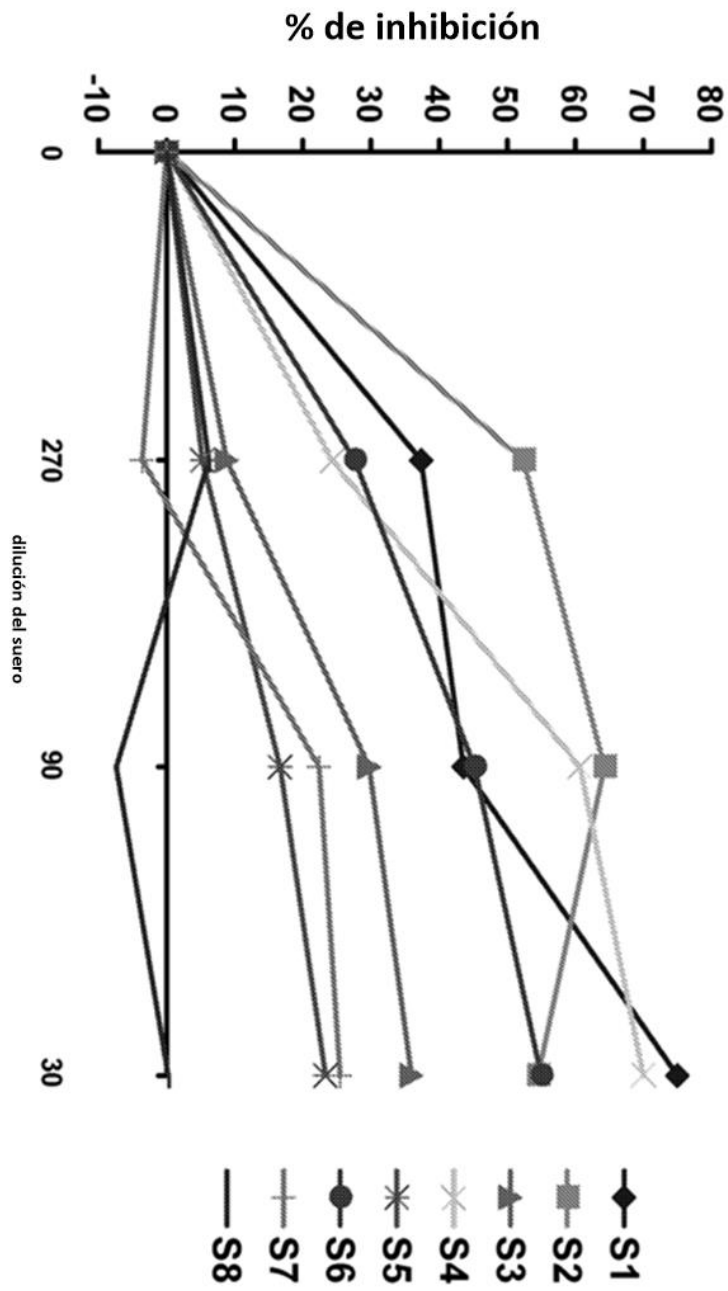


Figura 8



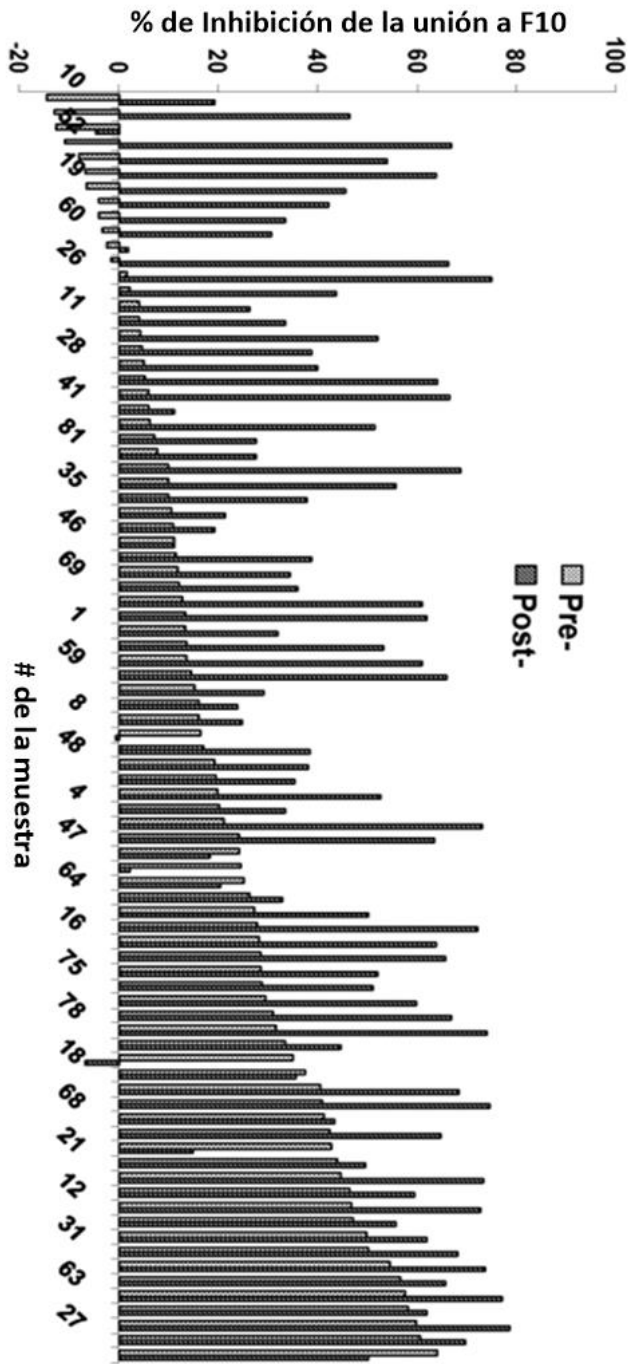


