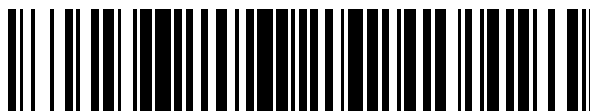


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 003**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2009 PCT/CH2009/000222**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009 WO09155726**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2009 E 09768695 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2307458**

54 Título: **Humanización de anticuerpos de conejo utilizando un marco universal de anticuerpos**

30 Prioridad:

25.06.2008 US 75697 P
25.06.2008 US 75692 P
24.02.2009 US 155041 P
24.02.2009 US 155105 P
02.06.2009 CH 8322009

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2018

73 Titular/es:

**ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL
 RESEARCH UNIT LLC (100.0%)
 Wagistrasse 21
 8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**BORRAS, LEONARDO y
 URECH, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 677 003 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

Humanización de anticuerpos de conejo utilizando un marco universal de anticuerpos

Antecedentes de la invención

5 Los anticuerpos monoclonales, sus conjugados y derivados son enormemente importantes comercialmente como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Los anticuerpos no humanos provocan una respuesta inmune fuerte en los pacientes, generalmente después de una única inyección de dosis baja (Schroff, 1985 Cancer Res 45: 879-85, Shawler. J Immunol 1985 135: 1530-5; Dillman, Cancer Biother 1994 9: 17-28). De acuerdo con esto, se desarrollaron varios métodos para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos murinos y de otros roedores, así como también tecnologías para producir anticuerpos completamente humanos usando, por ejemplo, ratones transgénicos o presentación en fagos. Se diseñaron anticuerpos quiméricos, que combinan regiones variables de roedores con regiones constantes humanas (por ejemplo, Boulianne Nature 1984 312: 643-6) reduciendo considerablemente los problemas de inmunogenicidad (por ejemplo, LoBuglio, Proc Natl Acad Sci 1989 86: 4220-4; Clark, Immunol Today 2000 21: 397-402). También se diseñaron anticuerpos humanizados, en los que la secuencia de roedores de la región variable en sí misma está diseñada para estar lo más cerca posible de una secuencia humana conservando al menos las CDR originales, o donde se injertaron las CDR del anticuerpo de roedor en el marco de un anticuerpo humano (por ejemplo, Riechmann, Nature 1988 332: 323-7; patente de Estados Unidos No. 5.693.761). Los anticuerpos policlonales de conejo se usan ampliamente para ensayos biológicos tales como ELISA o transferencias Western. Los anticuerpos policlonales de conejo a menudo son preferidos respecto a los anticuerpos policlonales de roedores debido a su afinidad generalmente mucho más alta. Además, los conejos a menudo son capaces de provocar buenas respuestas de anticuerpos a los antígenos que son poco inmunogénicos en ratones y/o que no dan lugar a buenos aglutinantes cuando se usan en la presentación en fagos. Debido a estas ventajas bien conocidas de los anticuerpos de conejo, serían ideales para ser utilizados en el descubrimiento y desarrollo de anticuerpos terapéuticos. La razón por la que esto no se hace comúnmente se debe principalmente a los desafíos técnicos en la generación de anticuerpos monoclonales de conejo. Dado que los tumores de tipo mieloma no son conocidos en conejos, la tecnología de hibridoma convencional para generar anticuerpos monoclonales no es aplicable a anticuerpos de conejo. El trabajo pionero en la provisión de compañeros de línea celular de fusión para células que expresan anticuerpos de conejo ha sido realizado por Knight y colegas (Spieker-Polet et al., PNAS 1995, 92: 9348-52) y Pytela et al., en 2005 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 7.429.487) han descrito una línea celular compañera de fusión mejorada. Sin embargo, esta tecnología no se distribuye ampliamente, ya que los conocimientos técnicos correspondientes están básicamente controlados por un solo grupo de investigación. En la literatura se describen métodos alternativos para la generación de anticuerpos monoclonales que implican la clonación de anticuerpos a partir de células que expresan anticuerpos seleccionados mediante RT-PCR, pero nunca se han notificado con éxito para anticuerpos de conejo.

35 Se espera que los anticuerpos de conejo, como los anticuerpos de ratón, provoquen respuestas inmunitarias fuertes si se usan para terapia humana, por lo tanto, los anticuerpos de conejo necesitan ser humanizados antes de que puedan usarse clínicamente. Sin embargo, los métodos que se usan para fabricar anticuerpos de roedores humanizados no se pueden extrapolar fácilmente para anticuerpos de conejo debido a diferencias estructurales entre el conejo y el ratón y, respectivamente, entre anticuerpos de conejo y de humano. Por ejemplo, la cadena ligera CDR3 (CDRL3) a menudo es mucho más larga que las CDRL3 previamente conocidas a partir de anticuerpos humanos o de ratón.

45 Hay pocos enfoques de humanización de anticuerpos de conejo descritos en la técnica anterior que, sin embargo, no son un enfoque de injerto clásico en el que las CDR de un donante no humano se trasplantan en un anticuerpo aceptor humano. El documento WO 04/016740 describe una estrategia denominada de "remodelación de la superficie". El objetivo de una estrategia de "remodelación de la superficie" es remodelar los residuos accesibles a los disolventes del marco no humano de manera que se vuelvan más parecidos a los humanos. Técnicas de humanización similares para anticuerpos de conejo como se describe en el documento WO 04/016740 son conocidas en la técnica. Tanto el documento WO08/144757 como el documento WO05/016950 divulgan métodos para humanizar un anticuerpo monoclonal de conejo que implican la comparación de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo parental de conejo con las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo humano similar. Posteriormente, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental de conejo se altera de modo que sus regiones marco son más similares en secuencia a las regiones marco equivalentes del anticuerpo humano similar. Para obtener buenas capacidades de unión, es necesario realizar laboriosos esfuerzos de desarrollo para cada inmunoenlazante individualmente.

55 Un problema potencial de los enfoques descritos anteriormente es que no se usa un marco humano, sino que el marco de conejo se modifica de manera que se parezca más al de un ser humano. Tal enfoque conlleva el riesgo de que los tramos de aminoácidos que están enterrados en el núcleo de la proteína aún puedan comprender epítopos de células T inmunogénicas.

60 Hasta la fecha, los solicitantes no han identificado un anticuerpo de conejo, que se haya humanizado mediante la aplicación de enfoques de injerto de última generación. Esto podría explicarse por el hecho de que las CDR de conejo pueden ser bastante diferentes de las CDR humanas o de roedor. Como se conoce en la técnica, muchas

5 cadenas V_H de conejo tienen cisteínas emparejadas adicionales en relación con las contrapartes murinas y humanas. Además del puente disulfuro conservado formado entre cys22 y cys92, también hay un puente cys21-cys79, así como un puente S-S dentro de la CDR formado entre el último residuo de CDRH1 y el primer residuo de CDRH2 en algunas cadenas de conejo. Además, a menudo se encuentran pares de residuos de cisteína en la CDR-L3. Además, muchas CDR de anticuerpos de conejo no pertenecen a ninguna estructura canónica previamente conocida. En particular, la CDR-L3 es a menudo mucho más larga que la CDR-L3 de una contraparte humana o murina. El documento WO 2008/004834 A1 se refiere a un anticuerpo humanizado para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) compuesto por CDR originadas a partir de un conejo inmunizado y una región marco de Ig humana.

10 Por lo tanto, el injerto de anticuerpos de CDR no humanas en un marco humano es una tarea importante de ingeniería de proteínas. La transferencia de los bucles de unión del antígeno desde un marco evolucionado naturalmente a un marco humano diferente seleccionado artificialmente se debe realizar de manera que las conformaciones del bucle nativo se retengan para la unión del antígeno. A menudo, la afinidad de unión al antígeno se reduce o se anula en gran medida después del injerto del bucle. El uso de marcos humanos cuidadosamente seleccionados en el injerto de los bucles de unión al antígeno maximiza la probabilidad de retener la afinidad de unión en la molécula humanizada (Roguzka et al. 1996). Aunque los muchos experimentos de injerto disponibles en la literatura proporcionan una guía aproximada para el injerto de CDR, no es posible generalizar un patrón. Los problemas típicos consisten en perder la especificidad, estabilidad o producibilidad después de injertar los bucles CDR.

20 De acuerdo con esto, existe una necesidad urgente de métodos mejorados para humanizar de manera confiable y rápida anticuerpos de conejo para uso como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Además, existe una necesidad de estructuras aceptoras humanas para humanizar de forma confiable anticuerpos de conejo, proporcionando anticuerpos funcionales y/o fragmentos de anticuerpos con propiedades biofísicas similares a los fármacos.

Sumario de la invención

25 Sorprendentemente, se ha descubierto que un marco de anticuerpo humano altamente soluble y estable identificado mediante un ensayo de control de calidad (QC) (como se divulga en el documento WO 0148017 y en Auf der Maur et al., (2001), FEBS Lett 508, páginas 407-412) es particularmente adecuado para acomodar CDR de otras especies de animales no humanos, por ejemplo, CDR de conejo. La presente invención está definida por las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona un marco aceptor para injertar CDR de lagomorfos que comprende un marco de cadena pesada variable humana que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO. 4 y que comprende treonina (T) en la posición 24, alanina (A) o glicina (G) en la posición 56, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo). Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano particular (el denominado anticuerpo "FW 1.4") que es especialmente adecuado como aceptor universal para CDR de una variedad de anticuerpos, en particular de anticuerpos de conejo, de diferentes especificidades de unión, independientemente de si un puente disulfuro está presente en una CDR o no. Además, la presente invención proporciona dos secuencias mutantes de dicho marco de anticuerpo humano particular, concretamente rFW1.4 y rFW1.4(V2), siendo ambos marcos particularmente adecuados como marcos de aceptores universales para el injerto de CDR de conejo. En otro aspecto, la invención proporciona un motivo de residuos marco que convierte un marco humano adecuado para acomodar CDR de otras especies de animales no humanos, en particular CDR de conejo.

45 Los inmunoenlazantes humanizados generados por el injerto de CDR de conejo en estos marcos de cadena ligera y pesada variables altamente compatibles retienen de forma consistente y confiable la orientación espacial de los anticuerpos de conejo de los que se derivan las CDR del donante. Por lo tanto, no es necesario introducir posiciones estructuralmente relevantes del inmunoenlazante del donante en el marco aceptor. Debido a estas ventajas, se puede lograr la humanización de alto rendimiento de los anticuerpos de conejo con poca o ninguna optimización de las capacidades de unión.

50 Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona métodos para injertar CDR de conejo y otras no humanas, en las secuencias marco de anticuerpo humano de cadena ligera y/o cadena pesada solubles y estables divulgadas aquí, generando así anticuerpos humanizados con propiedades biofísicas superiores. En particular, los inmunoenlazantes generados por los métodos de la invención exhiben propiedades funcionales superiores tales como solubilidad y estabilidad.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la definición de CDR H1 usada en este documento para injertar sitios de unión a antígeno a partir de anticuerpos monoclonales de conejo en los marcos de anticuerpos humanos altamente solubles y estables.

55 La Figura 2 muestra esquemáticamente una célula B 1 marcada con un anticuerpo fluorescente 2 que interacciona con una célula 3 que expresa el objetivo teñido con un colorante 4 intracelular. Objetivo de elección: 5; BCR: 6.

Figura 3: el proceso de selección por FACS de células B de conejo que se unen al blanco soluble ESBA903. Fig. 3A: los linfocitos se seleccionan de acuerdo con la dispersión frontal y lateral. Fig. 3B: entre ellos, se seleccionan las

células IgG+ IgM- (probablemente células B de memoria) (cuadrante rojo). Fig. 3C: se espera que las células doblemente teñidas con ESBA903-PE y ESBA903-PerCP (cuadrante verde) codifiquen IgG de alta afinidad contra ESBA903. Las células que muestran la fluorescencia más brillante (cuadrante rosa) se clasificaron en placas de 96 pozos.

- 5 Figura 4. Las perlas recubiertas con anticuerpos anti-TNFalfa (marcados con PE) se unen a las células CHO transfectadas con TNFalfa (panel superior). Las perlas de control recubiertas con anticuerpos anti-CD19 (marcados con APC) no se unen a las células CHO transfectadas con TNFalfa (panel central). Las perlas recubiertas con anticuerpos anti-TNFalfa (marcados con PE) no se unen a células CHO de tipo silvestre (ts) (panel inferior). Los gráficos de puntos a la izquierda muestran dispersiones hacia adelante y hacia los lados, que indican respectivamente el tamaño y la granularidad de los eventos. La población de perlas individuales (~3 µm) se seleccionan en P2. Las células CHO finalmente unidas a perlas (~30 µm) se seleccionan en P1. Los gráficos de puntos en el medio muestran los eventos P1 (células CHO) con respecto a su tinción con PE o APC. Por lo tanto, si las células interactúan con perlas anti-TNFalfa, se mostrarán en el cuadrante P3, y si interactúan con las perlas anti-CD19, aparecerán en el cuadrante P4. A la derecha, se detallan las estadísticas de cada muestra.
- 10
- 15 Figura 5. Las perlas recubiertas con anti-TNFalfa-PE y las perlas recubiertas con anti-CD19-APC se mezclaron junto con células CHO transfectadas con TNFalfa. Las células CHO se seleccionan (P1) y entre ellas se muestran las células que se unen a perlas recubiertas con anti-TNFalfa-PE o perlas recubiertas con anti-CD19-APC en los cuadrantes P3 y P4, respectivamente. Las perlas sin unir son visibles en el cuadrante P2.

- 20 Figura 6. Un análisis de las secuencias de anticuerpos de conejo extraídas de la base de datos de Kabat confirma que la CDR3 de la cadena pesada variable típicamente es tres aminoácidos más larga que su contraparte murina.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definirán de la siguiente manera. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

- 25 El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos completos y a cualquier fragmento de unión a antígeno. El término "polipéptido de unión a antígeno" e "inmunoenlazante" se usan simultáneamente en este documento. Un "anticuerpo" se refiere a una proteína, opcionalmente glicosilada, que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, que incluyen diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.
- 30
- 35
- 40

- El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, TNF). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un solo dominio o fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que el par de regiones V_L y V_H forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423 - 426, y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también pretenden incluirse dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno se pueden producir por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o
- 45
- 50
- 55

química de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden ser de diferente isotipo, por ejemplo, un anticuerpo IgG (por ejemplo, un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM.

El término "inmunoenlazante" se refiere a una molécula que contiene todo o parte del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, todo o parte del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera, de modo que el inmunoenlazante reconozca específicamente un antígeno objetivo. Los ejemplos no limitantes del inmunoenlazante incluyen moléculas de inmunoglobulina de longitud completa y scFv, así como fragmentos de anticuerpos, que incluyen, pero sin limitación, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , CL y $CH1$; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3ra ed. 1993), (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y $CH1$; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (vi) un anticuerpo de dominio único tal como un fragmento Dab (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H o V_L , un anticuerpo de Camélido (véase Hamers-Casterman, et al., Nature 363: 446-448 (1993), y Dumoulin, et al., Protein Science 11: 500-515 (2002)) o un anticuerpo de tiburón (por ejemplo, Nanobodies® de Ig-NAR de tiburón y (vii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes.

El término "anticuerpo de cadena sencilla", "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a una molécula que comprende un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo (o región; V_H) y un dominio variable de cadena ligera del anticuerpo (o región; V_L) conectado por un enlazador. Dichas moléculas de scFv pueden tener las estructuras generales: NH_2-V_L -enlazador- V_H-COOH o NH_2-V_H -enlazador- V_L-COOH . Un enlazador adecuado del estado de la técnica consiste en secuencias de aminoácidos repetidas de GGGGS o variantes de las mismas. En una realización preferida de la presente invención se usa un enlazador $(GGGGS)_4$ de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8, pero también son posibles variantes de 1-3 repeticiones (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448). Otros enlazadores que pueden usarse para la presente invención son descritos por Alftan et al. (1995), Protein Eng. 8: 725 - 731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu et al., (1996), Cancer Res. 56: 3055 - 3061, Kipriyanov et al., (1999), J. Mol. Biol. 293: 41-56 y Roovers et al., (2001), Cancer Immunol.

Como se usa en el presente documento, el término "propiedad funcional" es una propiedad de un polipéptido (por ejemplo, un inmunoenlazante) para el que una mejora (por ejemplo, con respecto a un polipéptido convencional) es deseable y/o ventajosa para un experto en la técnica, por ejemplo, para mejorar las propiedades de fabricación o la eficacia terapéutica del polipéptido. En una realización, la propiedad funcional es estabilidad (por ejemplo, estabilidad térmica). En otra realización, la propiedad funcional es la solubilidad (por ejemplo, bajo condiciones celulares). En otra realización más, la propiedad funcional es el comportamiento de agregación. En otra realización más, la propiedad funcional es la expresión de proteínas (por ejemplo, en una célula procarionota). En otra realización más, la propiedad funcional es el comportamiento de replegamiento después de la solubilización del cuerpo de inclusión en un proceso de fabricación. En ciertas realizaciones, la propiedad funcional no es una mejora en la afinidad de unión al antígeno. En otra realización preferida, la mejora de una o más propiedades funcionales no tiene un efecto sustancial sobre la afinidad de unión del inmunoenlazante.

El término "CDR" se refiere a una de las seis regiones hipervariables dentro de los dominios variables de un anticuerpo que contribuyen principalmente a la unión al antígeno. Una de las definiciones más comúnmente utilizadas para los seis CDR fue proporcionada por Kabat E.A. et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. Publicación de los NIH 91-3242). Como se usa en el presente documento, la definición de CDR de Kabat solo se aplica a CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera (CDR L1, CDR L2, CDR L3 o L1, L2, L3), así como para CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena pesada (CDR H2, CDR H3 o H2, H3). Sin embargo, la CDR del dominio variable de cadena pesada (CDR H1 o H1), como se usa en este documento, está definida por las posiciones de los residuos (numeración de Kabat) comenzando en la posición 26 y terminando antes de la posición 36. Esta definición es básicamente una fusión de CDR H1 como se definió de manera diferente por Kabat y Chothia (véase también la Figura 1 para ilustración).

El término "marco de anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a la parte del dominio variable, V_L o V_H , que sirve como andamio para los bucles de unión a antígeno (CDR) de este dominio variable. En esencia, es el dominio variable sin las CDR.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo (por ejemplo, un sitio específico en la molécula de TNF). Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos consecutivos o no consecutivos en una conformación espacial única. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Los términos "unión específica", "unión selectiva", "se une selectivamente" y "se une específicamente" se refieren a la unión del anticuerpo a un epítipo en un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menos.

El término "K_D" o "K_d" se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Típicamente, los anticuerpos de la invención se unen a TNF con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 10⁻⁷ M, tal como menos de aproximadamente 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M o 10⁻¹⁰ M o incluso más bajo, por ejemplo, como se determina usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE.

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble. Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En una realización, el vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN de cadena doble en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. En otra realización, el vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Los vectores divulgados aquí pueden ser capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero) o pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el genoma del huésped (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales).

