

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 150**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2009 E 14162664 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2752428**

54 Título: **Humanización de anticuerpos de conejo usando un armazón de anticuerpo universal**

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:
06.07.2020

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

BORRAS, LEONARDO y

URECH, DAVID

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 771 150 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 usando un armazón de anticuerpo universal

5 Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales, sus conjugados y derivados son muy importantes comercialmente como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Los anticuerpos no humanos desencadenan una fuerte respuesta inmunitaria en los pacientes, por lo general 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). En consecuencia, Se desarrollaron varios métodos para reducir la inmunogenia de los anticuerpos murinos y de roedores de otro tipo, así como tecnologías para preparar anticuerpos completamente humanos usando, por ejemplo, ratones transgénicos o presentación de fagos. Se diseñaron mediante ingeniería genética anticuerpos quiméricos, que combinan regiones variables de roedor con regiones constantes humanas (por ejemplo, Boulianne *Nature* 1984 312: 643-6) y redujeron considerablemente los problemas de inmunogenia (por ejemplo, LoBuglio, *Proc Natl Acad Sci* 1989 86: 4220-4; Clark, *Immunol Today* 2000 21: 397-402). También se diseñaron mediante ingeniería genética anticuerpos humanizados, en los que la secuencia de roedor de la región variable en sí misma se diseña mediante ingeniería genética para que sea tan próxima a una secuencia humana como sea posible conservando al mismo tiempo al menos las CDR originales, o donde las CDR que forman el anticuerpo de roedor se injertaron en el armazón de un anticuerpo humano (por ejemplo, Riechmann, *Nature* 1988 332: 323-7; documento US5.693.761). Los anticuerpos policlonales de conejo se usan ampliamente para ensayos biológicos tales como ELISA o transferencias Western. Los anticuerpos policlonales de conejo con frecuencia se favorecen más que los anticuerpos de roedor policlonales debido a su afinidad por lo general mucho mayor. Además, los conejos con frecuencia son capaces de desencadenar buenas respuestas de anticuerpos contra antígenos que son poco inmunógenos en ratones y/o que no originan buenos aglutinantes cuando se usan en la presentación de fagos. Debido a estas ventajas bien conocidas de los anticuerpos de conejo, serían ideales para usarse en el descubrimiento y el desarrollo de anticuerpos terapéuticos. La razón por la que esto no se hace habitualmente es principalmente debido a desafíos técnicos en la generación de anticuerpos monoclonales de conejo. Puesto que no se conocen tumores de tipo mieloma en conejos, la tecnología del hibridoma convencional para generar anticuerpos monoclonales no es aplicable a los anticuerpos de conejo. Knight y sus colegas realizaron un trabajo pionero proporcionando compañeros de estirpe celular de fusión para células que expresan anticuerpos de conejo (Spieker-Polet et al., *PNAS* 1995, 92: 9348-52) y Pytela et al. han descrito una estirpe celular mejorada del compañero de fusión en 2005 (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7429487). Esta tecnología, sin embargo, no se difunde ampliamente puesto que los conocimientos técnicos correspondientes están controlados básicamente por un único grupo de investigación. En la bibliografía se describen métodos alternativos para la generación de anticuerpos monoclonales que implican la clonación de anticuerpos de células que expresan anticuerpos seleccionados a través de RT-PCR, pero nunca se ha reportado satisfactoriamente para anticuerpos de conejo.

Se espera que los anticuerpos de conejo, como los anticuerpos de ratón, desencadenen respuestas inmunitarias fuertes si se usan para terapia humana, por tanto, los anticuerpos de conejo deben humanizarse antes de que puedan usarse clínicamente. Sin embargo, los métodos que se usan para preparar anticuerpos de roedores humanizados no pueden extrapolarse fácilmente para anticuerpos de conejo debido a diferencias estructurales entre anticuerpos de conejo y ratón y, respectivamente, entre anticuerpos de conejo y humanos. Por ejemplo, la CDR3 de cadena ligera (CDRL3) con frecuencia es mucho más larga que las CDRL3 conocidas anteriormente de anticuerpos humanos o de ratón.