Figura 9

Figura 10

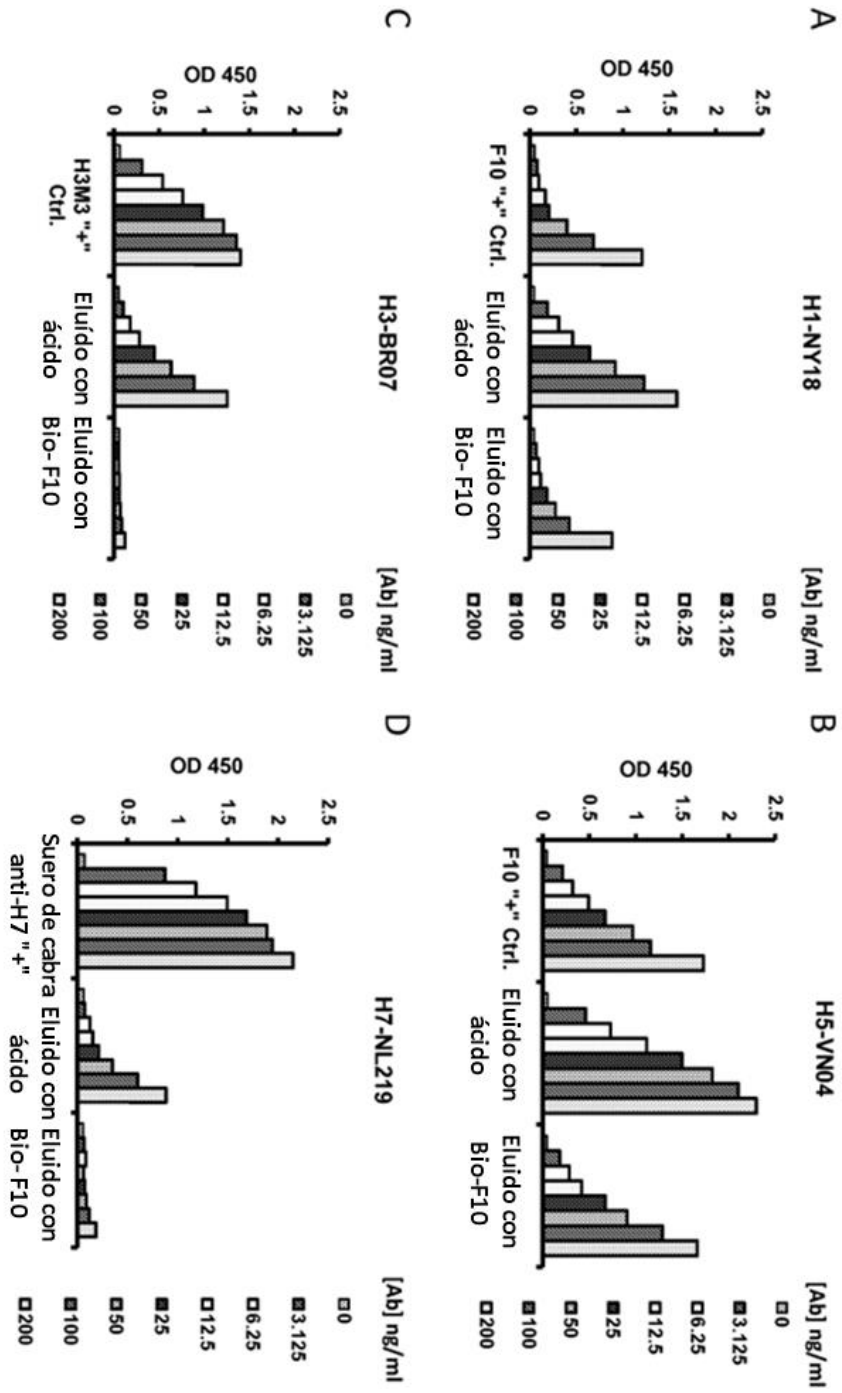
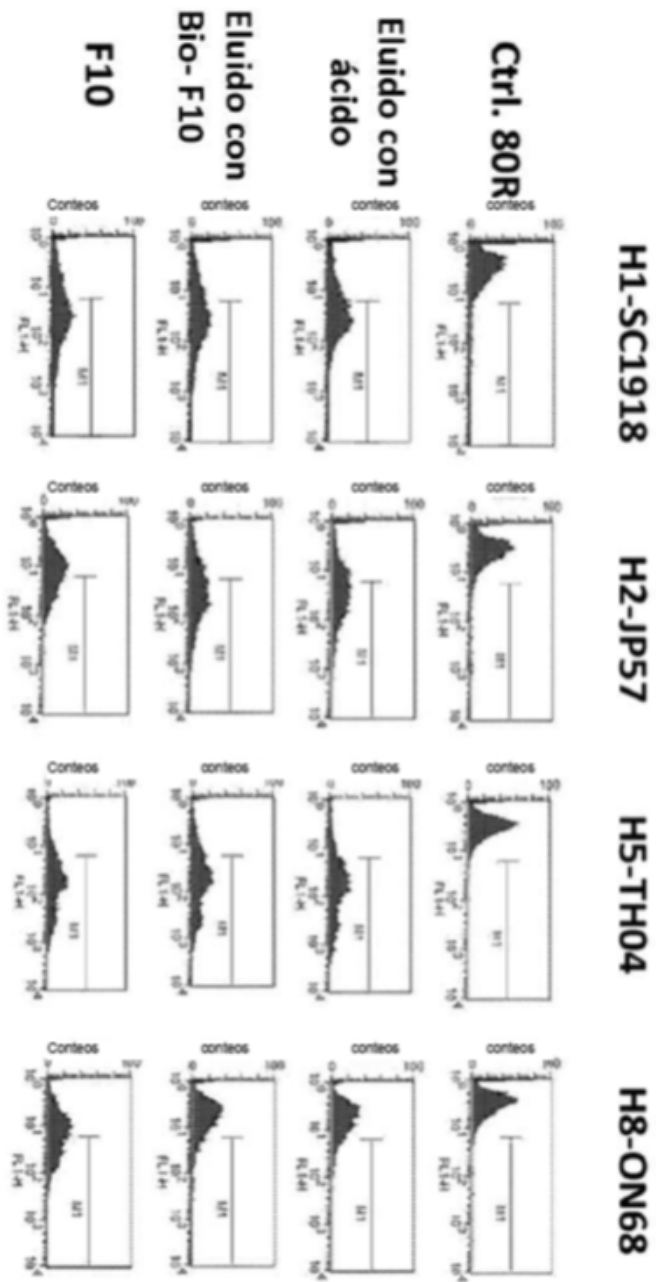


Figura 11



Eliminamos H6 ya que el control positivo F10 no funcionó.