El término "célula huésped" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Las células huésped incluyen células bacterianas, microbianas, vegetales o animales, preferiblemente, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, CHO (líneas de ovario de hámster chino) o células NS0.

El término "lagomorfo" se refiere a miembros del orden taxonómico Lagomorpha, que comprende las familias Leporidae (por ejemplo, liebres y conejos) y Ochotonidae (pikas). En una realización más preferida, el lagomorfo es un conejo. El término "conejo", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal que pertenece a la familia de los leporidos.

Como se usa en el presente documento, "identidad" se refiere a la coincidencia de secuencias entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad monomérica de base o aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada uno de los dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición. El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. Generalmente, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para dar la identidad máxima. Dicha alineación puede proporcionarse usando, por ejemplo, el método del algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, primarán. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Varios aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones. Se entiende que las diversas realizaciones, preferencias e intervalos se pueden combinar a voluntad. Además, dependiendo de la realización específica, las definiciones, realizaciones o intervalos seleccionados pueden no aplicarse.

Si no se indica lo contrario, las posiciones de aminoácidos se indican de acuerdo con el esquema de numeración de AHo. El sistema de numeración de AHo se describe adicionalmente en Honegger, A. y Pluckthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 309: 657-670). Alternativamente, se puede usar el sistema de numeración de Kabat como se describe más adelante en Kabat et al. (Kabat, EA, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Publicación NIH No. 91-3242). Las tablas de conversión para los dos sistemas de numeración diferentes usados para identificar las posiciones de residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo se proporcionan en A. Honegger, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670.

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un marco aceptor universal para el injerto de CDR de otras especies animales, por ejemplo, de conejo. Se ha descrito previamente que los anticuerpos o derivados de anticuerpos que comprenden las estructuras humanas identificadas en la denominada selección de "control de calidad" (documento WO0148017) se caracterizan por una estabilidad y/o solubilidad generalmente alta. Aunque el marco FW1.4 de cadena sencilla humana (una combinación de la SEQ ID NO: 1 (denominado a43 en el documento

WO03/097697) y SEQ ID NO: 2 (denominado KI27 en el documento WO03/097697) claramente tuvo un rendimiento inferior en el ensayo de control de calidad, se encontró sorprendentemente que tiene una alta estabilidad termodinámica intrínseca y es bien producible, también en combinación con una variedad de diferentes CDR. La estabilidad de esta molécula se puede atribuir principalmente a sus regiones marco. Se ha demostrado además que FW1.4 es, en esencia, altamente compatible con los sitios de unión a antígeno de los anticuerpos de conejo. Por lo tanto, el FW 1.4 representa un andamiaje adecuado para construir fragmentos de anticuerpo scFv humanizados estables derivados del injerto de bucles de conejo. Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un marco aceptor del inmunoenlazante, que comprende una secuencia VH que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1 y/o una secuencia VL que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 2, más preferiblemente que comprende la secuencia de FW1.4 (SEQ ID NO: 3) para el injerto de CDR de conejo, o una secuencia que tiene al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, de identidad con la SEQ ID NO: 3.

Además, se encontró que FW1.4 podría optimizarse sustituyendo varias posiciones de residuos en la cadena pesada de FW 1.4 y/o sustituyendo 1 posición en la cadena ligera de FW1.4. De ese modo, se descubrió sorprendentemente que la conformación en bucle de una gran variedad de CDR de conejo en la VH podía mantenerse completamente, en gran medida de manera independiente de la secuencia de la estructura del donante. Dichos residuos en la cadena pesada, así como la posición 1 en la cadena ligera de FW1.4 se conservan en anticuerpos de conejo. El residuo de consenso para las posiciones en la cadena pesada, así como en una posición en la cadena ligera se dedujo del repertorio de conejo y se introdujo en la secuencia del marco aceptor humano.

Como resultado, el marco modificado 1.4 (en lo sucesivo denominado rFW 1.4) es compatible con prácticamente cualquier CDR de conejo. Además, el rFW 1.4 que contiene diferentes CDR de conejo está bien expresado y se produce bien al contrario que las cadenas sencillas de tipo silvestre de conejo y aún retiene casi por completo la afinidad de los anticuerpos de conejo de donantes originales.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona el marco de cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 1, que comprende además uno o más residuos de aminoácidos que generalmente soportan la conformación de CDR derivadas de un inmunoenlazante de conejo. En particular, dichos residuos están presentes en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en 24H, 25H, 56H, 82H, 84H, 89H y 108H (numeración de AHo). Estas posiciones demuestran que afectan la conformación de CDR y, por lo tanto, están contempladas para la mutación para acomodar CDR de donantes. Preferiblemente, dichos uno o más residuos se seleccionan del grupo que consiste en: treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, glicina o alanina (G o A) en la posición 56, lisina (K) en la posición 82, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo). Preferiblemente, están presentes al menos tres, más preferiblemente, cuatro, cinco, seis y lo más preferiblemente todos los siete residuos. Sorprendentemente, se ha encontrado que la presencia de los residuos mencionados mejora la estabilidad del inmunoenlazante.

La presente divulgación proporciona un marco aceptor del inmunoenlazante que comprende un VH que tiene al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e incluso más preferiblemente 100% de identidad con la SEQ ID NO: 4, con la condición de que al menos uno, más preferiblemente al menos tres, más preferiblemente, cuatro, cinco, seis y lo más preferiblemente siete residuos del grupo que consiste en treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición 56, treonina (T) en la posición 84, lisina (K) en la posición 82, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo) estén presentes. En una realización preferida, el marco aceptor del inmunoenlazante es un marco aceptor del inmunoenlazante para CDR de conejo.

En una realización preferida, dicho marco de cadena pesada variable es o comprende la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6. Ambas estructuras de cadena pesada variable pueden combinarse, por ejemplo, con cualquier marco de cadena ligera adecuado.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un marco aceptor del inmunoenlazante que comprende

(i) un marco de cadena pesada variable que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 75%, 80%, 85%, 90%, más preferiblemente al menos 95% de identidad, con la SEQ ID NO: 4; y/o

(ii) un marco de cadena ligera variable que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 75%, 80%, 85%, 90%, más preferiblemente al menos 95% de identidad, con la SEQ ID NO: 2.

En una realización muy preferida, el marco de cadena pesada variable comprende treonina (T) en la posición 24, glicina (G) en la posición 56, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo).

En una realización preferida, la cadena ligera variable comprende treonina (T) en la posición 87 (numeración de AHo).

En una realización preferida, dicho marco aceptor del inmunoenlazante comprende

(i) un marco de cadena pesada variable seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6; y/o

(ii) un marco de cadena ligera variable de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 9.

5 En una realización preferida, el marco de cadena pesada variable está unido a un marco de cadena ligera variable a través de un enlazador. El enlazador puede ser cualquier enlazador adecuado, por ejemplo, un enlazador que comprende de 1 a 4 repeticiones de la secuencia GGGGS, preferiblemente un péptido (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 8), o un enlazador como se describe en Alfthan et al., (1995) Protein Eng. 8: 725-731.

10 En otra realización preferida, el marco aceptor del inmunoenlazante es una secuencia que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% más preferiblemente al menos 95% de identidad, con la SEQ ID NO: 5, mientras que la secuencia, preferiblemente, no es la SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente, el marco aceptor del inmunoenlazante comprende o es la SEQ ID NO: 5.

15 En otra realización preferida, el marco aceptor del inmunoenlazante es una secuencia que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, más preferiblemente al menos 95% de identidad, con la SEQ ID NO: 7, mientras que la secuencia, preferiblemente, no es la SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente, el marco aceptor del inmunoenlazante comprende o es la SEQ ID NO: 7.

20 Además, se encontró sorprendentemente que la presencia del motivo de aminoácido descrito anteriormente vuelve a un marco, preferiblemente un marco humano, particularmente adecuado para la acomodación de CDR de otras especies de animales no humanos, en particular CDR de conejo. Dicho motivo no tiene un impacto negativo en la estabilidad de un inmunoenlazante. Las CDR se presentan en una conformación similar a su orientación espacial nativa en el inmunoenlazante de conejo; por lo tanto, no es necesario injertar ninguna posición estructuralmente relevante en el marco del aceptor. Por consiguiente, el marco aceptor del inmunoenlazante humano o humanizado comprende al menos tres aminoácidos, preferiblemente cuatro, cinco, seis y más preferiblemente siete aminoácidos del grupo que consiste en treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición 56, lisina (K) en la posición 82, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo).

25 Los marcos de aceptores del inmunoenlazante como se describen en el presente documento pueden comprender una sustitución potenciadora de la solubilidad en el marco de cadena pesada, preferiblemente en las posiciones 12, 103 y 144 (numeración de AHo). Preferiblemente, un aminoácido hidrófobo está sustituido por un aminoácido más hidrofílico. Los aminoácidos hidrofílicos son, por ejemplo, arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), glutamina (Q), glicina (G), histidina (H), lisina (K), serina (S) y treonina (T). Más preferiblemente, el marco de cadena pesada comprende (a) Serina (S) en la posición 12; (b) Serina (S) o treonina (T) en la posición 103 y/o (c) serina (S) o treonina (T) en la posición 144.

35 Además, los aminoácidos potenciadores de la estabilidad pueden estar presentes en una o más posiciones 1, 3, 4, 10, 47, 57, 91 y 103 del marco de cadena ligera variable (numeración de AHo). Más preferiblemente, el marco de cadena ligera variable comprende ácido glutámico (E) en la posición 1, valina (V) en la posición 3, leucina (L) en la posición 4, serina (S) en la posición 10; arginina (R) en la posición 47, serina (S) en la posición 57, fenilalanina (F) en la posición 91 y/o valina (V) en la posición 103.

Como la glutamina (Q) es propensa a la desaminación, en otra realización preferida, la VH comprende en la posición 141 una glicina (G). Esta sustitución puede mejorar el almacenamiento a largo plazo de la proteína.

40 Por ejemplo, los marcos del aceptor descritos en este documento pueden usarse para generar un anticuerpo humano o humanizado que retiene las propiedades de unión del anticuerpo no humano del que se derivan las CDR no humanas. Por consiguiente, la divulgación abarca un marco aceptor del inmunoenlazante como se divulga en la presente memoria, que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un inmunoenlazante del donante, preferiblemente de un inmunoenlazante de mamífero, más preferiblemente de un inmunoenlazante de lagomorfo y lo más preferiblemente de un conejo. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un inmunoenlazante específico para un antígeno deseado que comprende

(i) CDR de cadena ligera variable de un lagomorfo; y

(ii) un marco de cadena pesada variable humana que tiene al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% y lo más preferiblemente 100% identidad con la SEQ ID NO. 4.

50 En una realización preferida, existe la condición de que al menos un aminoácido del grupo que consiste en treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición 56, treonina (T) en la posición 84, lisina (K) en la posición 82, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo) esté presente en dicha secuencia del marco de cadena pesada variable humana.

55 Preferiblemente, el lagomorfo es un conejo. Más preferiblemente, el inmunoenlazante comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera procedentes del inmunoenlazante del donante.

5 Como se conoce en la técnica, muchas cadenas de VH de conejo tienen cisteínas emparejadas adicionales con respecto a las contrapartes murinas y humanas. Además del puente disulfuro conservado formado entre cys22 y cys92, también hay un puente cys21-cys79, así como un puente S-S interCDR formado entre el último residuo de CDRH1 y el primer residuo de CDR H2 en algunas cadenas de conejo. Además, a menudo se encuentran pares de residuos de cisteína en la CDR-L3. Además, muchas CDR de anticuerpos de conejo no pertenecen a ninguna estructura canónica previamente conocida. En particular, la CDR-L3 es a menudo mucho más larga que la CDR-L3 de una contraparte humana o murina.

10 Como se estableció anteriormente, el injerto de las CDR no humanas sobre los marcos divulgados en este documento produce una molécula en la que las CDR se muestran en una conformación apropiada. Si es necesario, la afinidad del inmunoenlazante puede mejorarse mediante el injerto de residuos del marco que interactúan con el antígeno del inmunoenlazante del donante no humano. Estas posiciones pueden, por ejemplo, ser identificadas mediante

- (i) la identificación de la secuencia progenitora de la línea germinal respectiva o, alternativamente, mediante el uso de las secuencias de consenso en el caso de secuencias marco altamente homólogas;
- 15 (ii) la generación de un alineamiento de secuencia de las secuencias del dominio variable del donante con la secuencia progenitora de la línea germinal o la secuencia consenso de la etapa (i); y
- (iii) la identificación de diferentes residuos.

Los residuos diferentes en la superficie de la molécula se mutaron en muchos casos durante el proceso de generación de afinidad in vivo, presumiblemente para generar afinidad por el antígeno.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un inmunoenlazante que comprende el marco aceptor del inmunoenlazante descrito en este documento. Dicho inmunoenlazante puede, por ejemplo, ser un anticuerpo scFv, una inmunoglobulina de longitud completa, un fragmento Fab, un Dab o un Nanocuerpo.

25 En una realización preferida, el inmunoenlazante está unido a una o más moléculas, por ejemplo, un agente terapéutico tal como un agente citotóxico, una citoquina, una quimioquina, un factor de crecimiento u otra molécula de señalización, un agente de formación de imágenes o una segunda proteína tal como un activador transcripcional o un dominio de unión a ADN.

El inmunoenlazante como se divulga en la presente memoria puede, por ejemplo, ser utilizado en aplicaciones de diagnóstico, aplicación terapéutica, validación de objetivos o terapia génica.

30 La divulgación proporciona adicionalmente un ácido nucleico aislado que codifica el marco aceptor del inmunoenlazante descrito en la presente memoria o el inmunoenlazante o los inmunoenlazantes como se divulga en el presente documento.

Como se divulga en el presente documento, se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico divulgado en este documento.

El ácido nucleico o el vector como se divulga en este documento puede, por ejemplo, ser utilizado en terapia génica.

35 La divulgación abarca además una célula huésped que comprende el vector y/o el ácido nucleico divulgados en este documento.

Además, se proporciona una composición que comprende el marco aceptor del inmunoenlazante como se divulga en la presente memoria, el inmunoenlazante como se divulga en la presente memoria, el ácido nucleico aislado como se divulga en la presente memoria o el vector como se divulga en la presente memoria.

40 Las secuencias divulgadas en este documento son las siguientes (los residuos X son sitios de inserción de CDR):

SEQ ID NO.1: marco de cadena pesada variable de FW1.4 (a43)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAAS(X)**_{n=1-50}WVRQAPGKGLEWVS
 (X)_{n=1-50}RFTISRDN**SKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYY**CAK(X)**_{n=1-50}WGQGTL
 VTVSS

SEQ ID NO. 2: marco de cadena ligera variable de FW1.4 (KI27)

EIVMTQSPSTLSASV**GD**RVIITC(X)_{n=1-50}WYQ**Q**KPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSR**FSGSG**SGAEFTLTI**SSLQ**PDDFATYYC(X)_{n=1-50}FGQGT**KL**T VLG

45 SEQ ID NO. 3: marco de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFGSGSGAEFTLTISSLQPDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVS(X)_{n=1-50} RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAK(X)_{n=1-50} WGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 4: marco de cadena pesada variable de rFW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}
 RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGLTV TVSS

SEQ ID NO. 5: marco de rFW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50} RFTISRDTSKNTVYLQMNS
 LRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGLTVTVSS

5

SEQ ID NO. 6: marco de cadena pesada variable de rFW1.4 (V2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50}
 RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 7: marco de rFW1.4 (V2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50} RFTISKDTSKNTVYLQMNSLR
 AEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGLTVTVSS

10

SEQ ID NO. 8: enlazador GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO. 9: marco de cadena ligera variable sustituida de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

15

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para la humanización de anticuerpos no humanos injertando CDR de anticuerpos de donantes no humanos sobre marcos de anticuerpos estables y solubles. En una realización particularmente preferida, las CDR provienen de anticuerpos de conejo y los marcos son los descritos anteriormente.

20

Un método general para injertar CDR en marcos de aceptores humanos ha sido divulgado por Winter en la patente de Estados Unidos No. 5.225.539 y por Queen et al. en el documento WO9007861A1. La estrategia general para injertar CDR a partir de anticuerpos monoclonales de conejo en marcos seleccionados se relaciona con aquella de Winter et al. y Queen et al., pero diverge en ciertos aspectos clave. En particular, los métodos de la invención divergen de la metodología típica de Winter y Queen conocida en la técnica en que las estructuras de anticuerpos humanos como se describen en la presente memoria son particularmente adecuadas como aceptores universales para anticuerpos de donantes humanos o no humanos. Por lo tanto, a diferencia del método general de Winter y Queen, la secuencia del marco utilizada para los métodos de humanización de la invención no es necesariamente la secuencia del marco que exhibe la mayor similitud de secuencia con la secuencia del anticuerpo no humano (por ejemplo, conejo) del cual se derivan las CDR de donantes. Además, no se requiere injerto de residuos de marco de la secuencia del donante para soportar la conformación de la CDR. A lo sumo, pueden introducirse los aminoácidos de unión a antígeno localizados en el marco u otras mutaciones que se produjeron durante la hipermutación somática.

30

Los detalles particulares de los métodos de injerto para generar anticuerpos humanizados derivados de conejo con alta solubilidad y estabilidad se describen a continuación.

De acuerdo con esto, la descripción proporciona un método para humanizar un inmunoenlazante del donante de CDR de conejo que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera. El método comprende las etapas de:

5 (i) injertar en la cadena pesada al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente tres CDR del grupo que consiste en secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco aceptor de cadena pesada humana que tiene al menos 50%, preferiblemente al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, más preferiblemente al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1; y/o

10 (ii) injertar en la cadena ligera al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente tres CDR del grupo que consiste en secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en un marco aceptor de cadena ligera humana, teniendo el marco de cadena ligera humana al menos 50%, preferiblemente al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, más preferiblemente al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

15 En una realización preferida, el marco aceptor de cadena variable comprende (i) un marco de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos del marco seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6 y (ii) un marco de cadena ligera humana que comprende la secuencia de aminoácidos del marco de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 9.

20 En una realización muy preferida, el método comprende la etapa de (i) injertar las secuencias de cadena pesada de CDR1, CDR2 y CDR3 en la cadena pesada e (ii) injertar las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 en la cadena ligera de un inmunoenlazante que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, más preferiblemente al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7. Más preferiblemente, el inmunoenlazante es o comprende la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7.

En otra realización, para mejorar la unión al antígeno, el método puede comprender además la etapa de sustituir los residuos del marco aceptor por residuos del donante que están implicados en la unión al antígeno.