Se describen pocos enfoques de humanización de anticuerpos de conejo en la técnica anterior que, sin embargo, no son un enfoque de injerto clásico en el que las CDR de un donador 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 restos accesibles al disolvente del armazón no humano de manera que se vuelvan más parecidos a los humanos. Se conocen en la materia técnicas de humanización similares para anticuerpos de conejo como se describen en el documento WO 04/016740. Tanto el documento WO08/144757 como el documento WO05/016950 desvelan métodos para humanizar un anticuerpo monoclonal de conejo que implica la comparación de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de conejo parental con las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo humano similar. Posteriormente, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de conejo parental se altera de manera que sus regiones marco conservadas sean más similares en su secuencia a las regiones marco conservadas equivalentes del anticuerpo humano similar. Con el fin de obtener buenas capacidades de unión, deben realizarse esfuerzos de desarrollo laboriosos para cada inmunoenlazador individualmente.

Un posible problema de los enfoques descritos anteriormente es que no se usa un armazón humano, sino que el armazón de conejo se diseña mediante ingeniería genética de manera que parezca más humano. Dicho enfoque conlleva el riesgo de que los tramos de aminoácidos que están enterrados en el centro de la proteína aún puedan comprender epítomos de linfocitos T inmunógenos.

Hasta la fecha, los solicitantes no han identificado un anticuerpo de conejo, que se humanizase 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 sabe en la técnica, muchas cadenas V_H de conejo tienen cisteínas apareadas adicionales con respecto a los homólogos murinos y humanos. Además del puente disulfuro conservado formado entre cys22 y cys92, también existe un puente cys21-cys79, así como un puente S-S interCDR formado entre el último resto de CDRH1 y el primer resto de CDR H2 en algunas cadenas de conejos. Además, con frecuencia se encuentran pares de restos de cisteína en la CDR-L3. Además, muchas CDR de anticuerpos de conejo no pertenecen a ninguna estructura canónica conocida anteriormente. En particular, la CDR-L3 es con frecuencia mucho más larga que la CDR-L3 de un homólogo humano o murino. El documento WO 2008/004834 A1 se refiere a un anticuerpo humanizado contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) compuesto por CDR originadas a partir de un conejo inmunizado y una región marco conservada de Ig humana.

Por tanto, el injerto de anticuerpos de CDR no humanas en un armazón humano es una tarea importante de ingeniería de proteínas. La transferencia de bucles de unión a antígeno de un armazón evolucionado de forma natural a un armazón humano seleccionado artificialmente diferente debe realizarse de manera que las conformaciones de bucle nativas se conserven para la unión al antígeno. Con frecuencia, la afinidad de unión a antígeno se reduce o anula en gran medida después del injerto de bucle. El uso de armazones humanos seleccionados cuidadosamente en el injerto de los bucles de unión a antígeno maximiza la probabilidad de conservar la afinidad de unión en la molécula humanizada (Roguzka et al 1996). Aunque los muchos experimentos de injerto disponibles en la bibliografía proporcionan una guía aproximada para el injerto de CDR, no es posible generalizar un patrón. Los problemas típicos consisten en perder la especificidad, la estabilidad o la productividad después de injertar los bucles de CDR.

En consecuencia, existe una necesidad urgente de métodos mejorados para humanizar de forma fiable y rápida anticuerpos de conejo para su uso como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Además, existe la necesidad de armazones aceptores humanos para humanizar de forma fiable anticuerpos de conejo, proporcionando anticuerpos funcionales y/o fragmentos de anticuerpos con propiedades biofísicas similares a las de los fármacos.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que un armazón de anticuerpo humano altamente soluble y estable identificado mediante un ensayo de Control de Calidad (CC) (como se desvela en el documento WO 0148017 y en Auf der Maur et al (2001), *FEBS Lett* 508, págs. 407-412) es particularmente adecuado para acomodar CDR de otras especies animales no humanas, por ejemplo, CDR de conejo. La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona las siguientes realizaciones definidas en los puntos 1-8:

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:

- (i) CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de un anticuerpo de lagomorfo donador o fragmento de unión a antígeno del mismo y CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo de lagomorfo donador o fragmento de unión a antígeno del mismo;
- (ii) un armazón de la cadena ligera humana variable que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 85 % con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 2; y
- (iii) un armazón de la cadena pesada humana variable, en donde la secuencia de aminoácidos del armazón de la cadena pesada variable es idéntica en al menos un 85 % con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 4 y comprende al menos cuatro de los siguientes aminoácidos: 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 AHo).