Figura 12

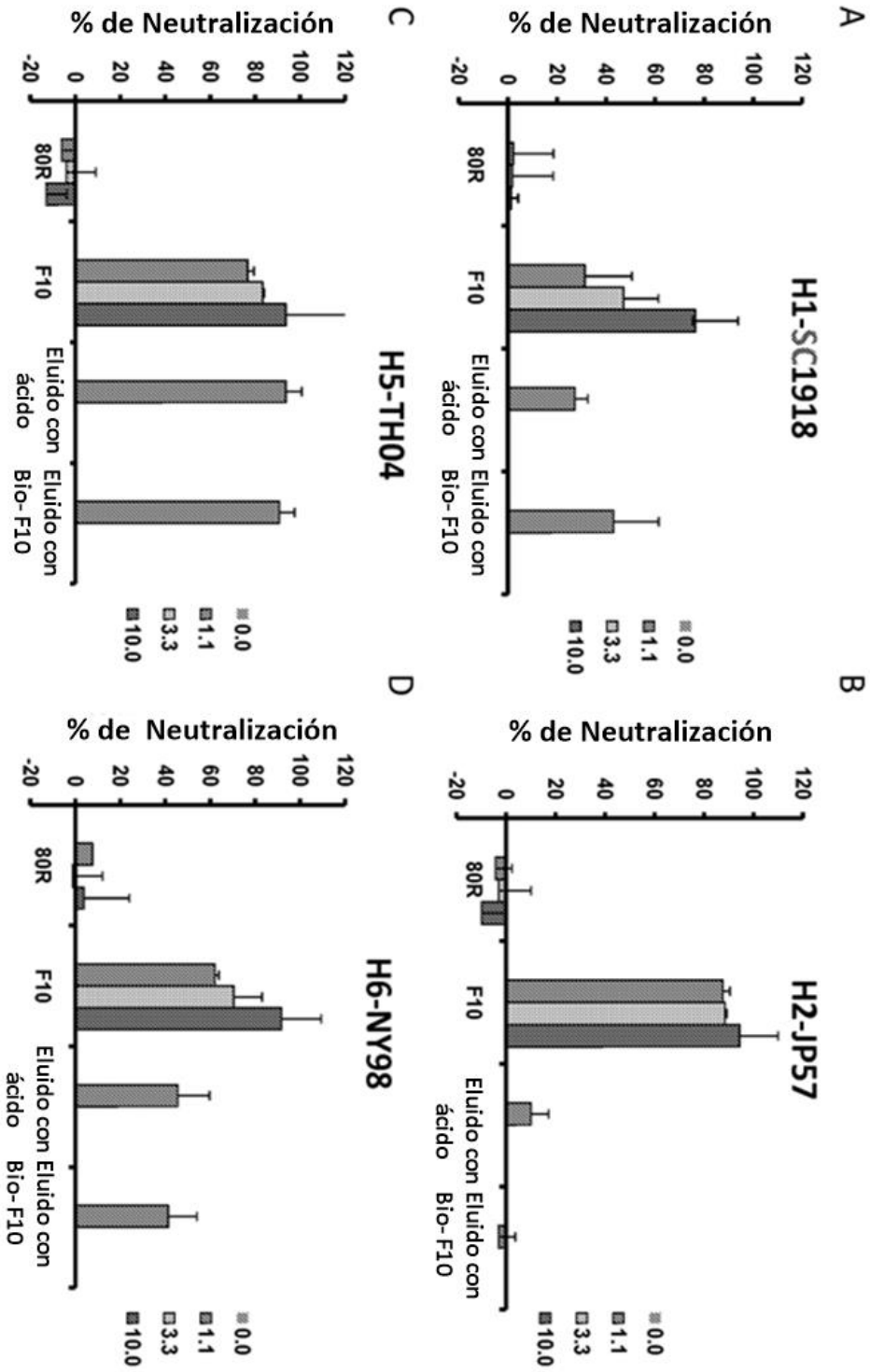