25 En realizaciones ilustrativas de los métodos de la invención, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo donante de CDR se identifica primero y las secuencias se alinean usando herramientas convencionales de alineamiento de secuencias (por ejemplo, algoritmo de Needleman-Wunsch y matrices de Blossum). La introducción de espacios y la nomenclatura de las posiciones de los residuos se puede hacer usando un sistema convencional de numeración de anticuerpos. Por ejemplo, puede usarse el sistema de numeración de AHO para dominios variables de inmunoglobulina. El esquema de numeración de Kabat también se puede aplicar ya que es el estándar más ampliamente adoptado para numerar los residuos en un anticuerpo. La numeración de Kabat puede, por ejemplo, ser asignado usando el programa SUBIM. Este programa analiza regiones variables de una secuencia de anticuerpos y numera la secuencia de acuerdo con el sistema establecido por Kabat y colaboradores (Deret et al., 1995). La definición de regiones marco y CDR generalmente se realiza siguiendo la definición de Kabat, que se basa en la variabilidad de secuencia y es la más comúnmente utilizada. Sin embargo, para CDR-H1, la designación es preferiblemente una combinación de las definiciones de Kabat, datos medios de contacto generados por análisis de contactos entre anticuerpo y antígeno de un subconjunto de estructuras complejas tridimensionales (MacCallum et al., 1996) y de Chotia que se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural (véase también la Fig. 1). Las tablas de conversión para los dos sistemas de numeración diferentes usados para identificar las posiciones de residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo se proporcionan en A. Honegger, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670. El sistema de numeración de Kabat se describe adicionalmente en Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación NIH No. 91-3242). El sistema de numeración de AHO se describe adicionalmente en Honegger, A. y Pluckthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 309: 657-670).

45 Los dominios variables de los anticuerpos monoclonales de conejo pueden, por ejemplo, clasificarse en los subgrupos humanos correspondientes usando, por ejemplo, una implementación en EXCEL de algoritmos de análisis de secuencia y métodos de clasificación basados en el análisis del repertorio de anticuerpos humanos (Knappik et al., 2000, J Mol Biol. Feb 11; 296 (1): 57-86).

50 Las conformaciones de CDR se pueden asignar a las regiones de unión al antígeno del donante, posteriormente se pueden identificar también las posiciones de los residuos requeridos para mantener las diferentes estructuras canónicas. Las estructuras canónicas de CDR para cinco de las seis regiones hipervariables de anticuerpos de conejo (L1, L2, L3, H1 y H2) se determinan usando la definición de Chothia (1989).

En una realización preferida, las CDR se generan, identifican y aíslan de acuerdo con el siguiente método: las células B, preferiblemente las células B de conejo, se incuban con (i) antígenos objetivo (preferiblemente purificados) o (ii) con células que expresan el antígeno objetivo en su superficie.

55 En el caso (ii), dichas células que expresan el antígeno objetivo pueden, por ejemplo, ser células de mamífero, preferiblemente células CHO o HEK293, células de levadura, preferiblemente esferoblastos de levadura, o células bacterianas que expresan naturalmente el objetivo de elección o se transforman para expresar la proteína objetivo en su superficie. Tras la expresión, el antígeno objetivo puede expresarse en la superficie celular integrado o unido a

la membrana celular. Las celdas pueden, por ejemplo, cultivarse como cepas aisladas en cultivo celular o aislarse de su entorno natural, por ejemplo, un tejido, un órgano o un organismo.

Proporcionar el antígeno objetivo expresado en la superficie de las células, es decir, el caso (ii), es especialmente preferido para proteínas transmembrana, incluso más preferentemente para proteínas que abarcan múltiples membranas, tales como GPCR (receptores acoplados a la proteína G) o canales iónicos o cualquier otra proteína cuya conformación nativa es difícil de mantener tras la expresión y purificación recombinantes. La inmunización tradicional con la proteína recombinante es en estos casos desaconsejable o imposible debido a la pérdida de conformación nativa de proteínas/complejos de membrana integrales durante el proceso de purificación o debido a cantidades insuficientes de proteína pura. En una realización preferida de la invención, un mamífero, más preferiblemente un conejo, se inmuniza con ADN en lugar de proteína recombinante, por ejemplo, mediante un protocolo de vacunación con ADN como se describe en el documento WO/2004/087216. La vacunación con ADN induce una respuesta inmune rápida contra un antígeno nativo. Dado que no se necesita proteína recombinante, esta tecnología es, por un lado, muy rentable, por otro lado, y más importante, este método permite la expresión nativa de complejos de membrana integrales y/o proteínas de membrana que abarcan múltiples membranas. Las células B pueden aislarse a partir de dicho mamífero inmunizado, preferiblemente de dicho conejo, o alternativamente pueden ser células B sin modificar.

En una etapa posterior de dicho método, las células B, preferiblemente las células B de memoria, se aíslan de los órganos linfáticos del animal inmunizado (tal como bazo o nódulos linfáticos), preferiblemente de conejos inmunizados. Las células B se incuban en una mezcla con células que expresan el antígeno en su superficie o con antígeno soluble marcado con fluorescencia. Se aíslan las células B que expresan anticuerpos objetivo específicos en su superficie y, por consiguiente, se unen al antígeno objetivo o al antígeno objetivo expresado en la superficie celular. En una realización muy preferida, las células B y/o las células objetivo se tiñen para permitir el aislamiento a través de la clasificación basada en citometría de flujo de complejos de células B/células objetivo o células B/antígeno. La citometría de flujo normalmente mide la fluorescencia emitida por células individuales cuando cruzan un rayo láser. Sin embargo, algunos investigadores ya han utilizado citómetros para investigar las interacciones célula-célula, por ejemplo, adhesión mediada por cadherinas (Panorchan et al., 2006, *J. Cell Science*, 119, 66-74; Leong et Hibma, 2005, *J. Immunol.*, 302, 116-124) o integrinas (Gawaz et al., 1991, *J. Clin. Invest*, 88, 1128-1134). Por lo tanto, en el caso (ii), las células que expresan el objetivo de elección se tiñen con un colorante fluorescente intracelular (por ejemplo, calceína). Las células B se tiñen con anticuerpos fluorescentes que se unen a marcadores específicos de la superficie celular. Por lo tanto, pueden seleccionarse "eventos" bicolor, que consisten en dos células que se adhieren entre sí a través de las interacciones objetivo con el receptor de células B (véase la Fig. 2).

Como las IgG generalmente tienen una afinidad más alta que las IgM, se seleccionan preferiblemente las células B positivas que expresan IgG, pero no IgM en su superficie (que es característica para las células B de memoria). Para dicho fin, se usa preferiblemente tinción multicolor, donde los anticuerpos específicos para IgG e IgM se marcan diferencialmente, por ejemplo, con APC y FITC, respectivamente.

En una realización particular, una lectura para la clasificación de células B también puede seleccionar la capacidad de esta interacción para bloquear/activar funcionalmente la señalización del receptor. Por ejemplo, las células B podrían incubarse con células que expresan funcionalmente un GPCR (receptor acoplado a proteína G). Se puede agregar un agonista que señala a través de un GPCR a la mezcla para inducir la salida de Ca^{2+} mediada por GPCR del retículo endoplásmico. En caso de que un anticuerpo presentado en una célula B bloqueara funcionalmente la señalización agonista, el flujo de Ca^{2+} también sería bloqueado por esta interacción célula-célula. El eflujo de Ca^{2+} se puede medir cuantitativamente mediante citometría de flujo. Por lo tanto, solo se clasificarán los conglomerados de células B/células objetivo que muestren aumento o disminución del eflujo de Ca^{2+} .

La etapa de selección es seguida por el cultivo de las células B en condiciones adecuadas para que los anticuerpos se secreten en el medio de cultivo. Los anticuerpos producidos son anticuerpos monoclonales. El cultivo puede implicar el uso de una línea celular auxiliar, tal como una línea celular auxiliar de timoma (por ejemplo, EL4-B5, véase Zubler et al., 1985, *J. Immunol.*, 134 (6): 3662-3668). Preferiblemente, se lleva a cabo una etapa de validación probando los anticuerpos generados para unión específica al objetivo, por ejemplo, para excluir anticuerpos que están dirigidos contra una proteína que se expresa en la superficie celular distinta de la proteína objetivo. Por ejemplo, CELISA, es decir, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) modificado, donde la etapa de recubrimiento se realiza con células enteras, es adecuado para dicho fin. Dicho método permite la evaluación de la selectividad y la capacidad de los anticuerpos para competir con el ligando.

Los anticuerpos generados en la etapa anteriormente mencionada se analizan a continuación para identificar las CDR de dichos anticuerpos. Esto puede implicar etapas tales como purificación de los anticuerpos, elucidación de su secuencia de aminoácidos y/o de la secuencia de ácidos nucleicos.

Finalmente, las CDR pueden luego injertarse sobre marcos aceptores, por ejemplo, por síntesis génica con el método de extensión del oligo, preferiblemente en los marcos de aceptores descritos anteriormente. En una realización, el proceso de injerto de CDR reconocido en la técnica puede usarse para transferir CDR de donantes a marcos de aceptores. En la mayoría de los casos, las tres CDR de la cadena pesada se trasplantan desde el anticuerpo del donante a un único marco aceptor y las tres CDR de la cadena ligera se trasplantan a un marco

diferente del aceptor. Se espera que no siempre sea necesario trasplantar todas las CDR, ya que algunas CDR pueden no estar implicadas en la unión al antígeno, y las CDR con diferentes secuencias (y la misma longitud) pueden tener el mismo plegamiento (y, por lo tanto, contactos del antígeno con los contactos de la cadena principal podrían conservarse a pesar de las diferentes secuencias). De hecho, dominios únicos (Ward et al., 1989, Nature 341, páginas 544-546) o incluso CDR individuales (R. Taub et al., 1989, J. Biol Chem 264, pp.259-265) pueden tener actividades de unión al antígeno solamente. Sin embargo, si se trasplantan todas o solo algunas de las CDR, la intención del injerto de CDR es trasplantar el mismo, o casi el mismo sitio de unión a antígeno, de anticuerpos de animal a humanos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.225.539 (Winter)).

En otra realización, las CDR del anticuerpo del donante pueden alterarse antes o después de su incorporación al marco aceptor.

Alternativamente, la caracterización de los anticuerpos se realizará solo en su formato de inmunoenlazante final. Para este enfoque, las secuencias de CDR de anticuerpos expresados en células B clasificadas se recuperan por RT-PCR de las células B clasificadas cultivadas o de las células B individuales clasificadas directamente. Para dicho fin, la multiplicidad de células B y/o la etapa de validación descrita anteriormente y/o la etapa de análisis como se describió anteriormente pueden no ser necesarias. La combinación de dos conjuntos de oligonucleótidos parcialmente superpuestos en los que un conjunto de oligonucleótidos codifica las CDR y un segundo conjunto que codifica las regiones marco de un andamiaje de inmunoenlazante adecuado permitiría generar inmunoenlazantes humanizados en un procedimiento de PCR de una etapa. La secuenciación, clonación y producción de alto rendimiento permitiría realizar una selección de clones basada en el rendimiento de los inmunoenlazantes humanizados purificados, en lugar de caracterizar la IgG secretada en el sobrenadante del cultivo celular. En una realización preferida de la misma, el inmunoenlazante es un scFv.

Sin embargo, el injerto de CDR puede dar como resultado una afinidad alterada del inmunoenlazante generado con el antígeno debido a residuos de marco que están en contacto con el antígeno. Tales interacciones pueden ser el resultado de una hipermutación somática. Por lo tanto, todavía puede ser necesario injertar dichos aminoácidos del marco del donante en el marco del anticuerpo humanizado. Los residuos de aminoácidos del inmunoenlazante no humano implicados en la unión al antígeno se pueden identificar mediante el examen de las secuencias y estructuras de la región variable del anticuerpo monoclonal de conejo. Cada residuo en el marco del donante de CDR que difiere de la línea germinal se puede considerar como relevante. Si no se puede establecer la línea germinal más cercana, la secuencia se puede comparar con el consenso del subgrupo o el consenso de secuencias de conejo con un alto porcentaje de similitud. Los residuos raros del marco se consideran posibles resultados de la hipermutación somática y, por lo tanto, desempeñan un papel en la unión.

Los anticuerpos de la invención se pueden optimizar adicionalmente para mostrar propiedades funcionales mejoradas, por ejemplo, solubilidad y/o estabilidad mejoradas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se optimizan de acuerdo con la metodología de "consenso funcional" divulgada en la solicitud PCT serial No. PCT/EP2008/001958, titulada "Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies", presentada el 12 de marzo de 2008.

Por ejemplo, los inmunoenlazantes de la invención se pueden comparar con una base de datos de scFv seleccionados funcionalmente para identificar posiciones de residuos de aminoácidos que son más o menos tolerantes a la variabilidad que las posiciones correspondientes en inmunoenlazante, lo que indica que tales las posiciones identificadas de residuos pueden ser adecuadas para ingeniería genética para mejorar la funcionalidad tal como la estabilidad y/o la solubilidad.

Los ejemplos de posiciones de residuos del marco para sustitución y ejemplos de sustituciones en el arco se describen en la solicitud PCT No. PCT/CH2008/000285, titulada "Methods of Modifying Antibodies, and Modified Antibodies with Improved Functional Properties", presentada el 25 de junio de 2008, y la solicitud PCT No. PCT/CH2008/000284, titulada "Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies", presentada el 25 de junio de 2008. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes sustituciones en una posición de aminoácido (se hace referencia a la numeración de AHO para cada una de las posiciones de aminoácidos enumeradas a continuación) en la región variable de la cadena pesada de un inmunoenlazante de la divulgación:

- (a) Q o E en la posición del aminoácido 1;
- (b) Q o E en la posición del aminoácido 6;
- (c) T, S o A en la posición del aminoácido 7, más preferiblemente T o A, incluso más preferiblemente T;
- (d) A, T, P, V o D, más preferiblemente T, P, V o D, en la posición del aminoácido 10,
- (e) L o V, más preferiblemente L, en la posición del aminoácido 12,
- (f) V, R, Q, M o K, más preferiblemente V, R, Q o M en la posición del aminoácido 13;

ES 2 677 003 T3

- (g) R, M, E, Q o K, más preferiblemente R, M, E o Q, incluso más preferiblemente R o E, en la posición del aminoácido 14;
- (h) L o V, más preferiblemente L, en la posición del aminoácido 19;
- (i) R, T, K o N, más preferiblemente R, T o N, incluso más preferiblemente N, en la posición del aminoácido 20;
- 5 (j) I, F, L o V, más preferiblemente I, F o L, incluso más preferiblemente I o L, en la posición del aminoácido 21;
- (k) R o K, más preferiblemente K, en la posición del aminoácido 45;
- (l) T, P, V, A o R, más preferiblemente T, P, V o R, incluso más preferiblemente R, en la posición del aminoácido 47;
- (m) K, Q, H o E, más preferiblemente K, H o E, incluso más preferiblemente K, en la posición del aminoácido 50;
- (n) M o I, más preferiblemente I, en la posición del aminoácido 55;
- 10 (o) K o R, más preferiblemente K, en la posición del aminoácido 77;
- (p) A, V, L o I, más preferiblemente A, L o I, incluso más preferiblemente A, en la posición del aminoácido 78;
- (q) E, R, T o A, más preferiblemente E, T o A, incluso más preferiblemente E, en la posición del aminoácido 82;
- (r) T, S, I o L, más preferiblemente T, S o L, incluso más preferiblemente T, en la posición del aminoácido 86;
- (s) D, S, N o G, más preferiblemente D, N o G, incluso más preferiblemente N, en la posición del aminoácido 87;
- 15 (t) A, V, L o F, más preferiblemente A, V o F, incluso más preferiblemente V, en la posición del aminoácido 89;
- (u) F, S, H, D o Y, más preferiblemente F, S, H o D, en la posición del aminoácido 90;
- (v) D, Q o E, más preferiblemente D o Q, incluso más preferiblemente D, en la posición del aminoácido 92;
- (w) G, N, T o S, más preferiblemente G, N o T, incluso más preferiblemente G, en la posición del aminoácido 95;
- (x) T, A, P, F o S, más preferiblemente T, A, P o F, incluso más preferiblemente F, en la posición del aminoácido 98;
- 20 (y) R, Q, V, I, M, F o L, más preferiblemente R, Q, I, M, F o L, incluso más preferiblemente Y, incluso más preferiblemente L, en la posición del aminoácido 103; y
- (z) N, S o A, más preferiblemente N o S, incluso más preferiblemente N, en la posición del aminoácido 107.
- De forma adicional o alternativa, se pueden introducir una o más de las siguientes sustituciones en la región variable de la cadena ligera de un inmunoenlazante de la divulgación:
- 25 (aa) Q, D, L, E, S o I, más preferiblemente L, E, S o I, incluso más preferiblemente L o E, en la posición del aminoácido 1;
- (bb) S, A, Y, I, P o T, más preferiblemente A, Y, I, P o T, incluso más preferiblemente P o T en la posición del aminoácido 2;
- (cc) Q, V, T o I, más preferiblemente V, T o I, incluso más preferiblemente V o T, en la posición del aminoácido 3;
- 30 (dd) V, L, I o M, más preferiblemente V o L, en la posición del aminoácido 4;
- (ee) S, E o P, más preferiblemente S o E, incluso más preferiblemente S, en la posición del aminoácido 7;
- (ff) T o I, más preferiblemente I, en la posición del aminoácido 10;
- (gg) A o V, más preferiblemente A, en la posición del aminoácido 11;
- (hh) S o Y, más preferiblemente Y, en la posición del aminoácido 12;
- 35 (ii) T, S o A, más preferiblemente T o S, incluso más preferiblemente T, en la posición del aminoácido 14;
- (jj) S o R, más preferiblemente S, en la posición del aminoácido 18;
- (kk) T o R, más preferiblemente R, en la posición del aminoácido 20;
- (ll) R o Q, más preferiblemente Q, en la posición del aminoácido 24;
- (mm) H o Q, más preferiblemente H, en la posición del aminoácido 46;

- (nn) K, R o I, más preferiblemente R o I, incluso más preferiblemente R, en la posición del aminoácido 47;
- (oo) R, Q, K, E, T o M, más preferiblemente Q, K, E, T o M, en la posición del aminoácido 50;
- (pp) K, T, S, N, Q o P, más preferiblemente T, S, N, Q o P, en la posición del aminoácido 53;
- (qq) I o M, más preferiblemente M, en la posición del aminoácido 56;
- 5 (rr) H, S, F o Y, más preferiblemente H, S o F, en la posición del aminoácido 57;
- (ss) I, V o T, más preferiblemente V o T, R, incluso más preferiblemente T, en la posición del aminoácido 74;
- (tt) R, Q o K, más preferiblemente R o Q, incluso más preferiblemente R, en la posición del aminoácido 82;
- (uu) L o F, más preferiblemente F, en la posición del aminoácido 91;
- (vv) G, D, T o A, más preferiblemente G, D o T, incluso más preferiblemente T, en la posición del aminoácido 92;
- 10 (xx) S o N, más preferiblemente N, en la posición del aminoácido 94;
- (yy) F, Y o S, más preferiblemente Y o S, incluso más preferiblemente S, en la posición del aminoácido 101; y
- (zz) D, F, H, E, L, A, T, V, S, G o I, más preferiblemente H, E, L, A, T, V, S, G o I, incluso más preferiblemente A o V, en la posición del aminoácido 103.