2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable comprende:

- (a) treonina (T) en la posición 24 (numeración AHo);
- (b) treonina (T) en la posición 84 (numeración AHo); o
- (c) valina (V) en la posición 89 (numeración AHo).

3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes aminoácidos: Serina (S) en la posición 12; Serina (S) o Treonina (T) en la posición 103; y Serina (S) o Treonina (T) en la posición 144 (numeración AHo).

4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable comprende adicionalmente Glicina (G) en la posición 141 (numeración AHo).
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho armazón de la cadena ligera variable comprende la SEQ ID NO: 2.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho armazón de la cadena ligera variable comprende treonina (T) en la posición 87 (numeración AHo).
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 7, en donde dicho armazón de la cadena ligera variable comprende la SEQ ID NO: 9.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable y dicho armazón de la cadena ligera variable se unen a través de una secuencia enlazadora que comprende la SEQ ID NO: 8.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 85 % con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7.
11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 10, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7.
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho armazón de la cadena ligera variable comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes aminoácidos: 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 Valina (V) en la posición 103 (numeración AHo).
13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un scFv.
14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de uno cualquiera de los puntos 1-13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del punto 1, donde el armazón de la cadena pesada humana variable comprende adicionalmente una valina (V) en la posición 25 y/o una lisina (K) en la posición 82 (numeración AHo).
16. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de uno cualquiera de los puntos 1 a 13 o 15.
17. La molécula biespecífica del punto 16, que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes.
18. La molécula biespecífica de los puntos 16 o 17, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está unido a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (incluyendo un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario), antígenos específicos de tumores o específicos de patógenos, péptidos o un mimético de unión.

En consecuencia, en un primer aspecto, la divulgación proporciona las regiones variables de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano particular (el denominado anticuerpo "FW 1.4") que es especialmente adecuado como aceptor universal para las CDR de una diversidad de anticuerpos, en particular de anticuerpos de conejo, de diferentes especificidades de unión, independientemente de si hay presente un puente disulfuro en una CDR o no. Además, la presente divulgación proporciona dos secuencias mutantes de dicho armazón de anticuerpo humano particular, en concreto rFW 1.4 y rFW 1.4 (V2), siendo ambos armazones particularmente adecuados como armazones aceptores universales para el injerto de CDR de conejo. En otro aspecto, la divulgación proporciona un motivo de restos de armazón que hace que un armazón humano sea adecuado para acomodar CDR de otras especies animales no humanas, en particular CDR de conejo.

Los inmunoenlazadores humanizados generados mediante el injerto de CDR de conejo en estos armazones de la cadena ligera y pesada variables altamente compatibles conservan de manera uniforme y fiable la orientación espacial de los anticuerpos de conejo de los que derivan las CDR donadoras. Por tanto, no es necesario introducir posiciones estructuralmente relevantes del inmunoenlazador donador en el armazón aceptor. Debido a estas ventajas, puede

conseguirse la humanización de alto rendimiento de anticuerpos de conejo con poca o ninguna optimización de las capacidades de unión.

En consecuencia, en otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para injertar CDR de conejo y otras CDR no humanas, en las secuencias armazón de anticuerpos humanos de cadena ligera y/o cadena pesada solubles y estables que se desvelan en el presente documento, generando de este modo anticuerpos humanizados con propiedades biofísicas superiores. En particular, los inmunoenlazadores generados mediante los métodos de la divulgación presentan propiedades funcionales superiores tales como solubilidad y estabilidad.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la definición de CDR H1 utilizada en el presente documento para injertar sitios de unión a antígeno de anticuerpos monoclonales de conejo en los armazones de anticuerpos humanos altamente solubles y estables.