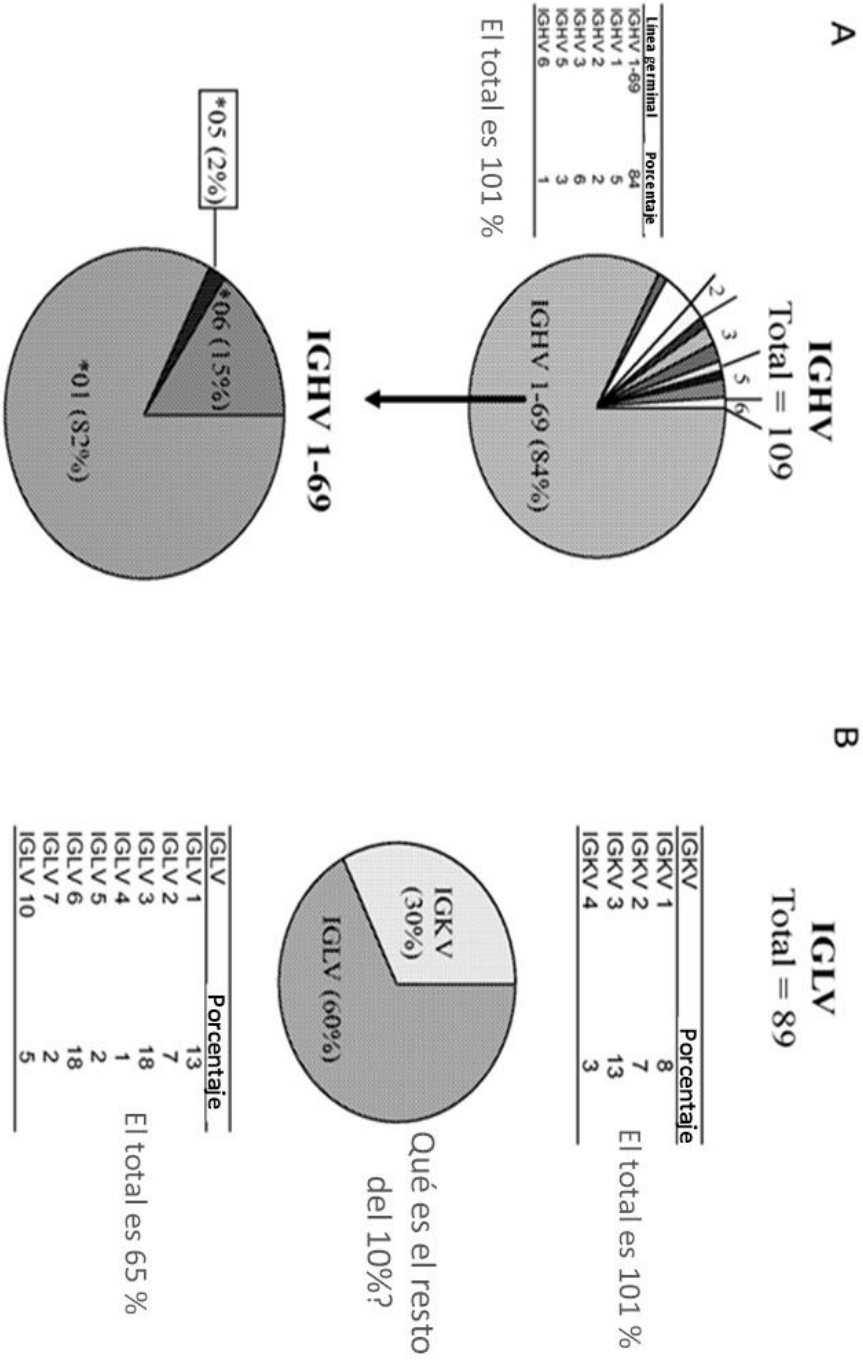