15 En otras realizaciones, los inmunoenlazantes de la invención comprenden una o más de las mutaciones potenciadoras de la estabilidad descritas en la solicitud provisional de Estados Unidos con serial No. 61/075.692, titulada " Solubility Optimization of Immunobinders", presentada el 25 de junio de 2008. En ciertas realizaciones preferidas, el inmunoenlazante comprende una mutación potenciadora de la solubilidad en una posición de aminoácido seleccionada del grupo de posiciones de aminoácidos de la cadena pesada que consiste en 12, 103 y 144 (convención de numeración de AHo). En una realización preferida, el inmunoenlazante comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) serina (S) en la posición 12 del aminoácido de la cadena pesada; (b) serina (S) o treonina (T) en la posición del aminoácido de la cadena pesada 103; y (c) serina (S) o treonina (T) en la posición 144 del aminoácido de la cadena pesada. En otra realización, el inmunoenlazante comprende las siguientes sustituciones: (a) serina (S) en la posición 12 del aminoácido de la cadena pesada; (b) serina (S) o treonina (T) en la posición del aminoácido de la cadena pesada 103; y (c) serina (S) o treonina (T) en la posición 144 del aminoácido de la cadena pesada.

20 En ciertas realizaciones preferidas, el inmunoenlazante comprende mutaciones potenciadoras de la estabilidad en un residuo estructural del marco aceptor de la cadena ligera en al menos una de las posiciones 1, 3, 4, 10, 47, 57, 91 y 103 de la región variable de la cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de AHo. En una realización preferida, el marco aceptor de la cadena ligera comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en (a) ácido glutámico (E) en la posición 1, (b) valina (V) en la posición 3, (c) leucina (L) en la posición 4; (d) serina (S) en la posición 10; (e) arginina (R) en la posición 47; (e) serina (S) en la posición 57; (f) fenilalanina (F) en la posición 91; y (g) valina (V) en la posición 103.

25 Se puede usar cualquiera de una variedad de métodos disponibles para producir un anticuerpo humanizado que comprende una mutación como se describió anteriormente.

30 De acuerdo con esto, la presente divulgación proporciona un inmunoenlazador humanizado de acuerdo con el método descrito en este documento.

En ciertas realizaciones preferidas, el antígeno objetivo de dicho inmunoenlazador es VEGF o TNF α .

35 Los polipéptidos descritos en la presente divulgación o generados por un método de la presente invención pueden, por ejemplo, sintetizarse usando técnicas conocidas en el arte. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones variables deseadas se pueden sintetizar y los polipéptidos producidos por métodos recombinantes.

40 Por ejemplo, una vez que se ha decidido la secuencia de una región variable humanizada, esa región variable o un polipéptido que la comprende se pueden elaborar mediante técnicas bien conocidas en el arte de la biología molecular. Más específicamente, las técnicas de ADN recombinante pueden usarse para producir una amplia gama de polipéptidos transformando una célula huésped con una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica la región variable deseada (por ejemplo, una cadena pesada o ligera modificada; dominios variables de los mismos, u otros fragmentos de unión a antígeno de los mismos)).

45 En una realización, se puede preparar un vector de expresión que incluye un promotor que está operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica al menos V_H o V_L. Si es necesario, o se desea, se puede preparar un segundo vector de expresión que incluye un promotor que está unido operablemente a una secuencia de ADN que

codifica el dominio variable complementario (es decir, cuando el vector de expresión parental codifica V_H, el segundo vector de expresión codifica V_L y viceversa). Una línea celular (por ejemplo, una línea celular de mamífero inmortalizada) puede transformarse después con uno o ambos vectores de expresión y cultivarse en condiciones que permitan la expresión del dominio quimérico variable o el anticuerpo quimérico (véase, por ejemplo, la solicitud internacional de patente No. PCT/GB85/00392 de Neuberger et al).

En una realización, pueden elaborarse regiones variables que comprenden CDR de donantes y secuencias de aminoácidos de FR del aceptor y a continuación se introducen cambios en las moléculas de ácido nucleico para efectuar la sustitución de aminoácidos de CDR.

Los métodos reconocidos en la técnica a modo de ejemplo para fabricar una molécula de ácido nucleico que codifica una variante de secuencia de aminoácido de un polipéptido incluyen, pero no se limitan a, preparación mediante mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótido), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de un ADN preparado previamente que codifica el polipéptido.

La mutagénesis dirigida al sitio es un método preferido para preparar variantes de sustitución. Esta técnica es bien conocida en el arte (véase, por ejemplo, Carter et al., *Nucleic Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985) y Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488 (1987). Brevemente, al llevar a cabo la mutagénesis del ADN dirigida al sitio, el ADN parental se altera hibridando primero un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con una única cadena de dicho ADN parental. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena completa, usando el oligonucleótido hibridado como cebador, y usando la única cadena del ADN parental como molde. Por lo tanto, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada se incorpora en el ADN de cadena doble resultante.

La mutagénesis por PCR también es adecuada para elaborar variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos. Ver Higuchi, en *PCR Protocols*, páginas 177-183 (Academic Press, 1990); y Vallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17: 723-733 (1989). En resumen, cuando se usan pequeñas cantidades de ADN molde como material de partida en una PCR, los cebadores que difieren ligeramente en secuencia de la región correspondiente en un ADN molde pueden usarse para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia molde solo en las posiciones donde los cebadores difieren del molde.

Otro método para preparar variantes, mutagénesis en casete, se basa en la técnica descrita por Wells et al., *Gene* 34: 315-323 (1985). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN a mutar. Se identifican el codón o los codones en el ADN original a mutar. Debe haber un sitio único de endonucleasa de restricción en cada lado del sitio o los sitios de mutación identificados. Si no existen tales sitios de restricción, se pueden generar usando el método de mutagénesis mediado por oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlos en ubicaciones apropiadas en el ADN que codifica el polipéptido. El ADN del plásmido se corta en estos sitios para linealizarlo. Un oligonucleótido de cadena doble que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la mutación o mutaciones deseadas se sintetiza usando procedimientos estándar, donde las dos cadenas del oligonucleótido se sintetizan por separado y luego se hibridan juntas usando técnicas estándar. Este oligonucleótido de cadena doble se denomina casete. Este casete está diseñado para tener extremos 5' y 3' que son compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de manera que se puede ligar directamente al plásmido. Este plásmido ahora contiene la secuencia de ADN mutada.

Una región variable generada por los métodos de la invención puede modelarse de nuevo y modificarse adicionalmente para aumentar adicionalmente la unión al antígeno. Por lo tanto, las etapas descritas anteriormente pueden estar precedidas o seguidas por etapas adicionales, que incluyen, por ejemplo, maduración por afinidad. Además, los datos empíricos de unión se pueden utilizar para una mayor optimización.

Un experto en la técnica entenderá que los polipéptidos de la invención pueden modificarse adicionalmente de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos, pero no en la actividad deseada. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones adicionales de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales". Por ejemplo, un residuo de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina puede reemplazarse con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, una cadena de aminoácidos puede reemplazarse con una cadena estructuralmente similar que difiere en el orden y/o composición de los miembros de la familia de la cadena lateral, es decir, puede hacerse una sustitución conservadora, en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar.

Se han definido en la técnica las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Aparte de las sustituciones de aminoácidos, la presente invención contempla otras modificaciones, por ejemplo, a secuencias de aminoácidos de la región Fc con el fin de generar una variante de región Fc con función efectora alterada. Uno puede, por ejemplo, eliminar uno o más residuos de aminoácidos de la región Fc con el fin de reducir o mejorar la unión a un FcR. En una realización, se pueden modificar uno o más de los residuos de la región Fc para generar dicha variante de región Fc. Generalmente, no se eliminarán más de uno a aproximadamente diez residuos de la región Fc de acuerdo con esta realización de la invención. La región Fc en la presente memoria que comprende una o más supresiones de aminoácidos conservará preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de la región Fc de partida o de una región Fc humana de secuencia nativa.

- 5
10
15
- También se pueden hacer variantes de la región Fc de inserción de aminoácidos, cuyas variantes tienen una función efectora alterada. Por ejemplo, se puede introducir al menos un residuo de aminoácido (por ejemplo, uno o dos residuos de aminoácidos y generalmente no más de diez residuos) adyacente a una o más de las posiciones de la región Fc identificadas en la presente memoria porque afectan a la unión de FcR. Por "adyacente" se entiende dentro de uno a dos residuos de aminoácidos de un residuo de la región Fc identificado en este documento. Dichas variantes de la región Fc pueden mostrar un enlace de FcRn mejorado o disminuido.

- 20
- Dichas variantes de la región Fc generalmente comprenderán al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En una realización, las modificaciones de aminoácidos se pueden combinar. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc. sustituciones en la misma, por ejemplo, de las posiciones específicas de la región Fc identificadas aquí. En otra realización, un polipéptido puede tener una unión alterada a FcRn y a otro receptor de Fc.

- 25
30
35
- En una realización, los polipéptidos descritos en la presente divulgación o generados mediante un método de la presente divulgación, por ejemplo, regiones variables de Ig humanizadas y/o polipéptidos que comprenden regiones variables de Ig humanizadas pueden producirse por métodos recombinantes. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido puede insertarse en un vector de expresión adecuado para expresión recombinante. Cuando el polipéptido es un anticuerpo, los polinucleótidos que codifican regiones variables adicionales de cadena ligera y pesada, opcionalmente unidos a regiones constantes, pueden insertarse en el mismo o diferente vector de expresión. Una secuencia de etiqueta de afinidad (por ejemplo, una etiqueta His(6)) se puede unir o incluir opcionalmente dentro de la secuencia polipeptídica para facilitar la purificación más adelante. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina están unidos operativamente a secuencias de control en el vector o vectores de expresión que aseguran la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina. Las secuencias de control de expresión incluyen, pero sin limitación, promotores (por ejemplo, promotores heterólogos o asociados de forma natural), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huéspedes eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación del polipéptido.

- 40
- Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.704.362).

- 45
- E. coli* es un huésped procariota particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente descripción. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y varias especies de *Pseudomonas*.

- 50
- Otros microbios, tales como levadura, también son útiles para expresión. *Saccharomyces* y *Picia* son ejemplos de huéspedes de levadura, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de metanol, maltosa y galactosa.

Dentro del alcance de la presente descripción, *E. coli* y *S. cerevisiae* son células huéspedes preferidas.

- 55
- Además de microorganismos, el cultivo de tejido de mamífero también puede usarse para expresar y producir los polipéptidos de la presente descripción (por ejemplo, polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos). Véase Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, NY, NY (1987). Las células eucariotas son realmente preferidas porque en la técnica se han desarrollado varias líneas celulares huéspedes adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas) e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, células 293, líneas celulares de mieloma, células B transformadas e hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), y

sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Las secuencias preferidas de control de la expresión son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992).

5 Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus se puede usar para otros huéspedes celulares. (Véase, generalmente, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989). Otros métodos utilizados para transformar células de mamíferos incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase en general, Sambrook et al., citado anteriormente). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden microinyectarse en oocitos fertilizados, o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de tales células pueden transferirse a oocitos enucleados.

20 El polipéptido sujeto también se puede incorporar en transgenes para introducción en el genoma de un animal transgénico y expresión posterior, por ejemplo, en la leche de un animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer et al., 5.741.957; Rosen 5.304.489; y Meade 5.849.992. Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en enlace operable con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o lactoglobulina beta.

Los polipéptidos se pueden expresar usando un solo vector o dos vectores. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada de anticuerpo se pueden clonar en vectores de expresión separados y cotransfectarse en células.

En una realización, las secuencias señal pueden usarse para facilitar la expresión de polipéptidos de la divulgación.

25 Una vez expresados, los polipéptidos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad (por ejemplo, proteína A o proteína G), cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase en general Scopes, Proteins Purification (Springer-Verlag, NY, (1982)).

30 Ya sean las regiones variables de Ig humanizadas o los polipéptidos que las comprenden, pueden expresarse mediante células huésped o líneas celulares en cultivo. También se pueden expresar en células *in vivo*. La línea celular que se transforma (por ejemplo, transfecta) para producir el anticuerpo alterado puede ser una línea celular de mamífero inmortalizada, como las de origen linfóide (por ejemplo, una línea celular de mieloma, hibridoma, trioma o cuadroma). La línea celular también puede incluir células linfoides normales, tales como células B, que se han inmortalizado por transformación con un virus (por ejemplo, el virus de Epstein-Barr).

35 Aunque típicamente la línea celular utilizada para producir el polipéptido es una línea celular de mamífero, también se pueden usar líneas celulares de otras fuentes (tales como bacterias y levaduras). En particular, las cepas bacterianas derivadas de *E. coli* se pueden usar, especialmente, por ejemplo, presentación de fagos.

40 Algunas líneas celulares linfoides inmortalizadas, tales como líneas celulares de mieloma, en su estado normal, secretan cadenas ligeras o pesadas de Ig aisladas. Si dicha línea celular se transforma con un vector que expresa un anticuerpo alterado, preparado durante el proceso de la divulgación, no será necesario llevar a cabo las etapas restantes del proceso, siempre que la cadena secretada normalmente sea complementaria al dominio variable de la cadena de Ig codificada por el vector preparado anteriormente.

Si la línea celular inmortalizada no secreta o no secreta una cadena complementaria, será necesario introducir en las células un vector que codifique la cadena complementaria apropiada o un fragmento de la misma.

45 En el caso en que la línea celular inmortalizada secreta una cadena ligera o pesada complementaria, la línea celular transformada puede producirse, por ejemplo, transformando una célula bacteriana adecuada con el vector y luego fusionando la célula bacteriana con la línea celular inmortalizada (por ejemplo, por fusión de esferoplastos). Alternativamente, el ADN puede introducirse directamente en la línea celular inmortalizada mediante electroporación.

50 En una realización, una región variable de Ig humanizada como se describe en la presente divulgación o generada por un método de la presente divulgación puede estar presente en un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo. Los fragmentos pueden producirse en forma recombinante y manipularse por ingeniería genética, sintetizarse o producirse por digestión de un anticuerpo con una enzima proteolítica. Por ejemplo, el fragmento puede ser un fragmento Fab; la digestión con papaína rompe el anticuerpo en la región, antes del enlace disulfuro entre cadenas (es decir, V_H-V_H), que une las dos cadenas pesadas. Esto da como resultado la formación de dos fragmentos idénticos que contienen la cadena ligera y los dominios V_H y C_{H1} de la cadena pesada. Alternativamente, el fragmento puede ser un fragmento F(ab')₂. Estos fragmentos pueden crearse digiriendo un anticuerpo con pepsina, que escinde la cadena pesada después del enlace disulfuro entre cadenas, y da como resultado un fragmento que contiene ambos sitios de unión a antígeno. Todavía otra alternativa es usar un anticuerpo de "cadena

sencilla". Los fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) se pueden construir de varias formas. Por ejemplo, el C-terminal de V_H puede estar unido al N-terminal de V_L. Típicamente, un enlazador (por ejemplo, (GGGS)₄) se coloca entre V_H y V_L. Sin embargo, el orden en el que se pueden enlazar las cadenas se puede revertir, y se pueden incluir etiquetas que faciliten la detección o purificación (por ejemplo, etiquetas Myc, His o FLAG) (etiquetas como estas pueden adjuntarse a cualquier anticuerpo). o fragmento de anticuerpo de la divulgación; su uso no está restringido a scFv). Por consiguiente, y como se indica a continuación, los anticuerpos marcados están dentro del alcance de la presente divulgación. En realizaciones alternativas, los anticuerpos descritos en este documento, o generados por los métodos descritos en este documento, pueden ser dímeros de cadena pesada o dímeros de cadena ligera. Además, se puede usar una cadena ligera o pesada de anticuerpo, o partes de la misma, por ejemplo, un anticuerpo de dominio único (DAb).

En otra realización, una región variable de Ig humanizada como se describe en la presente invención o generada por un método de la presente divulgación está presente en un anticuerpo de cadena sencilla (ScFv) o un minicuerpo (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.837.821 o el documento WO 94/09817A1). Los minicuerpos son moléculas dimericas formadas por dos cadenas polipeptídicas que comprenden cada una, una molécula de ScFv (un único polipéptido que comprende uno o más sitios de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio V_L unido mediante un enlazador flexible a un dominio V_H fusionado a un dominio CH3 a través de un péptido de conexión). Las moléculas de ScFv se pueden construir en una orientación V_H-enlazador-V_L u orientación V_L-enlazador-V_H. La bisagra flexible que une los dominios V_L y V_H que forman el sitio de unión al antígeno comprende preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. Un péptido de conexión a modo de ejemplo para este fin es (Gly4Ser)₃ (Huston et al., (1988). PNAS, 85: 5879). Otros péptidos de conexión son conocidos en la técnica.

Los métodos para producir anticuerpos de cadena sencilla son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, Ho et al., (1989), Gene, 77:51; Bird et al., (1988), Science 242: 423; Pantoliano et al., (1991), Biochemistry 30: 10117; Milenic et al., (1991), Cancer Research, 51: 6363; Takkinen et al., (1991), Protein Engineering 4: 837. Los minicuerpos pueden prepararse construyendo un componente de ScFv y conectando el componente péptido-CH3 usando métodos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.837.821 o el documento WO 94/09817 A1). Estos componentes se pueden aislar de plásmidos separados como fragmentos de restricción y luego se ligan y vuelven a clonarse en un vector apropiado. El ensamblaje apropiado puede verificarse mediante digestión de restricción y análisis de secuencia de ADN. En una realización, un minicuerpo de la divulgación comprende un péptido de conexión. En una realización, el péptido de conexión comprende un enlazador Gly/Ser, por ejemplo, GGGSSGGSSGG.

En otra realización, se puede construir un minicuerpo tetravalente. Los minicuerpos tetravalentes se pueden construir de la misma manera que los minicuerpos, excepto que dos moléculas de ScFv se unen usando un enlazador flexible, por ejemplo, que tiene una secuencia de aminoácidos (G₄S)₄G₃AS.

En otra realización, una región variable humanizada como se describe en la presente divulgación o generada por un método de la presente divulgación puede estar presente en un diacuerpo. Los diacuerpos son similares a las moléculas de scFv, pero habitualmente tienen un enlazador de residuo de aminoácido corto (menos de 10 y preferiblemente 1-5) que conecta ambos dominios variables, de modo que los dominios V_L y V_H en la misma cadena polipeptídica no pueden interactuar. En cambio, el dominio V_L y V_H de una cadena polipeptídica interactúa con el dominio V_H y V_L (respectivamente) en una segunda cadena polipeptídica (documento WO 02/02781).