15

La Figura 2 muestra esquemáticamente una célula B 1 marcada con un anticuerpo fluorescente 2 que interactúa con una célula 3 que expresa la diana, teñida con un colorante intracelular 4. Diana de elección: 5; BCR: 6.

Figura 3: el proceso de selección por FACS de células B de conejo que se unen a la diana soluble ESBA903. Fig. 3A:

20 Se seleccionan linfocitos de acuerdo con la dispersión frontal y lateral. Fig. 3B: Entre ellos, se seleccionan células IgG+ IgM- (probablemente células B de memoria) (ventana roja). Fig. 3C: Se espera que las células doblemente teñidas con ESBA903-PE y ESBA903-PerCP (ventana verde) codifiquen IgG de alta afinidad contra ESBA903. Las células que mostraban la fluorescencia más brillante (ventana rosa) se clasificaron en placas de 96 pocillos.

25 Figura 4. Las perlas recubiertas con anticuerpos anti-TNF alfa (marcados con PE) se unen a células CHO transfectadas con TNF alfa (panel superior). Las perlas de control recubiertas con anticuerpos anti-CD 19 (marcados con APC) no se unen a las células CHO transfectadas con TNF alfa (panel central). Las perlas recubiertas con anticuerpos anti-TNF alfa (marcados con PE) no se unen a las células CHO de tipo silvestre (ts) (panel inferior). Los gráficos de puntos a la izquierda muestran dispersiones frontales y laterales, que indican respectivamente el tamaño y la granularidad de los eventos. La población de perlas individuales (~3 μ m) se selecciona en P2. Las células CHO finalmente unidas a las perlas (~30 μ m) 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 tanto, si las células interactúan con perlas anti-TNF alfa, se mostrarán en la ventana P3, y si interactúan con las perlas anti-CD 19 aparecerán en la ventana P4. A la derecha, se detallan las estadísticas para cada muestra.

35

Figura 5. Las perlas recubiertas con anti-TNF alfa-PE y las perlas recubiertas con anti-CD19-APC se mezclaron junto con células CHO transfectadas con TNF alfa. Se seleccionaron células CHO (P1) y, entre ellas, las células que se unen a perlas recubiertas con anti-TNF-alfaPE o perlas recubiertas con anti-CD19-APC se muestran en las ventanas P3 y P4, respectivamente. Las perlas no unidas son visibles en la ventana P2.

40

Figura 6. Un análisis de secuencias de anticuerpos de conejo extraídas de la base de datos Kabat confirma que la CDR3 de la cadena pesada variable es normalmente tres aminoácidos más larga que su homóloga murina.

Descripción detallada de la invención

45

Definiciones

Con el fin de que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, se definirán como se indica a continuación determinados términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

50

El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos completos y a cualquier fragmento de unión a antígeno. La expresión "polipéptido de unión a antígeno" e "inmunoenlazador" se usan simultáneamente en el presente documento. Un "anticuerpo" se refiere a una proteína, opcionalmente glicosilada, que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro o una porción de unión a antígeno de la misma.

55 Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de la 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 la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (*Complementarity Determining Region*, CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (*Framework Regions*, FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que

60 interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la

65

inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan 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 incluidos en la expresión "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 mediante 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 único brazo de un anticuerpo, (v) un único 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, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (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 monocatenarios también tienen por objeto estar incluidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o 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.

La expresión "inmunoenlazador" se refiere a una molécula que contiene todo o una parte del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, todo o parte del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera, de manera que el inmunoenlazador reconozca específicamente un antígeno diana. Los ejemplos no limitantes de inmunoenlazadores incluyen moléculas de inmunoglobulina de longitud completa y scFv, así como fragmentos de anticuerpos, incluyendo pero sin limitación a (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 mediante 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., 3. sup. 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 un único dominio 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 de tiburón (por ejemplo, Ig-NAR de tiburón Nanobodies®; y (vii) un nanocuerpo, una región variable de la cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes.