Figura 13

|               | FR1 |      |      | CDR1 | CDR2 |     |     | FR3 |     |     |
|---------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
|               | 2   | 6    | 17   | 33   | 50   | 54  | 56  | 71  | 73  | 85  |
| 51p1-r        | V   | Q    | S    | A    | G    | F   | T   | A   | E   | E   |
| hV1263-r      | GTG | CAG  | TCG  | GCT  | GGG  | TTT | ACA | GCG | GAA | GAG |
|               | --C | ---- | ---- | A--  | A--  | C-- | -T- | A-- | A-- | D   |
| <b>Alelos</b> |     |      |      |      |      |     |     |     |     |     |
| 1             | --- | ---  | ---  | ---  | ---  | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2             | --C | --A  | ---  | A--  | A--  | C-- | -T- | --- | A-- | --- |
| 3             | --- | ---  | ---  | ---  | ---  | --- | --- | --- | --- | --T |
| 4             | --C | ---  | ---  | ---  | A--  | C-- | -T- | --- | A-- | --- |
| 5             | --C | ---  | ---  | ---  | ---  | --- | --- | A-- | A-- | --- |
| 6             | --- | ---  | ---  | ---  | ---  | --- | --- | --- | A-- | --- |
| 7             | --- | ---  | ---  | ---  | A--  | --- | --- | --- | --- | --- |
| 8             | --C | --A  | ---  | A--  | A--  | C-- | -T- | --- | A-- | --- |
| 9             | --- | ---  | ---  | ---  | A--  | C-- | -T- | --- | A-- | --- |
| 10            | --C | ---  | --A  | ---  | ---  | C-- | -T- | --- | A-- | --- |
| 11            | --C | ---  | ---  | ---  | A--  | C-- | --- | --- | --- | --- |
| 12            | --C | ---  | ---  | ---  | ---  | --- | --- | --- | --- | --- |
| 13            | --C | ---  | --A  | ---  | ---  | --- | --- | --- | --- | --- |