En otra realización, una región variable humanizada de la invención puede estar presente en un fragmento o porción inmunorreactiva de un anticuerpo (por ejemplo, una molécula de scFv, un minicuerpo, un minicuerpo tetravalente o un diacuerpo) unido operativamente a una porción de unión a FcR. En un ejemplo de realización, la porción de unión a FcR es una región Fc completa.

Preferiblemente, los métodos de humanización descritos en la presente memoria dan como resultado regiones variables de Ig en las que la afinidad por el antígeno no cambia sustancialmente en comparación con el anticuerpo del donante.

En una realización, los polipéptidos que comprenden los dominios variables de la presente divulgación se unen a antígenos con una afinidad de unión mayor que (o igual a) una constante de asociación K_a de aproximadamente 10⁵ M⁻¹, 10⁶ M⁻¹, 10⁷ M⁻¹, 10⁸ M⁻¹, 10⁹ M⁻¹, 10¹⁰ M⁻¹, 10¹¹ M⁻¹, o 10¹² M⁻¹, (incluyendo afinidades intermedias de estos valores).

La afinidad, avidéz y/o especificidad se pueden medir de varias formas. En general, e independientemente de la manera precisa en que se defina o mida la afinidad, los métodos de la divulgación mejoran la afinidad del anticuerpo cuando generan un anticuerpo que es superior en cualquier aspecto de su aplicación clínica al anticuerpo (o anticuerpos) del cual era hecho (por ejemplo, los métodos de la invención se consideran efectivos o exitosos cuando un anticuerpo modificado puede administrarse a una dosis más baja o con menos frecuencia o por una vía de administración más conveniente que un anticuerpo (o anticuerpos) del cual se formó).

Más específicamente, la afinidad entre un anticuerpo y un antígeno al que se une puede medirse mediante diversos ensayos, que incluyen, por ejemplo, un ensayo de ELISA, un ensayo BiaCore o el ensayo KinExA^{MR} 3000 (disponible a través de Sapidyne Instruments (Boise, ID)). Brevemente, las perlas de sefarosa están recubiertas con antígeno (el antígeno usado en los métodos de la divulgación puede ser cualquier antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno cancerígeno, una proteína de superficie celular o proteína secretada, un antígeno de un patógeno (por ejemplo, un antígeno bacteriano o viral (por ejemplo, un antígeno del VIH, un antígeno de la gripe o un antígeno de la hepatitis)) o un alérgeno) mediante unión covalente. Se preparan diluciones del anticuerpo a probar y cada dilución se agrega a los pozos designados en una placa. Luego se agrega anticuerpo de detección (por ejemplo, conjugado IgG-HRP antihumano de cabra) a cada pozo seguido por un sustrato cromogénico (por ejemplo, HRP). La placa se lee luego en un lector de placas de ELISA a 450 nm y se calculan los valores EC₅₀ (se entiende, sin embargo, que los métodos descritos aquí son generalmente aplicables; no están limitados a la producción de anticuerpos que se unen a cualquier antígeno particular o clase de antígenos).

Los expertos en la técnica reconocerán que determinar la afinidad no siempre es tan simple como mirar una sola figura. Dado que los anticuerpos tienen dos brazos, su afinidad aparente suele ser mucho mayor que la afinidad intrínseca entre la región variable y el antígeno (se cree que esto se debe a la avidéz). La afinidad intrínseca se puede medir usando fragmentos scFv o Fab.

En otro aspecto, la presente divulgación presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo de conejo humanizado, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones de unión a antígeno del mismo, puede derivarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une al menos a dos sitios de unión diferentes o moléculas objetivo. El anticuerpo de la invención puede derivarse o unirse a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas objetivo diferentes; tales moléculas multiespecíficas también se pretende que estén abarcadas por el término "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, antígenos específicos de tumor o específicos de patógenos, péptidos o miméticos de unión, de modo que resulta una molécula biespecífica. Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera molécula de unión que tiene especificidad por un primer objetivo y una segunda molécula de unión que tiene especificidad por uno o más epítopos objetivo adicionales.

En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla como se describe en Ladner et al., patente de Estados Unidos No. 4.946.778.

Aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky et al., (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al., (1985) Science 229: 81-83), y Glennie et al., (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles a través de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse a través de unión por sulfhidrilo de las regiones de bisagra del C-terminal de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región de bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos de sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para

preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.260.203; la patente de Estados Unidos No. 5.455.030; la patente de Estados Unidos No. 4.881.175; la patente de Estados Unidos No. 5.132.405; la patente de Estados Unidos No. 5.091.513; la patente de Estados Unidos No. 5.476.786; la patente de Estados Unidos No. 5.013.653; la patente de Estados Unidos No. 5.258.498; y la patente de Estados Unidos No. 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos puede confirmarse, por ejemplo, mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), una clasificación de células individuales basada en citometría de flujo (por ejemplo, análisis de FACS), bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de anticuerpos se pueden detectar usando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ligado a una enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-VEGF. Alternativamente, los complejos se pueden detectar usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Séptimo curso de entrenamiento en técnicas de ensayo con radioligandos, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o por autorradiografía.

En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo de conejo humanizado, o un fragmento del mismo, conjugado con un residuo terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan aquí "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, que mata) células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracín diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliqueamicina está disponible comercialmente (Mylotarg^{MR}; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención usando la tecnología de enlazador disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Puede elegirse un enlazador que es, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para una discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito, G. et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail, P.A. et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3: 207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3: 1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo¹³¹, indio ¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, incluyendo Zevalin^{MR} (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar^{MR} (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y el residuo de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el residuo de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1

("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dichos residuos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer*

Therapy, Reisfeld et al., (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2da Ed.), Robinson et al., (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al., (eds.), páginas, 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

En un aspecto, la divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de conejo humanizados para el tratamiento de la enfermedad. El término "formulación farmacéutica" se refiere a preparaciones que están en tal forma que permiten que la actividad biológica del anticuerpo o derivado del anticuerpo sea inequívocamente efectiva, y que no contiene componentes adicionales que son tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación. Los excipientes "farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) son aquellos que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis efectiva del ingrediente activo empleado.

Una formulación "estable" es aquella en la que el anticuerpo o derivado de anticuerpo en el mismo retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Preferiblemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos 1 año o durante al menos 2 años. Además, la formulación es preferiblemente estable después de congelación (a, por ejemplo, -70°C) y descongelación de la formulación.

Un anticuerpo o derivado de anticuerpo "conserva su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras el examen visual de color y/o claridad, o según se mide mediante dispersión de luz UV o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Un anticuerpo o derivado de anticuerpo "conserva su estabilidad química" en una formulación farmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína aún conserva su actividad biológica como se define a continuación. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando las formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede implicar modificación de tamaño (por ejemplo, recorte) que puede evaluarse usando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o ionización por desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de la carga (por ejemplo, que se produce como resultado de la desamidación) que puede evaluarse mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo.

Un anticuerpo o derivado de anticuerpo "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el tiempo en que la formulación farmacéutica se preparó como se determinó en un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo. Otros ensayos de "actividad biológica" para anticuerpos se detallan a continuación.

Por "isotónico" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de presión de vapor o un tipo de congelación con hielo, por ejemplo.

Un "poliol" es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcares. Los polioles preferidos en la presente invención tienen un peso molecular que es inferior a aproximadamente 600 kD (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 kD). Un "azúcar reductor" es uno que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un "azúcar no reductor" es aquel que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Los ejemplos de azúcares reductores son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melicitosa y rafinosa. Manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol son ejemplos de alcoholes de azúcar. En cuanto a los ácidos de azúcar, estos incluyen L-gluconato y sales metálicas de los mismos. Cuando se desea que la formulación sea estable a la congelación-descongelación, el poliol es

preferiblemente uno que no cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20°C) de manera que desestabilice el anticuerpo en la formulación. Los azúcares no reductores tales como sacarosa y trehalosa son los polioles preferidos en la presente invención, prefiriéndose la trehalosa sobre la sacarosa, debido a la estabilidad superior de la solución de la trehalosa.

5 Como se usa en el presente documento, "regulador" se refiere a una solución regulada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El regulador de esta invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0; preferiblemente de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,5; y lo más preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5,0. Los ejemplos de reguladores que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros reguladores de ácidos orgánicos. Cuando se desea una formulación estable al congelamiento-descongelamiento, el regulador preferiblemente no es fosfato.

10 En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo o derivado de anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o tratamiento de un trastorno para el tratamiento del cual el anticuerpo o anticuerpo derivado es efectivo. Una "enfermedad/trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo o derivado de anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

15 Un "conservante" es un compuesto que se puede incluir en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en el mismo, facilitando así la producción de una formulación de uso múltiple, por ejemplo. Ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, butilo y alcohol bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferido en este documento es alcohol bencílico.

20 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos o compuestos derivados de anticuerpos, junto con al menos un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, uno o más entre agua, reguladores (por ejemplo, solución salina regulada neutra o solución salina regulada con fosfato), etanol, aceite mineral, aceite vegetal, dimetilsulfóxido, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión y/o conservantes. Como se indicó anteriormente, otros ingredientes activos pueden (pero no necesitan) incluirse en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento.

25 Un vehículo es una sustancia que puede estar asociada con un anticuerpo o derivado de anticuerpo antes de la administración a un paciente, a menudo con el propósito de controlar la estabilidad o la biodisponibilidad del compuesto. Los vehículos para uso dentro de tales formulaciones son generalmente biocompatibles y también pueden ser biodegradables. Los vehículos incluyen, por ejemplo, moléculas monovalentes o multivalentes tales como albúmina de suero (por ejemplo, humana o bovina), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidoaminas. Los vehículos también incluyen materiales de soporte sólidos tales como perlas y micropartículas que comprenden, por ejemplo, polilactato, poliglicolato, poli(láctido-co-glicólido), poliacrilato, látex, almidón, celulosa o dextrano. Un vehículo puede soportar los compuestos en una variedad de formas, incluyendo enlaces covalentes (directamente o a través de un grupo enlazador), interacción o mezcla no covalente.

30 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier forma de administración apropiada, incluyendo, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, rectal o parenteral. En ciertas realizaciones, se prefieren composiciones en una forma adecuada para uso oral. Tales formas incluyen, por ejemplo, píldoras, comprimidos, pastillas, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. En aún otras realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente invención pueden formularse como un liofilizado. El término parenteral como se usa en la presente memoria incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar.

35 Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y pueden contener uno o más agentes, tales como agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes y conservantes para proporcionar preparaciones atractivas y comestibles. Los comprimidos contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes fisiológicamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Tales excipientes incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes (por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio), agentes de granulación y desintegración (por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico), agentes de unión (por ejemplo, almidón, gelatina o acacia) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco). Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período

60

más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso (por ejemplo, aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva). Las suspensiones acuosas contienen el anticuerpo o derivado de anticuerpo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen agentes de suspensión (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga); y agentes dispersantes o humectantes (por ejemplo, fosfátidos naturales tales como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos tales como estearato de polioxietileno, productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga tales como heptadecaetilenoxicetanol, productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilén sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tales como monooleato de polietilén sorbitán). Las suspensiones acuosas también pueden comprender uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina. Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden comprender uno o más demulcentes, conservantes, agentes saborizantes y/o agentes colorantes.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo los ingredientes activos en un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los expuestos anteriormente, y/o agentes saborizantes para proporcionar preparaciones orales apetecibles. Tales suspensiones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados se ejemplifican por los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, edulcorantes, saborizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete), un aceite mineral (por ejemplo, parafina líquida) o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas naturales (por ejemplo, goma arábiga o goma tragacanto), fosfátidos naturales (por ejemplo, de soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol), anhídridos (por ejemplo, monooleato de sorbitán), y productos de condensación de ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol con óxido de etileno (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). Una emulsión también puede comprender uno o más agentes edulcorantes y/o saborizantes.

La composición farmacéutica se puede preparar como una suspensión acuosa u oleosa estéril inyectable en la que el modulador, dependiendo del vehículo y la concentración utilizada, se suspende o disuelve en el vehículo. Dicha composición se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes, humectantes y/o de suspensión adecuados, tales como los mencionados anteriormente. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se pueden emplear aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de composiciones inyectables, y se pueden disolver adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y/o agentes reguladores en el vehículo.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como formulaciones de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula que efectúa una liberación lenta del modulador después de la administración). Dichas formulaciones pueden prepararse generalmente usando tecnología bien conocida y administrarse mediante, por ejemplo, implantación oral, rectal o subcutánea, o mediante implantación en el sitio objetivo deseado. Los portadores para uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferiblemente, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del modulador. La cantidad de un anticuerpo o derivado de anticuerpo contenido en una formulación de liberación sostenida depende, por ejemplo, del sitio de implantación, la velocidad y duración esperada de la liberación y la naturaleza de la enfermedad/trastorno a tratar o prevenir.

Los anticuerpos o derivados de anticuerpos proporcionados en este documento se administran generalmente en una cantidad que alcanza una concentración en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, plasma, suero, CSF, fluido sinovial, linfa, fluido intersticial celular, lágrimas u orina) que es suficiente para unirse de manera detectable a un

objetivo tal como, por ejemplo, VEGF y prevenir o inhibir tales enfermedades/trastornos mediados por el objetivo, por ejemplo, enfermedades/trastornos mediados por VEGF. Se considera que una dosis es efectiva si da como resultado un beneficio discernible para el paciente como se divulga en la presente memoria. Las dosis sistémicas preferidas varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por día (aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por día), siendo generalmente las dosis orales aproximadamente 5-20 veces mayores que las dosis intravenosas. La cantidad de anticuerpo o derivado de anticuerpo que se puede combinar con los materiales de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Las formas unitarias de dosificación generalmente contendrán entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse para tratar afecciones que responden a un anticuerpo o derivado de anticuerpo dirigido, por ejemplo, a VEGF. Las composiciones farmacéuticas envasadas pueden incluir un recipiente que contiene una cantidad efectiva de al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo como se describe en el presente documento e instrucciones (por ejemplo, marcación) que indican que la composición contenida se va a usar para tratar una enfermedad/trastorno sensible a un anticuerpo o derivado de anticuerpo después de la administración en el paciente.

Los anticuerpos o derivados de anticuerpos de la presente invención también pueden modificarse químicamente. Los grupos modificadores preferidos son polímeros, por ejemplo, un polímero polialqueno, polialqueno o polioxialqueno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado. Tal grupo efector puede aumentar la vida media de los ejemplos de anticuerpo *in vivo*. Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) (PEG) cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) o derivados de los mismos. Los polímeros particulares de origen natural incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos. El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50.000 Da. Para la aplicación local donde el anticuerpo está diseñado para penetrar en el tejido, un peso molecular preferido del polímero es de alrededor de 5.000 Da. La molécula de polímero se puede unir al anticuerpo, en particular al extremo C-terminal de la cadena pesada del fragmento Fab a través de un péptido de bisagra unido covalentemente como se describe en el documento WO0194585. En cuanto a la unión de residuos de PEG, se hace referencia a "Poly(ethylenglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Application", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Después de la preparación del anticuerpo o derivado de anticuerpo de interés como se describió anteriormente, se prepara la formulación farmacéutica que lo comprende. El anticuerpo a formular no se ha sometido a liofilización previa y la formulación de interés en este documento es una formulación acuosa. Preferiblemente, el anticuerpo o derivado de anticuerpo en la formulación es un fragmento de anticuerpo, tal como un scFv. La cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo presente en la formulación se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis y el modo o modos de administración deseados, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 25 mg/mL y lo más preferiblemente de aproximadamente 2 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL es un ejemplo de concentración de anticuerpo en la formulación.

Se prepara una formulación acuosa que comprende el anticuerpo o derivado de anticuerpo en una solución regulada de pH. El regulador de esta invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0, preferiblemente de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,5, y lo más preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5,0. Los ejemplos de reguladores que controlarán el pH dentro de este intervalo incluyen acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros reguladores de ácidos orgánicos. La concentración de regulador puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, dependiendo, por ejemplo, del regulador y de la isotonicidad deseada de la formulación. El regulador preferido es acetato de sodio (aproximadamente 10 mM), pH 5,0.

Se incluye en la formulación un poliol que actúa como un tónico y puede estabilizar el anticuerpo. En realizaciones preferidas, la formulación no contiene una cantidad tonificante de una sal tal como cloruro de sodio, ya que esto puede provocar que el anticuerpo o derivado de anticuerpo precipite y/o puede dar como resultado la oxidación a pH bajo. En realizaciones preferidas, el poliol es un azúcar no reductor, tal como sacarosa o trehalosa. El poliol se agrega a la formulación en una cantidad que puede variar con respecto a la isotonicidad deseada de la formulación. Preferiblemente, la formulación acuosa es isotónica, en cuyo caso concentraciones adecuadas del poliol en la formulación están en el intervalo de aproximadamente 1% a aproximadamente 15% p/v, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2% a aproximadamente 10% p/v. Sin embargo, las formulaciones hipertónicas o hipotónicas también pueden ser adecuadas. La cantidad de poliol añadida también puede alterar con respecto al peso molecular del poliol. Por ejemplo, puede añadirse una cantidad menor de un monosacárido (por ejemplo, manitol), en comparación con un disacárido (tal como trehalosa).

También se agrega un tensioactivo al anticuerpo o formulación de derivado de anticuerpo. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). La cantidad de tensioactivo añadida es tal que reduce la agregación del anticuerpo/ derivado de anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5%, preferiblemente de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,2% y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%.

En una realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (es decir, anticuerpo o derivado de anticuerpo, regulador, poliol y tensioactivo) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y cloruro de bencetonio. En otra realización, se puede incluir un conservante en la formulación, particularmente cuando la formulación es una formulación multidosis. La concentración de conservante puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%. Uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences vigésima primera edición, Osol, A. Ed. (2006) pueden incluirse en la formulación siempre que no afecten adversamente a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen; agentes reguladores adicionales; codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal tales como sodio.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la preparación de la formulación.

La formulación se administra a un mamífero que necesita tratamiento con el anticuerpo, preferiblemente un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En realizaciones preferidas, la formulación se administra al mamífero mediante administración intravenosa. Para tales fines, la formulación puede inyectarse usando una jeringa o a través de una línea IV, por ejemplo.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente efectiva") del anticuerpo dependerá, por ejemplo, de la afección que se va a tratar, la gravedad y el curso de la afección, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica y la respuesta del paciente al anticuerpo, el tipo de anticuerpo utilizado y la discreción del médico tratante. El anticuerpo o derivado de anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo o derivado de anticuerpo puede administrarse como el único tratamiento o junto con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

Como una proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o derivado de anticuerpo administrado estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea mediante una o más administraciones, usando el intervalo típico de anticuerpo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrado diariamente, por ejemplo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas convencionales.

En otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación farmacéutica de la presente invención, preferiblemente una formulación acuosa, y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y jeringas. El contenedor puede estar formado por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Un ejemplo de contenedor es un vial de vidrio de un solo uso de 3-20 cc. Alternativamente, para una formulación multidosis, el recipiente puede ser un vial de vidrio de 3-100 cc. El contenedor contiene la formulación y la etiqueta en, o asociada con, el contenedor puede indicar instrucciones de uso. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos del envase con instrucciones de uso.