La expresión "anticuerpo monocatenario", "Fv monocatenario" o "scFv" se refiere a una molécula que comprende un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (o región; V_H) y un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (o región; V_L) conectados mediante un enlazador. Dichas moléculas 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 repetidas de aminoácidos GGGGS o variantes de las mismas. En una realización preferida de la presente divulgación se usa un enlazador (GGGGS)₄ de la secuencia de aminoácidos establecida 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). Se describen otros enlazadores que pueden usarse para la presente divulgación por Alfthan *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, la expresión "propiedad funcional" es una propiedad de un polipéptido (por ejemplo, un inmunoenlazador) para el que una mejora (por ejemplo, con respecto a un polipéptido convencional) es deseable y/o ventajosa para un experto en la materia, por ejemplo, con el fin de mejorar las propiedades de fabricación o la eficacia terapéutica del polipéptido. En una realización, la propiedad funcional es la estabilidad (por ejemplo, estabilidad térmica). En otra realización, la propiedad funcional es la solubilidad (por ejemplo, en 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 determinadas realizaciones, la propiedad funcional no es una mejora en la afinidad de unión a antígeno. En otra realización preferida, la mejora de una o más propiedades funcionales no tiene un efecto sustancial sobre la afinidad de unión del inmunoenlazador.

65

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 a antígeno. Una de las definiciones más utilizadas para las seis CDR fue proporcionada por Kabat E.A. *et al.*, (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. Publicación del NIH 91-3242). Como se usa en el presente documento, la definición de CDR de Kabat solo se aplica para CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena ligera (CDR L1, CDR L2, CDR L3 o L1, L2, L3), así como para CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena pesada (CDR H1 o H1), como se usa en el presente documento, se define por las posiciones de los restos (numeración de Kabat) comenzando con la posición 26 y terminando antes de la posición 36. Esta definición es básicamente una fusión de CDR H1 como se define de manera diferente por Kabat y Chotia (véase también la Figura 1 con fines de ilustración).

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

La expresión "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 normalmente 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 in Methods in Molecular Biology*, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Las expresiones "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. Normalmente, 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 "Kd" se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular. Normalmente, los anticuerpos de la invención se unen al 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 menos, por ejemplo, según se determina usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) en un instrumento BIACORE.

La expresión "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 monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se ubica en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operablemente a una secuencia codificante si altera 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 de ADN circular bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. En otra realización, el vector es un vector vírico, en donde segmentos de ADN adicionales pueden ligarse al genoma vírico. Los vectores que se desvelan en el presente documento pueden ser susceptibles de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero) o pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y, por tanto, se replican junto con el genoma del hospedador (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos).

La expresión "célula hospedadora" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Las células hospedadoras incluyen células bacterianas, microbianas, vegetales o animales, preferentemente, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, células CHO (estirpes de ovario de hámster chino) o NS0.

El término "lagomorfos" se refiere a los miembros del orden taxonómico Lagomorpha, que comprende las familias Leporidae (por ejemplo, liebres y conejos) y Ochotonidae (pikas). En una realización más preferida, los lagomorfos son 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 ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad de monómero de aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada uno de los dos polipéptidos está ocupada por una lisina), 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 huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias.

65

En general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la máxima identidad. 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 en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y un peso de hueco 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 definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido normalmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos que se describen en el presente documento en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no tienen por objeto ser limitantes.

15 Se describen con más detalle diversos aspectos de la invención en las siguientes subsecciones. Se entiende que las diversas realizaciones, preferencias e intervalos pueden combinarse a voluntad. Adicionalmente, 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 AHO. El sistema de numeración AHO se describe adicionalmente en Honegger, A. y Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.* 309: 657-670). Como alternativa, puede usarse el sistema de numeración de Kabat como se describe adicionalmente en Kabat *et al.* (Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., Publicación del NIH N.º 91-3242). Se proporcionan tablas de conversión para los dos sistemas de numeración diferentes utilizados para identificar posiciones de restos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo en A. Honegger, *J.Mol.Biol.* 309 (2001) 657-670.