Figura 14



**Figura 15**

**Mutaciones somáticas en las secuencias derivadas de G6 (total 92)**

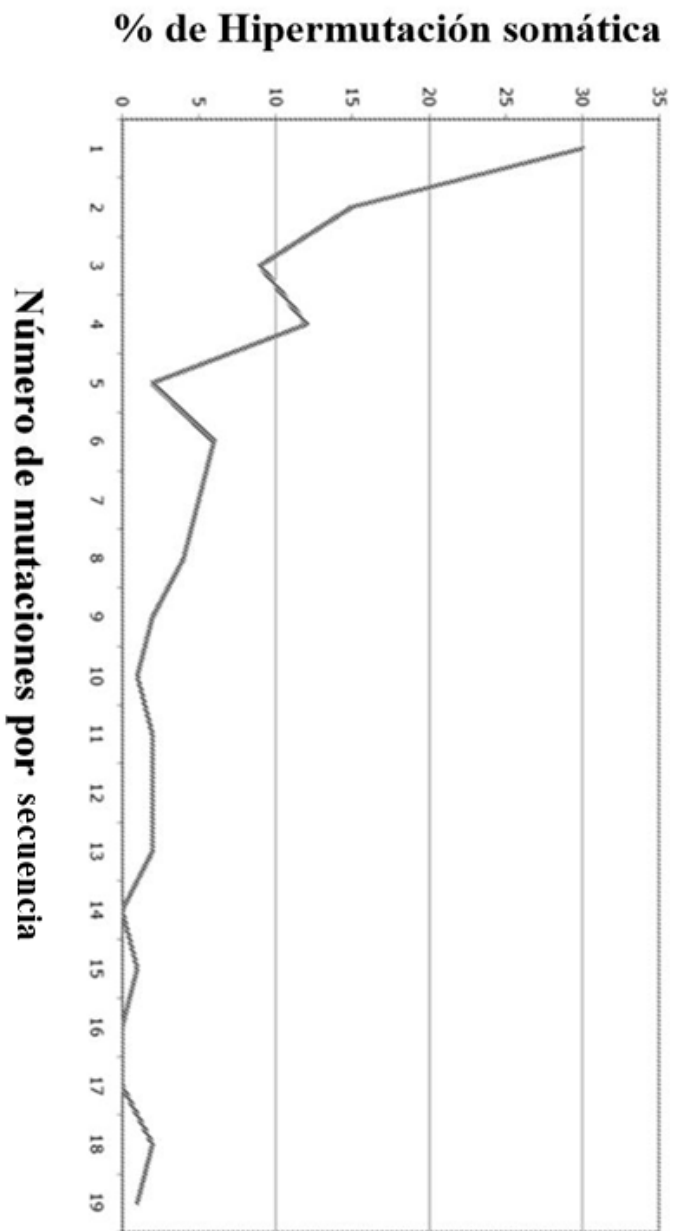
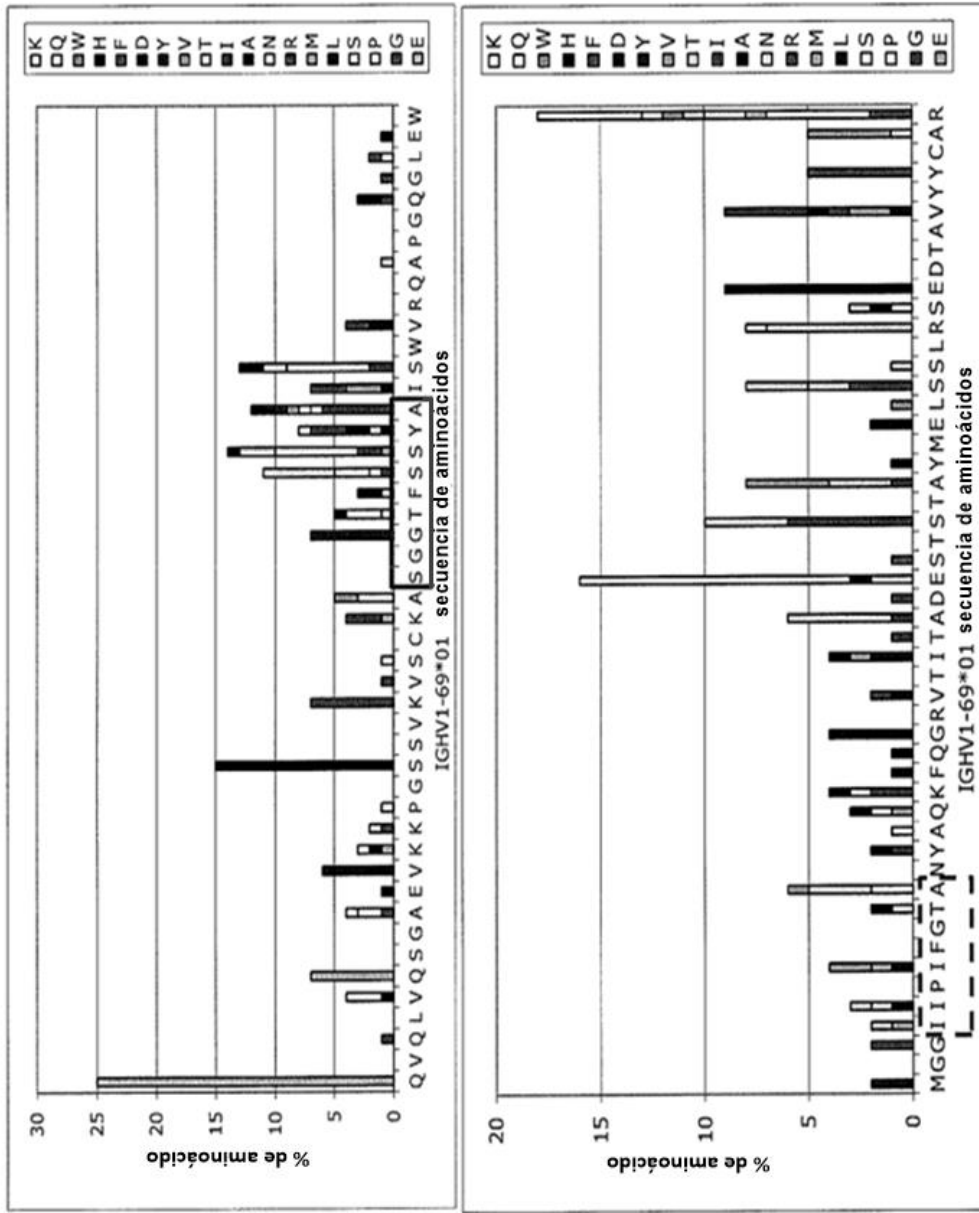


Figura 16



(sec. con núm. de ident.: 22)