En ciertas realizaciones preferidas, el artículo de fabricación comprende un inmunoenlazante liofilizado como se describe en la presente memoria o generado mediante los métodos descritos en este documento.

Ejemplos

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación adicional.

Materiales y métodos

En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas estándar de preparación de polipéptidos. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992). Los métodos para injertar CDR de conejo y otros anticuerpos monoclonales no humanos en estructuras de anticuerpos humanos seleccionados se describieron en detalle anteriormente. Ejemplos de tales experimentos de injerto se exponen a continuación.

Para mejor comprensión, los injertos denominados "min" son aquellos en los que se injertaron CDR en el marco 1.4 o un dominio variable del mismo, mientras que los injertos llamados "max" son aquellos en los que se injertaron CDR en el marco 1.4 o un dominio variable del mismo y en el que el marco comprende además residuos de marco de donantes que interactúan con el antígeno.

15 **Ejemplo 1: Diseño de rFW1.4**

1.1. Análisis de secuencia primaria y búsqueda en base de datos

1.1.1. Colección de secuencias de inmunoglobulina de conejo

Se recogieron secuencias de dominios variables de anticuerpos maduros y líneas germinales de conejo de diferentes bases de datos de código abierto (por ejemplo, la base de datos Kabat e IMGT) y se introdujeron en una base de datos personalizada como secuencias de aminoácidos de código de una letra. Para todo el análisis, se utilizó únicamente la porción de aminoácidos correspondiente a la región V (variable). Las secuencias en la base de datos KDB con menos del 70% completas o que contienen múltiples residuos indeterminados en las regiones marco se descartaron. Las secuencias con más del 95% de identidad con cualquier otra secuencia dentro de la base de datos también se excluyeron para evitar el ruido aleatorio en el análisis.

25 1.1.2. Alineaciones y numeración de secuencias de conejo

Las secuencias de anticuerpo de conejo se alinearon usando herramientas convencionales de alineamiento de secuencias basadas en el algoritmo de Needleman-Wunsch y matrices Blossum. La introducción de espacios y la nomenclatura de posiciones de residuos se realizaron siguiendo el sistema de numeración de AHO para dominios variables de inmunoglobulina (Honegger y Pluckthun, 2001). El esquema de numeración de Kabat también se aplicó en paralelo ya que es la norma más ampliamente adoptada para numerar los residuos en un anticuerpo. La numeración de Kabat se asignó utilizando el programa SUBIM. Este programa analiza regiones variables de una secuencia de anticuerpos y numera la secuencia de acuerdo con el sistema establecido por Kabat y colaboradores (Deret et al 1995).

La definición de regiones marco y CDR se realizó siguiendo la definición de Kabat, que se basa en la variabilidad de secuencia y es la más comúnmente utilizada. Sin embargo, la designación de CDR-H1 fue un compromiso entre diferentes definiciones que incluyen, la media de los datos de contacto de AbM, de Kabat, generados por análisis de contactos entre anticuerpo y antígeno de un subconjunto de estructuras complejas tridimensionales (MacCallum et al., 1996) y de Chothia que se basa en la ubicación de las regiones del bucle estructural (descritas anteriormente y mostradas en la Fig. 1).

40 1.1.3. Frecuencia y conservación de posiciones de residuos

Se analizó la diversidad de secuencias de aminoácidos usando un conjunto de 423 secuencias de conejo de la base de datos de Kabat. La frecuencia de residuos, $f(r)$, para cada posición, i , en las secuencias maduras de conejo se calculó por el número de veces que se observa ese residuo particular dentro del conjunto de datos dividido por el número total de secuencias. El grado de conservación para cada posición, i , se calculó utilizando el índice de Simpson, que tiene en cuenta el número de aminoácidos diferentes presentes, así como la abundancia relativa de cada residuo.

$$D = \frac{\sum_{i=1}^r n(n-1)}{N(N-1)}$$

en el que: N es el número total de aminoácidos, r es el número de aminoácidos diferentes presentes en cada posición y n es el número de residuos de un tipo particular de aminoácidos.

50 1.1.4. Análisis de linaje de la región V de conejo

Se usaron herramientas de análisis de filogenia para estudiar el repertorio de conejos. Las secuencias de aminoácidos de la región V se agruparon utilizando tanto algoritmos de agrupaciones como topológicos. La matriz de distancia se calculó para todo el arreglo y se usó como indicación del uso de la línea germinal. Se calculó la

secuencia de consenso de cada grupo y se identificó la contraparte de la secuencia de la línea germinal de conejo más cercana. También la secuencia consenso general se derivó para todo el conjunto de secuencias.

1.1.5. Asignación del subgrupo humano

5 Para cada secuencia representativa de conejo de los diferentes grupos, se identificó el subgrupo humano más homólogo usando una implementación en EXCEL de algoritmos de análisis de secuencia y métodos de clasificación basados en el análisis del repertorio de anticuerpos humanos (Knappik et al., 2000).

1.2. Diseño del marco aceptor humano

10 Con el modelo del repertorio de conejos del análisis de secuencia descrito anteriormente, se identificaron residuos en el marco generalmente implicados en el posicionamiento de CDR de conejo. Entre los marcos que tienen una alta homología con respecto al repertorio de conejos y los grupos respectivos, se seleccionó uno que tiene buenas propiedades biofísicas de un conjunto de secuencias completamente humanas. El marco seleccionado para servir como marco aceptor pertenece al subgrupo de cadena ligera variable kappa 1 y al subgrupo III de cadena variable pesada con la ID KI 27, a43 de ESBATech correspondientemente. Este marco de anticuerpos estable y soluble se ha identificado mediante selección de una biblioteca de scFv de bazo humano usando un método de selección basado en levadura denominado sistema de "control de calidad" (Auf der Maur et al., 2004) y se designó "FW1.4". Aunque la secuencia estable y soluble del marco FW1.4 exhibe una alta homología, no era la secuencia más homóloga disponible. Los residuos identificados se incorporaron en dicho marco aceptor para generar rFW1.4.

20 Con la información para la diversidad de secuencia de aminoácidos, el uso de la línea germinal y las características estructurales de los anticuerpos de conejo, se analizó el FW1.4 para la compatibilidad de las posiciones de residuos requeridas para preservar la conformación de CDR en el nuevo marco humano. Se examinaron las regiones variables de FW1.4 para la compatibilidad de las siguientes características:

- i. Residuos que son parte de las secuencias canónicas para estructuras de bucle.
- ii. Residuos de marco ubicados en la interfaz VL/VH.
- iii. La plataforma de residuos directamente debajo de las CDR
- 25 iv. Residuos del núcleo superior e inferior
- v. Residuos del marco que definen el subtipo

1.3. Injerto de CDR de conejo

30 Los injertos se generaron simplemente combinando las secuencias de CDR (de acuerdo con la definición anterior) de un anticuerpo con la secuencia del marco de FW1.4 o el rFW 1.4. Se identificaron los residuos potencialmente implicados en la unión. Para cada secuencia de dominio variable de conejo, se identificó la contraparte de línea germinal de conejo más cercana. Si no se pudo establecer la línea germinal más cercana, la secuencia se comparó con el consenso del subgrupo o el consenso de secuencias de conejo con un alto porcentaje de similitud. Los residuos raros del marco se consideraron posibles resultados de la hipermutación somática y, por lo tanto, desempeñan un papel en la unión. En consecuencia, tales residuos se injertaron en el marco aceptor.

35 1.4 Resultados

40 Analizando el repertorio de anticuerpos de conejo en términos de estructura, la diversidad de secuencias de aminoácidos y el uso de la línea germinal, se encontraron 5 posiciones de residuos en la cadena ligera de FW 1.4 que se modificaron para mantener la conformación de bucle de CDR de conejo. Estas posiciones están altamente conservadas en anticuerpos de conejo. El residuo consenso para estas 5 posiciones se dedujo del repertorio de conejos y se introdujo en el marco 1.4 del aceptor humano. Con la modificación de estas posiciones conservadas, dicho marco se volvió virtualmente compatible con las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cualquier CDR de conejo. El rFW1.4 maestro que contiene diferentes CDR de conejo está bien expresado y se produce bien al contrario que las cadenas sencillas de tipo silvestre. Dieciséis miembros derivados de la combinación de este marco y las CDR de conejo crearon una caracterización detallada que mostró la funcionalidad.

45 **Ejemplo 2:** Sistema de selección de células B

50 Se ha establecido un sistema de selección basado en FACS (clasificación de células individuales basada en citometría de flujo) en ESBATech con el fin de seleccionar células B que se unen a un objetivo de interés a través de sus receptores de células B (BCR). Un objetivo era, por ejemplo, una proteína soluble, a saber, un anticuerpo de cadena sencilla (ESBA903) marcado con un colorante fluorescente (PE y PerCP). La suspensión de linfocitos se preparó a partir del bazo de conejos inmunizados con el objetivo recombinante. Después, las células se incubaron con ESBA903 marcado con PE y PerCP, así como con anticuerpos específicos para IgG (marcada con APC) o IgM (marcada con FITC). Las células B positivas para ESBA903 que expresan IgG, pero no IgM en su superficie se clasificaron en placas de 96 pozos (Figura 3, tabla 2). Por medio de una línea celular auxiliar de timoma (EL4-B5:

véase Zubler et al. 1985, J. Immunol, 134 (6): 3662-3668), proliferaron células B seleccionadas, diferenciadas en células plasmáticas y anticuerpos secretados. La afinidad de estas IgG por el objetivo se verificó mediante mediciones de ELISA y Biacore. Los parámetros cinéticos se representan en la tabla 1 para siete clones seleccionados. Estos clones, de un grupo de ~200 células clasificadas, muestran afinidades de unión en el intervalo nanomolar bajo a picomolar. Finalmente, se aisló ARNm de 6 clones de interés y se injertaron CDR en el marco FW1.4 de cadena sencilla.

Tabla 1: Valores cinéticos para 7 sobrenadantes de cultivo de células B.

Clon de células B	k_a [$M s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
SG2	2,91E+06	2,95E-04	1,01E-10
SE11	3,63E+05	3,81E-04	1,05E-09
2E-03	8,34E+05	3,53E-04	4,23E-10
9E-03	8,66E+05	6,47E-04	7,47E-10
7D-03	3,97E+05	3,04E-04	7,65E-10
12B-02	1,08E+06	1,10E-04	1,01E-10

Tabla 2: Estadísticas de clasificación.

Población	# eventos	% progenitor	% total
Todos los eventos	100.000	####	100,0
Linfocitos	86.585	86,6	86,6
Linfocitos individuales 1	86.013	99,3	86,0
Linfocitos individuales 2	85.523	99,4	85,5
¿Células B de memoria?	5.450	6,4	5,4
Células clasificadas	16	0,3	0,0
Células de unión 903	160	2,9	0,2

10

Ejemplo 3: Detección de la interacción entre perlas recubiertas con anticuerpo anti-TNFalfa y células CHO que expresan TNFalfa unido a la membrana.

Para evaluar si la alta presión en corriente de citometría de flujo rompe o no la unión no covalente entre dos células, se realizó el siguiente experimento. Las células CHO establemente transfectadas con TNFalfa (células B-220) unidas a la membrana se incubaron con perlas recubiertas con un anticuerpo anti-TNFalfa marcado con PE. En esta configuración, las perlas imitan a las células B de memoria (tienen más o menos el mismo tamaño). Como controles negativos, se usaron células CHO no transfectadas, así como perlas recubiertas con un anticuerpo no relacionado marcado con APC (anti-CD19). Después de 2 horas de incubación a 4°C con agitación, la suspensión de células-perlas se analizó mediante FACS (usando una boquilla de 130 μm). La Figura 4 muestra que una unión específica entre perlas anti-TNFalfa y células CHO transfectadas con TNFalfa es claramente detectable con FACS. De hecho, en esta muestra (panel superior), alrededor de dos tercios de las perlas están unidas a las células (585 unidas contra 267 no unidas). Por el contrario, en las muestras de control (paneles central e inferior), casi ninguna perla se une a las células CHO. Además, ambas poblaciones de perlas (anti-TNFalfa-PE y anti-CD19-APC) se mezclaron junto con células CHO transfectadas con TNFalfa. La Figura 5 y la Tabla 4 muestran que aproximadamente la mitad de las perlas anti-TNFalfa se unen a las células CHO, mientras que la gran mayoría de las perlas anti-CD19 permanecen sin unirse. El porcentaje de perlas que se unen a la célula en cada muestra se detalla en la tabla 5. Por lo tanto, se demuestra que la selección específica de células B individuales que se unen a una proteína objetivo de membrana integral a través de su receptor de células B es posible usando citometría de flujo.

15

20

25

ES 2 677 003 T3

Tabla 3a: Estadísticas de clasificación (véase también la Fig. 4a)

Población	# Eventos	% Original	% Total
Todos los eventos	10.000	###	100,0
P1	9.692	96,9	96,9
P3	585	6,0	5,9
P4	1	0,0	0,0
P2	267	2,7	2,7

Tabla 3b: Estadísticas de clasificación (véase también la Fig. 4b)

Población	# Eventos	% Original	% Total
Todos los eventos	10.000	###	100,0
P1	9.399	94,0	94,0
P3	3	0,0	0,0
P4	6	0,1	0,1
P2	550	5,6	5,6

Tabla 3c: Estadísticas de clasificación (véase también la Fig. 4c)

Población	# Eventos	% Original	% Total
Todos los eventos	10.000	###	100,0
P1	9.001	90,0	90,0
P3	13	0,1	0,1
P4	7	0,1	0,1
P2	811	8,1	8,1

Tabla 4: Estadísticas de clasificación (véase también la Fig. 5)

Población	# Eventos	% Original	% Total
Todos los eventos	10.000	###	100,0
P1	9.096	91,0	91,0
P3	401	4,4	4,0
P4	2	0,0	0,0
P2	856	8,6	8,6

Tabla 5: Porcentaje de perlas unidas a células CHO en cada muestra

	Células	mAb sobre perlas	% de perlas enlazadas
Muestra 1	CHO-TNF α (B220)	anti-TNF α	68,0

Muestra 2	CHO-TNF α (B220)	anti-CD19	0,9
Muestra 3	CHO de tipo silvestre	anti-TNF α	1,5
Muestra 4	CHO-TNF α (B220)	anti-TNF α	47,0
		anti-CD19	0,4

Ejemplo 4: Injerto de CDR y humanización funcional de anticuerpos de donante de conejo anti-TNF α

Se seleccionaron cuatro anticuerpos de conejo anti-TNF α "Rabmabs" (EPI-1, EPI-15, EP-34, EP-35 y EP-42) para injerto de CDR. El esquema experimental general para el injerto de CDR, la humanización y la caracterización preliminar de anticuerpos humanizados de donantes de conejo se realizó como se describe en la descripción. A diferencia de los métodos de humanización tradicionales que emplean el marco aceptor de anticuerpo humano que comparte la mayor homología de secuencia con el anticuerpo de donante no humano, las CDR de conejo se injertaron en un marco humano (FW 1.4) que se preseleccionó para propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad) utilizando un ensayo de control de calidad (WO0148017). Estas secuencias estables y solubles del marco exhibieron una alta homología con los RabMabs.

Se generaron injertos de CDR para cada uno de los RabMabs usando la metodología descrita en este documento. En injertos "Min", solo las CDR de conejo se trasplantaron de los dominios VL y VH del anticuerpo del donador de conejo al marco aceptor humano FW1.4. Los injertos "Max" se refieren al injerto de los CDR de conejo en rFW1.4.

Los scFv descritos y caracterizados en este documento se produjeron de la siguiente manera. Las secuencias de VL humanizadas se conectaron a secuencias de VH humanizadas a través del enlazador de la SEQ ID NO: 8 para producir un scFv de la siguiente orientación: NH₂-VL-linker-VH-COOH. En muchos casos, las secuencias de ADN que codifican los diversos scFv se sintetizaron de nuevo en el proveedor de servicios Entelechon GmbH (www.entelechon.com). Los insertos de ADN resultantes se clonaron en el vector de expresión bacteriana pGMP002 a través de los sitios de restricción NcoI y HindIII introducidos en los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN de scFv, respectivamente. Entre la secuencia de ADN del dominio VL y el dominio VH, se localiza un sitio de restricción BamHI. En algunos casos, el ADN que codifica scFv no se sintetizó de nuevo, pero los constructos que expresan scFv se clonaron mediante transposición del dominio. Por consiguiente, los dominios VL se cortaron y se introdujeron en los nuevos constructos a través de los sitios de restricción NcoI y BamHI, los dominios VH a través de los sitios de restricción BamHI y HindIII. En otros casos, se introdujeron mutaciones puntuales en el dominio VH y/o VL usando métodos de PCR de ensamblaje del estado de la técnica. La clonación de GMP002 se describe en el Ejemplo 1 de WO2008006235. La producción de los scFv se hizo de forma análoga a la de ESBA105 como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2008006235.

La Tabla 3 presenta un resumen de los datos de caracterización detallados para los cuatro monoclonales de conejo (EP6, EP19, EP34, EP35 y EP43) y sus variantes injertadas con CDR. Aunque los injertos de CDR exhibieron una amplia gama de actividades en los ensayos de unión de BIACore y L929, ensayos de citotoxicidad mediados por TNF α , 3 de los 4 injertos máximos ("max") exhibieron actividades terapéuticamente relevantes. EP43max exhibió la afinidad de unión más favorable (Kd de 0,25 nM) y una EC50 excelente en el ensayo de citotoxicidad. Estos datos muestran que FW1.4 (SEQ ID No: 1 y 2) es una región marco aceptor humano soluble y estable a modo de ejemplo para injertar CDR de conejo.

35 Prueba de potencia

La actividad neutralizante de los enlazantes anti-TNF α se evaluó en un ensayo de citotoxicidad mediada por TNF α de L929. La toxicidad de células de fibroblastos de ratón L929 tratadas con actinomicina se indujo con TNF humano recombinante (hTNF). Se determinó que el 90% de la citotoxicidad máxima inducida por hTNF estaba en una concentración de TNF de 1.000 pg/mL. Todas las células L929 se cultivaron en RPMI 1640 con fenol, con medio de L-Glutamina suplementado con suero de ternera fetal (10% v/v). La actividad neutralizante de los aglutinantes anti-TNF α se evaluó en RPMI 1640 sin rojo de fenol y suero de ternera fetal al 5%. Se agregan diferentes concentraciones (0 - 374 ng/mL) de aglutinantes anti-TNF a las células L929 en presencia de 1.000 pg/mL de hTNF para determinar la concentración a la que el efecto antagonista alcanza la inhibición casi máxima (EC50%). La curva de respuesta a la dosis se ajustó con regresión sigmoidea no lineal con pendiente variable y se calculó la EC50.