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un armazón aceptor universal para el injerto de CDR de otras especies animales, por ejemplo, de conejo. Anteriormente se ha descrito que los anticuerpos o derivados de anticuerpos que comprenden los armazones humanos identificados en la selección denominada de "Control de calidad" (documento WO0148017) se caracterizan por una estabilidad y/o solubilidad generalmente altas. Aunque el armazón humano monocatenario FW1.4 (una combinación de la SEQ ID NO: 1 (denominada a43 en el documento WO03/097697) y la SEQ ID NO: 2 (denominada KI27 en el documento WO03/097697)) claramente tuvo un rendimiento inferior en el ensayo de Control de Calidad, se descubrió sorprendentemente que tiene una alta estabilidad termodinámica intrínseca y es bien reproducible, también en combinación con una diversidad de CDR diferentes. La estabilidad de esta molécula puede atribuirse principalmente a sus regiones marco conservadas. Se ha demostrado adicionalmente que FW1.4 es en esencia altamente compatible con los sitios de unión a antígeno de anticuerpos de conejo. Por tanto, el FW1.4 representa un armazón adecuado para construir fragmentos de anticuerpos scFv humanizados estables derivados del injerto de bucles de conejo. Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un armazón aceptor inmunoenlazador, que comprende una secuencia V_H que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y/o una secuencia V_L que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 2, más preferentemente 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 un 60 %, más preferentemente al menos un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, de identidad con la SEQ ID NO: 3.

Además, se descubrió que FW 1.4 podría optimizarse sustituyendo varias posiciones de restos en la cadena pesada de FW1.4 y/o sustituyendo 1 posición en la cadena ligera de FW1.4. De este modo, se descubrió sorprendentemente que la conformación de bucle de una gran diversidad de CDR de conejo en el V_H podría mantenerse por completo, en gran medida independiente de la secuencia del armazón donador. Dichos restos en la cadena pesada así como la posición 1 en la cadena ligera de FW1.4 se conservan en anticuerpos de conejo. El resto de consenso para las posiciones en la cadena pesada, así como la posición única en la cadena ligera, se dedujo del repertorio de conejo y se introdujo en la secuencia del armazón aceptor humano.

Como resultado, el armazón 1.4 modificado (en lo sucesivo en el presente documento denominado rFW1.4) es compatible con prácticamente cualquier CDR de conejo. Además, rFW 1.4 que contiene diferentes CDR de conejo se expresa bien y se produce bien al contrario que las cadenas únicas de tipo silvestre de conejo y aún conserva casi por completo la afinidad de los anticuerpos de conejo donadores originales.

Por tanto, la presente divulgación proporciona el armazón de la cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 1, que comprende adicionalmente uno o más restos de aminoácidos que generalmente soportan la conformación de CDR derivadas de un inmunoenlazador de conejo. En particular, dichos restos están presentes en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en 24H, 25H, 56H, 82H, 84H, 89H y 108H (numeración AHO). Se demuestra que estas posiciones afectan a la conformación de CDR y, por tanto, se contemplan para la mutación para acomodar CDR donadoras. Preferentemente, dichos uno o más restos se seleccionan entre el 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 AHo). Preferentemente, al menos tres, más preferentemente, cuatro, cinco, seis y mucho más preferentemente los siete restos están presentes. Sorprendentemente, se ha descubierto que la presencia de los restos mencionados mejora la estabilidad del inmunoenlazador.

5 La presente divulgación proporciona un armazón aceptor inmunoenlazador que comprende un V_H que tiene al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % e incluso más preferentemente un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 4, con la condición de que al menos uno, más preferentemente al menos tres, más preferentemente, cuatro, cinco, seis y mucho más preferentemente siete restos del grupo que consiste en treonina (T) en la posición 24, valina (V) en la posición 25, alanina (A) o glicina
10 (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 AHo) estén presentes. En una realización preferida, el armazón aceptor inmunoenlazador es un armazón aceptor inmunoenlazador para CDR de conejo.

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

En consecuencia, la presente divulgación proporciona un armazón aceptor inmunoenlazador que comprende

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

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

En una realización muy preferida, el armazón de la 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
30 108 (numeración AHo).