Figura 17

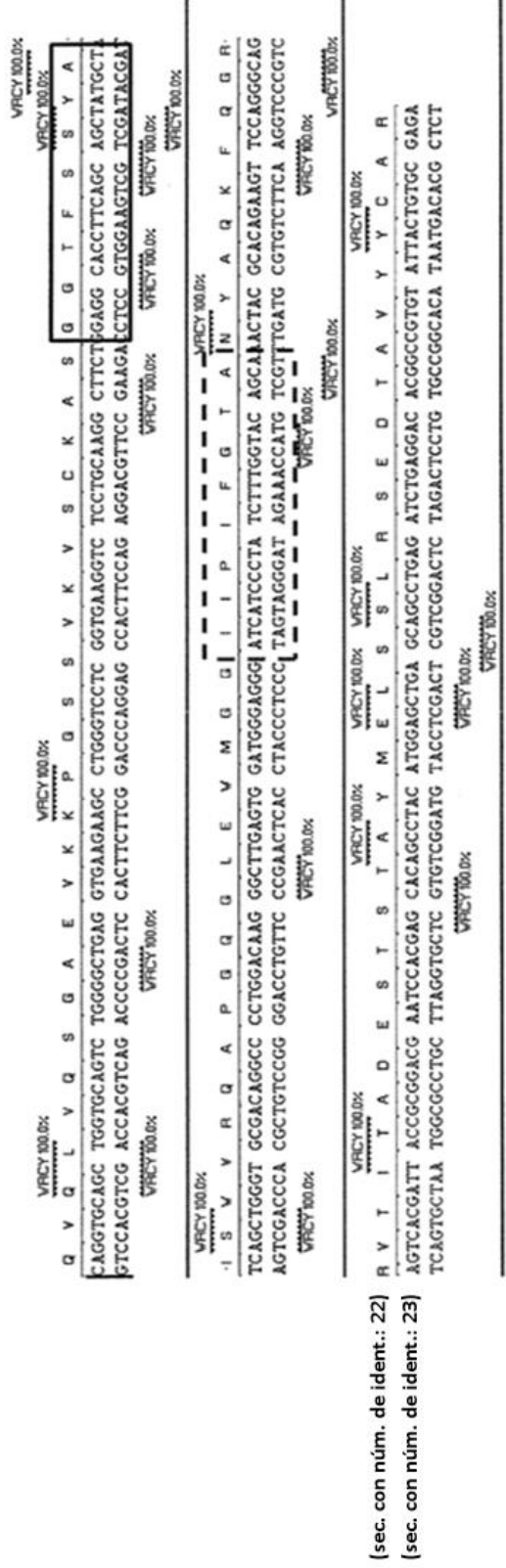


Figura 18

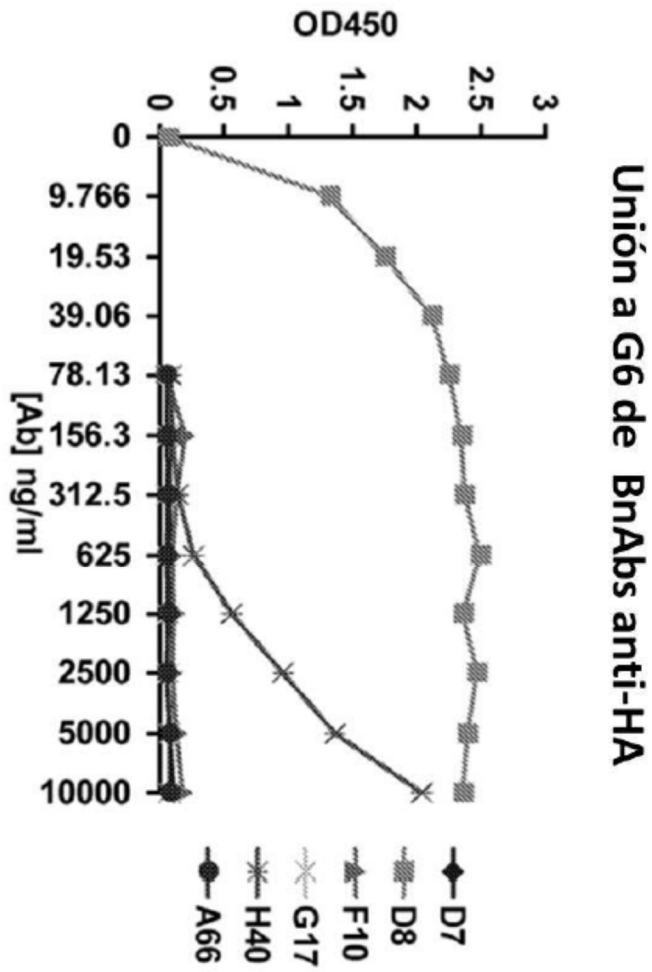


Figura 19