45 Análisis de unión con Biacore de scFv anti-TNF

Para las mediciones de afinidad de unión, se emplearon mediciones de resonancia de plasmón superficial con BIACore^{MR}-T100 usando un chip sensor de NTA y TNF marcado con His (producido en ESBATech). La superficie del chip sensor de NTA consiste en una matriz de dextrano carboximetilada inmovilizada previamente con ácido nitrilotriacético (NTA) para la captura de moléculas marcadas con histidina a través de la quelación Ni²⁺ + NTA. Trímeros TNF α N-his humanos (5 nM) son capturados por el níquel a través de sus etiquetas his N-terminales y se inyecta ESBA105 (analito) a diversas concentraciones que van desde 30 nM a 0,014 nM en etapas de dilución en

5 serie de 3 veces. En la etapa de regeneración, el complejo formado por níquel, ligando y analito se elimina por lavado. Esto permite el uso de las mismas condiciones de regeneración para diferentes muestras. La señal de respuesta se genera mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) y se mide en unidades de resonancia (RU). Todas las mediciones se realizan a 25°C. Se generaron los sensogramas para cada muestra de scFv anti-TNF después de la corrección de la celda de referencia en línea seguida de la substracción de la muestra del regulador. La constante de velocidad de disociación aparente (k_d), la constante de velocidad de asociación aparente (k_a) y la constante de equilibrio de disociación aparente (K_D) se calcularon usando el modelo de unión de Langmuir uno a uno con el software de evaluación BIAcore T100 versión 1.1.

Tabla 3: segunda generación de aglutinantes TNFalfa

Descripción	ID	L929*	kasociación	kdisociación	K_D	FT-IR TM °C	RF rendimiento**
EP1_min	1071	ND***	-	-	-	-	2
EP6_min	673	ND***	4,67E+04	4,94E-03	1,06E-07	50,2	35
EP15_min	1073	ND***	1,57E+05	4,10E-02	2,62E-07	-	41,5
EP19_min	616	ND***	-	-	-	-	-
EP34_min	643	ND***	-	-	-	-	-
EP35_min	1075	ND***	-	-	-	-	1
EP42_min	1076	ND***	1,42E+05	8,35E-03	5,87E-08	-	3
EP43_min	705	ND***	5,38E+03	2,98E-02	5,54E-06	70,2	30,0
EP1_max	1072	ND***	1,11E+04	6,30E-04	5,69E-08	-	44
EP6_max	674	1,1	2,84E+05	1,45E-04	5,12E-10	48,1	12
EP15_max	1074	0,39	1,53E+06	2,26E-03	1,48E-09	68,6	57,8
EP19_max	1007	0,6	2,25E+04	6,54E-05	2,91E-09	53,5	52
EP34_max	791	10,5	5,86E+05	1,68E-05	2,86E-11	72,4	4,05
EP35_max	1089	5,20	7,72E+05	1,50E-04	1,94E-10	-	0,66
EP42_max	1077	ND***	1,21E+05	4,19E-04	3,46E-09	-	47,6
EP43_max	676	6,4	1,78E+05	4,48E-05	2,51E-10	74,3	21,73
EP34min_C-His	790	0,2					
EP19max_C-His	789	1,9					
*L929 [EC50-E105 / EC50-X], comparado en unidades de masa [ng/mL] en relación con el rendimiento de ESBA105 (WO06/131013)							
(solución de replegamiento en mg/L); * No Determinado							

10

Ejemplo 5: Injerto de CDR y humanización funcional de anticuerpos de donante de conejo anti-VEGF

Ocho Rabmabs anti-VEGF (375, 435, 509, 511, 534, 567, 578 y 610) se seleccionaron para el injerto de CDR. A diferencia de los métodos de humanización tradicionales que emplean el marco aceptor de anticuerpo humano que comparte la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donante no humano, las CDR de conejo se injertaron en un marco aceptor humano FW1.4 (SEQ ID No: 1 y 2) que fue preseleccionado para propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad) usando un ensayo de control de calidad (WO0148017).

Se generaron varios injertos de CDR para cada uno de los RabMabs (anticuerpos de conejo) usando la metodología descrita en este documento (véase el Ejemplo 4). Los injertos "Min" comprendieron un injerto mínimo en el que solo las CDR de conejo se trasplantaron de los dominios VL y VH del anticuerpo donador de conejo al marco aceptor humano FW1.4 (SEQ ID NO: 1). Los injertos "Max" comprendieron no solo las CDR de conejo para VL y VH, sino también algunos residuos de marco adicionales del donante de conejo que se predijo que serían importantes para la unión al antígeno. En el caso de 578max, la región marco de dominio variable de cadena pesada de FW1.4 tiene alteraciones de aminoácidos adicionales en las posiciones de Kabat 23H, 49H, 73H, 78H y 94H.

La Tabla 4 muestra un resumen de los datos de caracterización detallados para las variantes injertadas de CDR "Min" y "Max". Se describen su potencia como inhibidores de VEGF, que se mide usando ELISA de competición de VEGFR y/o ensayo de HUVEC. Estos datos muestran que FW1.4 (SEQ ID No: 1 y 2) es un ejemplo de una región marco aceptor humano soluble y estable para injertar CDR de conejo.

Análisis de unión con Biacore de scFv anti-VEGF

Se ensayó la capacidad de unión a Biacore de scFv y se midió la afinidad de unión usando el método de resonancia de plasmón de superficie a modo de ejemplo con Biacore^{MR}-T100. Las proteínas VEGF, probadas para la unión por estos candidatos scFv, en este ejemplo y ejemplos posteriores incluyen VEGF₁₆₅ humano recombinante expresado en *Escherichia coli* purificado (PeproTech EC Ltd.), VEGF₁₂₁ humano recombinante (PeproTech EC Ltd.), VEGF₁₁₀ humano recombinante (ESBATEch AG), VEGF₁₆₄ murino recombinante (PeproTech EC Ltd.), VEGF₁₆₄ de rata recombinante (Biovision), VEGF₁₁₀ de conejo recombinante (ESBATEch AG) y PLGF humano recombinante (PeproTech EC Ltd.). Para el experimento de resonancia de plasmón superficial, se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM4, GE Healthcare) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada una de las 6 formas diferentes de VEGF, como se ejemplificó anteriormente, se acoplaron a 1 de las 4 celdas de flujo diferentes en un chip sensor CM4 usando un procedimiento estándar de acoplamiento de amina. El intervalo de respuestas obtenidas con estas moléculas de VEGF inmovilizadas después del acoplamiento y bloqueo fueron ~250-500 unidades de respuesta (RU) para hVEGF₁₆₅, ~200 RU para hVEGF₁₁₀, hVEGF₁₂₁, VEGF₁₆₄ murino, VEGF₁₆₄ de rata y VEGF₁₁₀ de conejo y ~400 RU para PLGF. La cuarta celda de flujo de cada chip se trató de manera similar, excepto que no se inmovilizaron proteínas antes del bloqueo, y la celda de flujo se usó como referencia en línea. Diversas concentraciones de scFv anti-VEGF (por ejemplo, 90 nM, 30 nM, 10 nM, 3,33 nM, 1,11 nM, 0,37 nM, 0,12 nM y 0,04 nM) en regulador HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M), EDTA 3 mM, tensoactivo P20 al 0,005%) se inyectaron en las células de flujo a un caudal de 30 µl/min durante 5 minutos. La disociación del scFv anti-VEGF del VEGF en el chip CM4 se dejó avanzar durante 10 min a 25°C. Se generaron los sensogramas para cada muestra de scFv anti-VEGF después de la corrección de la celda de referencia en línea seguida de la substracción de la muestra del regulador. La constante de velocidad de disociación aparente (k_d), la constante de velocidad de asociación aparente (k_a) y la constante de equilibrio de disociación aparente (K_D) se calcularon usando el modelo de unión Langmuir uno a uno con el software de evaluación Biacore T100 versión 1.1.

Ensayo HUVEC de inhibición de VEGF

El ensayo HUVEC es un método para medir la potencia de los candidatos de scFv anti-VEGF divulgados como inhibidores de VEGF.

Se usaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (PromoCell), agrupadas de varios donantes, en el pase 2 al pase 14. Las células se sembraron a razón de 1.000 células/pozo en 50 µL de medio de crecimiento celular endotelial completo (ECGM) (PromoCell), que contenía 0,4% de ECGS/H, 2% de suero fetal bovino, 0,1 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, 1 µg/mL de hidrocortisona, 1 ng/mL de factor fibroblástico básico y 1% de penicilina/estreptomina (Gibco). Siete a ocho horas más tarde, se añadieron a las células 50 µL de medio de inanición (ECGM sin suplementos que contenía 0,5% de FCS inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomina) y las células fueron privadas de alimento durante 15 a 16 horas. Se prepararon diluciones en serie 3 veces de scFv anti-VEGF (0,023-150 nM) y uno de los siguientes VEGF₁₆₅ humano recombinante (0,08 nM), VEGF₁₆₄ de ratón recombinante (0,08 nM), o VEGF₁₆₄ de rata recombinante (0,3 nM) en medio de inanición y se incubaron previamente durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. Las diferentes concentraciones de VEGF se usaron para compensar sus diferentes actividades biológicas relativas. Se usaron concentraciones que estimulan la proliferación submáxima inducida por VEGF (EC₉₀). Se añadieron 100 µL de las mezclas a las placas de cultivo de tejido de 96 pozos que contenían la suspensión de HUVEC y se incubaron durante 4 días en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%/37°C. La proliferación de HUVEC se evaluó midiendo la absorbancia a 450 nm (620 nm utilizada como longitud de onda de referencia) después de la adición de 20 µL/pozo de reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche) usando un lector de microplacas Sunrise (Tecan). Los datos se analizaron usando un ajuste

ES 2 677 003 T3

de curva logística de 4 parámetros, y la concentración de scFv anti-VEGF requerida para inhibir la proliferación de HUVEC en un 50% (EC₅₀) se derivó de las curvas de inhibición.

Tabla 4

ID	Proteína No.	Actividad relativa del comp. hVEGR2, ELISA (EC20 _{Luc} [nM]/EC50 _{prueba} [nM])	Activity relativa del comp. hVEGR1, ELISA (EC20 _{Luc} [nM]/EC50 _{prueba} [nM])	Mediciones por Biacore		
				hVEGF ₁₆₅		
				ka(1/Ms)	kd(1/s)	K _D (M)
375-min	857	0,3	ND	9,27E+05	5,01E-03	5,41E-09
375-max	873	0,6	ND	2,44E+06	6,55E-03	2,68E-09
375-max C-His	877	0,4	ND	2,93E+05	8,75E-04	2,98E-09
509-min	854	1,0	2,9	6,23E+05	1,14E-03	1,82E-09
509-max	855	4,1	13	2,26E+06	2,72E-03	1,21E-09
509-maxII	856	0,6	0,09	8,38E+05	2,82E-03	3,37E-09
511-min	801	4,9	0,7	5,05E+05	1,28E-03	2,53E-09
511-max	802	8,7	8	6,59E+05	4,40E-05	6,67E-11
534-min C-His	807	0,1	ND	2,71E+05	9,21E-03	3,41E-08
534-max	793	1,1	ND	1,88E+06	1,73E-02	9,21E-09
567-min	884	9,7	57	2,01E+06	4,61E-04	2,30E-10
567-max	874	4,1	15,7/54,5	1,20E+06	2,26E-04	1,88E-10
578-min	820	4,1	4,8	1,14E+06	1,03E-02	9,01E-09
578-max	821	9,6	35,5/51,6	7,00E+05	3,07E-04	4,39E-10

ID	Proteína No.	Actividad relativa del comp. hVEGR2, ELISA (EC20 _{Luc} [nM]/EC50 _{prueba} [nM])	Activity relativa del comp. hVEGR1, ELISA (EC20 _{Luc} [nM]/EC50 _{prueba} [nM])	Mediciones por Biacore		
				hVEGF ₁₆₅		
				ka(1/Ms)	kd(1/s)	K _D (M)
610-min	882	0,1	ND	2,51E+05	2,65E-03	1,06E-08
610-max	883	0,4	ND	5,09E+05	6,01E-04	1,18E-09
435-min	944	ND	ND	ND	ND	ND
435-max	945	7,6	ND	1,67E+05	7,55E-04	4,53 E-09

Equivalentes

5 Numerosas modificaciones y realizaciones alternativas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la descripción anterior. En consecuencia, esta descripción se debe considerar como ilustrativa solamente y tiene el propósito de enseñar a los expertos en la técnica el mejor modo para llevar a cabo la presente invención. Se pretende que la presente invención se limite solo en la medida requerida por las reivindicaciones adjuntas y las normas de ley aplicables.

Listado de secuencias

- <110> ESBATech AG
- 10 <120> Humanización de anticuerpos de conejo utilizando un marco de anticuerpos universal
- <130> Conversión de anticuerpos humanos en anticuerpos de conejo
- <160> 25
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 232
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> marco de cadena pesada variable de FW1.4 (a43)
- 20 <220>
- <221> CDR
- <222> (26)..(75)
- <223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <220>
- <221> CDR
- <222> (90)..(139)

ES 2 677 003 T3

<223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

5 <222> (172)..(221)

<223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

10

<210> 2

<211> 231

ES 2 677 003 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de cadena liviana variable de FW1.4(KI27)

5 <220>

<221> CDR

<222> (24)..(73)

<223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <220>

<221> CDR

<222> (89)..(138)

<223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <220>

<221> CDR

<222> (171)..(220)

<223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <400> 2

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

25

30

ES 2 677 003 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 3

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de FW1.4

<220>

<221> CDR

10 <222> (24)..(73)

<223> LCDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

<222> (89)..(138)

5 <223> Lcdr2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

<222> (171)..(220)

10 <223> Lcdr3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

<222> (277)..(326)

15 <223> Hcdr1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

<222> (341)..(390)

20 <223> Hcdr2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

<222> (423) .. (472)

25 <223> Hcdr3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 3

ES 2 677 003 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140

ES 2 677 003 T3

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
260 265 270

Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
325 330 335

Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
385 390 395 400

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 4

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de cadena pesada variable de rFW1.4

<220>

<221> CDR

10 <222> (26)..(75)

<223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

15 <222> (90)..(139)

<223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

20 <222> (172)..(221)

<223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 4

ES 2 677 003 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 5

<211> 483

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de rFW1.4

<220>

<221> CDR

5 <222> (24)..(73)

<223> LCDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

10 <222> (89)..(138)

<223> LCDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

15 <222> (171)..(220)

<223> LCDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

20 <222> (277)..(326)

<223> HCDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

25 <222> (341)..(390)

<223> LCDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

30 <222> (423)..(472)

<223> HCDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 5

ES 2 677 003 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

ES 2 677 003 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270
 Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335
 Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 385 390 395 400
 Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 6

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de cadena pesada variable de rFW1.4(v2)

<220>

<221> CDR

10 <222> (26)..(75)

<223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

15 <222> (90).. (139)

<223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CDR

20 <222> (172)..(221)

<223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 6

ES 2 677 003 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 7

<211> 483

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

- <223> marco de rFW1.4(v2)
<220>
<221> CDR
<222> (24)..(73)
- 5 <223> LCDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> CDR
<222> (89)..(138)
- 10 <223> LCDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> CDR
<222> (171)..(220)
- 15 <223> LCDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> CDR
<222> (277)..(326)
- 20 <223> HCDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> CDR
<222> (341)..(390)
- 25 <223> HCDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<220>
<221> CDR
<222> (423)..(472)
- 30 <223> HCDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<400> 7

ES 2 677 003 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

ES 2 677 003 T3

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270

Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> enlazador

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 9

<211> 231

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> marco de cadena liviana variable sustituido FW1.4

<220>

10 <221> CDR

<222> (24)..(73)

<223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

15 <221> CDR

<222> (89).. (138)

<223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

20 <221> CDR

<222> (171)..(220)

<223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 9

ES 2 677 003 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230

<210> 10

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 677 003 T3

<223> VH 43_FW1.4_mod

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gly
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe Asp Pro Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VL 43_FW1.4_mod

<400> 11

ES 2 677 003 T3

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

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH 511_FW1.4_mod

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 677 003 T3

35 40 45

Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL 511_FW1.4_mod

<400> 13

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
 85 90 95

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

10 <210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 677 003 T3

<220>

<223> VH 578_FW1.4_mod

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 15

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VL 578_FW1.4_mod

<400> 15

ES 2 677 003 T3

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

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH 534_FW1.4_mod

<400> 16

ES 2 677 003 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Asp Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL 534_FW1.4_mod

<400> 17

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Trp Leu
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Tyr
35 40 45

Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn Asn
85 90 95

Gly Phe Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

ES 2 677 003 T3

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> VH 509_FW1.4_mod

<400> 18

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

<210> 19

10 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL 509_FW1.4_mod

15 <400> 19

ES 2 677 003 T3

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

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH 578rFW1.4

<400> 20

ES 2 677 003 T3

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

115

120

<210> 21

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL 578rFW1.4

<400> 21

ES 2 677 003 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 22

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH 511rFW1.4

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu

ES 2 677 003 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gly
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe Asp Pro Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL 43rFW1.4

<400> 25

ES 2 677 003 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
85 90 95

Val Asp Asn Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un marco aceptor para injertar CDR de lagomorfo que comprende un marco de cadena pesada variable humana que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO. 4 y que comprende treonina (T) en la posición 24, alanina (A) o glicina (G) en la posición 56, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo).
2. El marco aceptor de la reivindicación 1, en el que el marco de cadena pesada variable se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 4 y SEQ ID NO. 6.
3. El marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un marco de cadena ligera variable que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO. 2.
- 10 4. El marco aceptor de la reivindicación 3, que comprende una treonina (T) en la posición 87 del marco de cadena ligera variable (numeración de AHo).
5. El marco aceptor de la reivindicación 3, que comprende además CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un polipéptido de unión a antígeno de lagomorfo donador.
- 15 6. El marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el marco de cadena pesada variable y el marco de cadena ligera variable están unidos a través de un enlazador de la SEQ ID NO.8.
7. El marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un marco que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO.3, la SEQ ID NO.5 o la SEQ ID NO. 7.
- 20 8. Un marco aceptor de cadena pesada variable humano o humanizado para injertar CDR que comprende al menos cuatro aminoácidos del grupo que consiste en treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición 56, lisina (K) en la posición 82, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo), en el que el marco aceptor tiene al menos 95% de identidad con la SEQ ID NO. 4.
9. El marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el aminoácido en la posición 12, 103 y/o 144 (numeración de AHo) se sustituyó frente a un aminoácido hidrofílico.
- 25 10. El marco aceptor de la reivindicación 9, que tiene
- (a) serina (S) en la posición 12,
- (b) serina (S) o treonina (T) en la posición 103 y/o
- (c) serina (S) o treonina (T) en la posición 144 (numeración de AHo) en el marco de cadena pesada variable.
- 30 11. El marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene ácido glutámico (E) en la posición 1, valina (V) en la posición 3, leucina (L) en la posición 4, serina (S) en la posición 10; arginina (R) en la posición 47, serina (S) en la posición 57, fenilalanina (F) en la posición 91 y/o valina (V) en la posición 103 en el marco de la cadena ligera variable (numeración de AHo).
12. El marco aceptor de la reivindicación 11, que comprende además residuos del marco de donantes implicados en la unión al antígeno.
- 35 13. El marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además glicina (G) en la posición 141 de la cadena pesada variable (numeración de AHo).
14. Uso del marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el injerto de CDR de lagomorfos.
15. Un polipéptido de unión a antígeno, que comprende el marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 40 16. El polipéptido de unión a antígeno de la reivindicación 15, que es un anticuerpo de scFv.
17. El polipéptido de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 que comprende además una o más moléculas unidas, en particular un agente terapéutico tal como un agente citotóxico, una citoquina, una quimioquina, un factor de crecimiento u otra molécula de señalización, un agente de formación de imágenes o una segunda proteína, en particular un activador transcripcional o un dominio de unión a ADN.
- 45 18. El polipéptido de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 15-17 para uso en aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones terapéuticas, validación de objetivo o terapia génica.
19. Un ácido nucleico, en particular un ácido nucleico aislado, que codifica el marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o el polipéptido de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.

20. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 19.
21. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 20.
22. El ácido nucleico de la reivindicación 19 o el vector de la reivindicación 20 para uso en terapia génica.
- 5 23. Una composición que comprende el marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, el polipéptido de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, el ácido nucleico de la reivindicación 19 o el vector de la reivindicación 20.
24. Un método para humanizar un polipéptido de unión a antígeno de conejo, el polipéptido de unión a antígeno de conejo que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera, comprendiendo el método:
- 10 (i) injertar al menos una CDR de cadena pesada del grupo que consiste en secuencias de CDR H1, CDR H2 y CDR H3 en un marco de cadena pesada variable humana que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO. 4, que comprende además al menos seis aminoácidos del grupo que consiste en treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición 56, lisina (K) en la posición 82, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo), y
- 15 (ii) injertar al menos una CDR de cadena ligera del grupo que consiste en secuencias de CDR L1, CDR L2 y CDR L3 en un marco aceptor de cadena ligera variable humana, teniendo la estructura de cadena ligera variable humana al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 2.
25. El método de la reivindicación 24 en el que
- (i) el marco de la cadena pesada variable humana comprende la secuencia de aminoácidos del marco de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6; y
- 20 (ii) el marco de cadena ligera variable humana comprende la secuencia de aminoácidos del marco de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 9.
26. El método de la reivindicación 24 o 25, que comprende adicionalmente sustituir residuos del marco por residuos del marco del polipéptido de unión al antígeno de conejo que está implicado en la unión al antígeno.
- 25 27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, que comprende además la etapa de sustituir un residuo del marco del marco aceptor de cadena pesada variable con una sustitución α en al menos una de las posiciones amino de la cadena pesada 12, 103 y 144 (numeración de AHo), en particular sustituyendo contra un aminoácido hidrofílico, preferiblemente por una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: (a) serina (S) en la posición 12; (b) treonina (T) en la posición 103; y (c) treonina (T) en la posición 144.
- 30 28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 24-27, que comprende además sustituir un residuo del marco del marco aceptor de cadena ligera variable con una sustitución potenciadora de la estabilidad en al menos una de las posiciones 1, 3, 4, 10, 47, 57, 91 y 103 de la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de AHo, en particular con una sustitución seleccionada del grupo que consiste en (a) ácido glutámico (E) en la posición 1, (b) valina (V) en la posición 3, (c) leucina (L) en la posición 4; (d) serina (S) en la posición 10; (e) arginina (R) en la posición 47; (e) serina (S) en la posición 57; (f) fenilalanina (F) en la posición 91; y (g) valina (V) en la posición 103.
- 35 29. Un polipéptido de unión a antígeno humanizado de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 24-28.
30. El polipéptido de unión a antígeno de la reivindicación 29, en el que el antígeno objetivo es VEGF o TNF α .
- 40 31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en el que el método comprende además la identificación de las CDR del donador de un dominio variable de anticuerpo generado por las células B de acuerdo con las etapas de
- a) incubar células B de conejo con un antígeno objetivo;
- b) seleccionar aquellas células B que se unen al antígeno objetivo; y
- 45 c) Identificar las CDR del dominio variable de anticuerpo generado por las células B.
32. El método de la reivindicación 31, en el que dichas células B se aíslan de un conejo que se inmuniza contra dicho antígeno objetivo, preferiblemente mediante vacunación con ADN.
33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31 o 32, en el que las células B y el antígeno objetivo se tiñen de forma diferente y la concurrencia de las dos tinciones se selecciona positivamente mediante citometría de flujo
- 50 basada en la clasificación de células individuales.

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31-33, en el que el antígeno objetivo es una proteína soluble.
35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31-33, en el que el antígeno objetivo se expresa en la superficie de una célula, en particular en el que el antígeno objetivo es una proteína transmembrana, en particular una proteína que abarca múltiples membranas.
- 5 36. El método de la reivindicación 35, en el que el antígeno objetivo se tiñe indirectamente mediante tinción de la célula que expresa el antígeno objetivo con un colorante fluorescente intracelular.
37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31-36, en el que las células B se tiñen con uno o más anticuerpos marcados que son específicos para marcadores de superficie de células B.
- 10 38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31-37, en el que las células B se tiñen con anticuerpos anti-IgG marcados.
39. El método de la reivindicación 38, en el que las células B se tiñen con anticuerpos anti-IgG marcados y con anticuerpos anti-IgM marcados de manera diferente.
40. El método de la reivindicación 39, en el que dichas células B que se tiñen con anticuerpos anti-IgM marcados se seleccionan negativamente.
- 15 41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 31-40, que comprende además la etapa de cultivar dichas células B seleccionadas en la etapa b) de la reivindicación 31, de modo que los anticuerpos generados se secretan en el medio de cultivo, en particular en presencia de una línea celular auxiliar.
42. El método de cualquiera de la reivindicación 41, que comprende además la etapa de analizar dichos anticuerpos secretados para unión específica al antígeno objetivo.
- 20 43. El método de la reivindicación 42, en el que las CDR de dichos anticuerpos se amplifican, en particular por RT-PCR, y se injertan en un marco aceptor para producir un polipéptido de unión a antígeno que se analiza posteriormente para la unión específica al antígeno objetivo.
- 25 44. Uso de un marco aceptor de cadena pesada variable humana que comprende una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO. 4, que comprende además al menos seis aminoácidos del grupo que consiste en treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, alanina (A) o glicina (G) en la posición 56, lisina (K) en la posición 82, treonina (T) en la posición 84, valina (V) en la posición 89 y arginina (R) en la posición 108 (numeración de AHo), y un marco aceptor de cadena ligera variable humana que comprende una secuencia que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO. 2, para el injerto de CDR de conejo.
- 30 45. El uso de la reivindicación 44, en el que el marco comprende la SEQ ID NO. 1 y la SEQ ID NO. 2, ambas conectadas mediante un enlazador que tiene la SEQ ID NO. 8.
46. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, formulado para administración tópica, oral, nasal, intracerebro-espinal, rectal o parenteral.
- 35 47. Una formulación que comprende un marco aceptor de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o el polipéptido de unión a antígeno de la reivindicación 29 o 30, para uso como medicamento, caracterizada porque la composición se administra por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica o por inhalación.

Figura 1

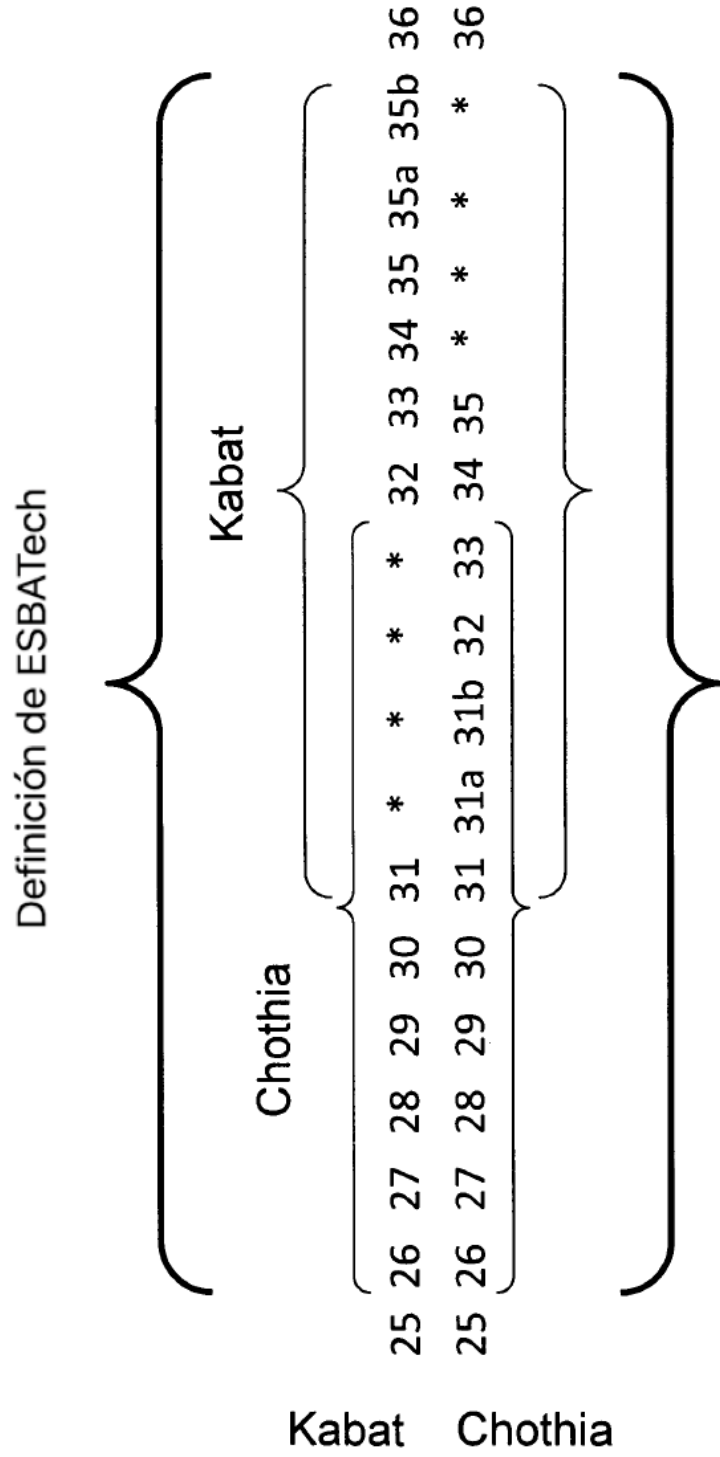


Figura 2

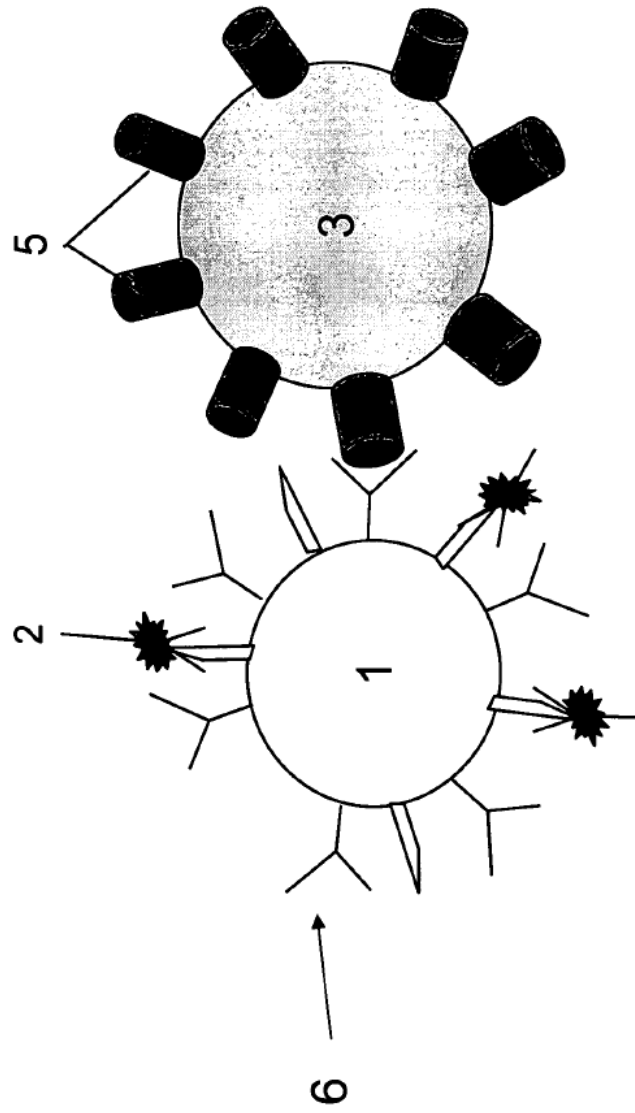


Figura 3A

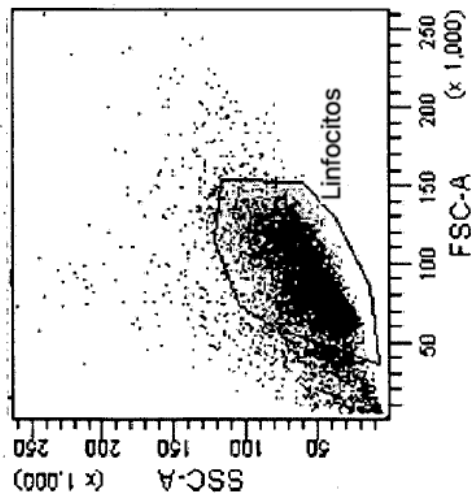


Figura 3B

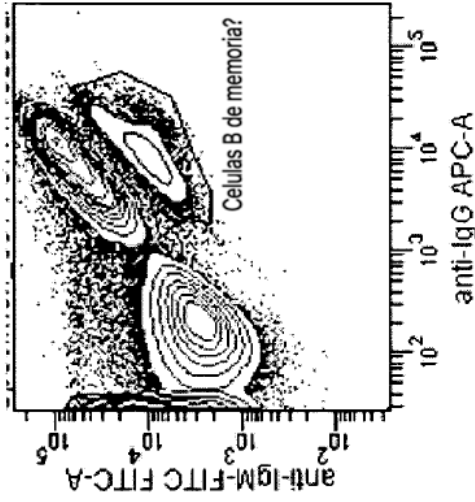


Figura 3C

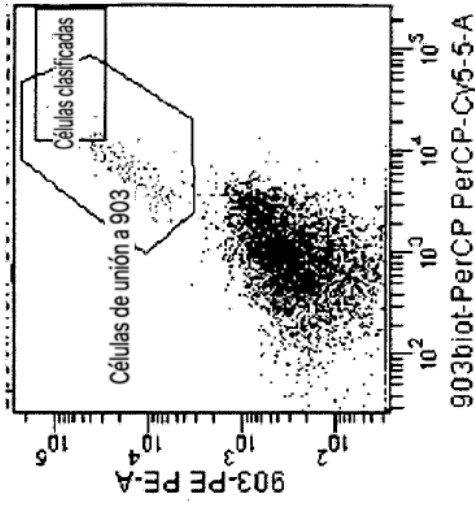


Figura 4

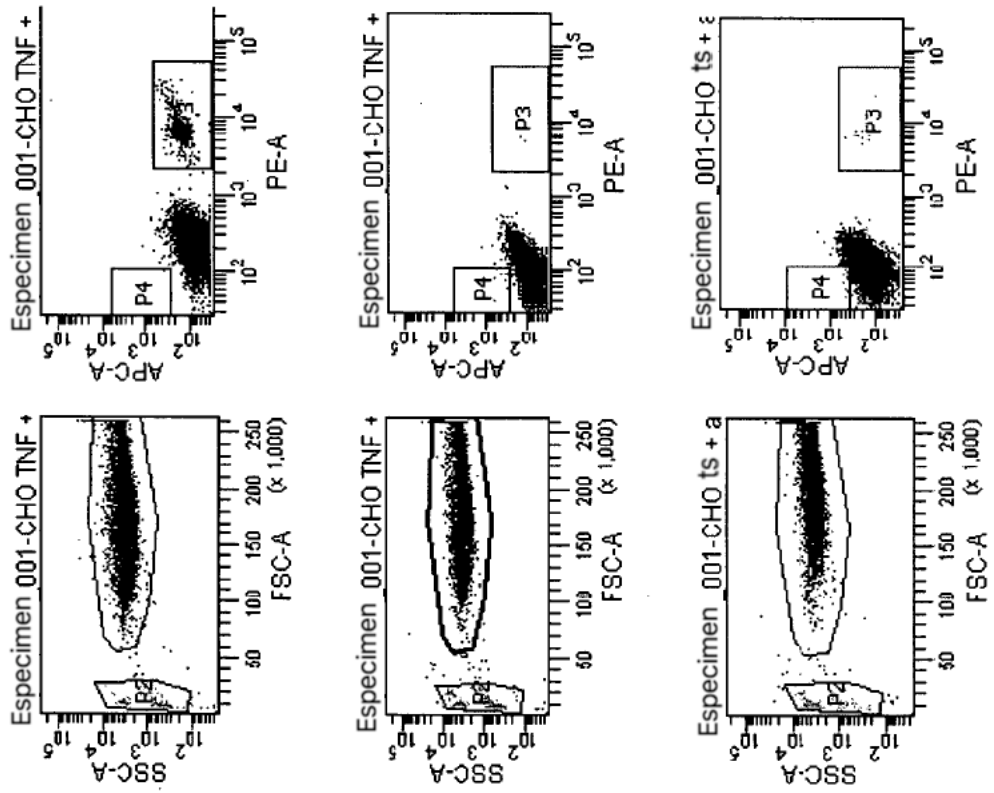


Figura 5

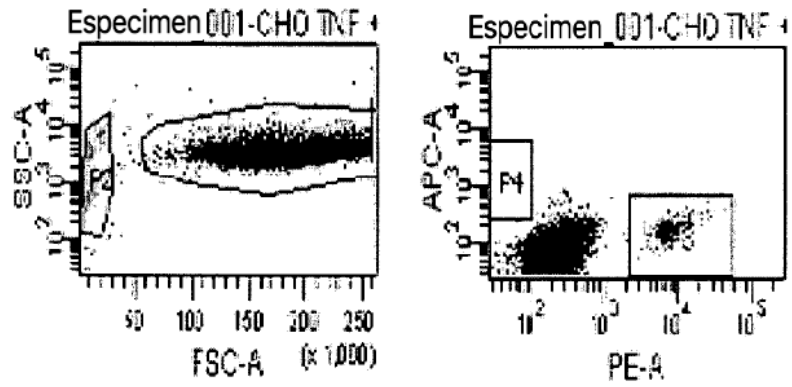


Figura 6