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

En una realización preferida, dicho armazón aceptor inmunoenlazador comprende

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

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

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

45 En otra realización preferida, el armazón aceptor inmunoenlazador es una secuencia que tiene al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % más preferentemente al menos un 95 % de identidad, con respecto a la SEQ ID NO: 5, mientras que la secuencia, preferentemente, no es la SEQ ID NO: 3. Más preferentemente, el armazón aceptor inmunoenlazador comprende o es la SEQ ID NO: 5.

50 En otra realización preferida, el armazón aceptor inmunoenlazador es una secuencia que tiene al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de identidad, con respecto a la SEQ ID NO: 7, mientras que la secuencia, preferentemente, no es la SEQ ID NO: 3. Más preferentemente, el armazón aceptor inmunoenlazador comprende o es la SEQ ID NO: 7.

55 Además, se descubrió sorprendentemente que la presencia del motivo de aminoácidos descrito anteriormente proporciona un armazón, preferentemente un armazón humano, particularmente adecuado para el acomodamiento de CDR de otras especies animales no humanas, en particular CDR de conejo. Dicho motivo no tiene ninguna repercusión negativa sobre la estabilidad de un inmunoenlazador. Las CDR se presentan en una conformación similar a su
60 orientación espacial nativa en el inmunoenlazador de conejo; por tanto, no es necesario injertar posiciones estructuralmente relevantes en el armazón aceptor. En consecuencia, el armazón aceptor inmunoenlazador humano o humanizado comprende al menos tres aminoácidos, preferentemente cuatro, cinco, seis y más preferentemente 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
65 arginina (R) en la posición 108 (numeración AHo).

Los armazones aceptores inmunoenlazadores como se describen en el presente documento pueden comprender una sustitución potenciadora de la solubilidad en el almacén de la cadena pesada, preferentemente en las posiciones 12, 103 y 144 (numeración AHo). Preferentemente, un aminoácido hidrófobo está sustituido con un aminoácido más hidrófilo. Son aminoácidos hidrófilos, por ejemplo, Arginina (R), Asparragina (N), Ácido aspártico (D), Glutamina (Q), Glicina (G), Histidina (H), Lisina (K), Serina (S) y Treonina (T). Más preferentemente, el almacén de la 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.

10 Además, puede haber presentes aminoácidos potenciadores de la estabilidad en una o más posiciones 1, 3, 4, 10, 47, 57, 91 y 103 del almacén de la cadena ligera variable (numeración AHo). Más preferentemente, el almacén de la 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.

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

Por ejemplo, los armazones aceptores que se desvelan en el presente documento pueden usarse para generar un anticuerpo humano o humanizado que conserva las propiedades de unión del anticuerpo no humano del que derivan las CDR no humanas. En consecuencia, la divulgación abarca un almacén aceptor inmunoenlazador como se desvela en el presente documento, que comprende adicionalmente CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de un inmunoenlazador donador, preferentemente de un inmunoenlazador de mamífero, más preferentemente de un inmunoenlazador de lagomorfo y mucho más preferentemente de un conejo.

25 Por tanto, la presente divulgación proporciona un inmunoenlazador específico para un antígeno deseado que comprende

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

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

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 AHo) esté presente en dicha secuencia de almacén de la cadena pesada variable humana.

Preferentemente, el lagomorfo es un conejo. Más preferentemente, el inmunoenlazador comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del inmunoenlazador donador.

45 Como se sabe en la técnica, muchas cadenas V_H de conejo tienen cisteínas apareadas adicionales con respecto a los homólogos murinos y humanos. Además del puente disulfuro conservado formado entre cys22 y cys92, también existe un puente cys21-cys79, así como un puente S-S interCDR formado entre el último resto de CDRH1 y el primer resto de CDR H2 en algunas cadenas de conejos. Además, con frecuencia se encuentran pares de restos de cisteína en la CDR-L3. Además, muchas CDR de anticuerpos de conejo no pertenecen a ninguna estructura canónica conocida anteriormente. En particular, la CDR-L3 es con frecuencia mucho más larga que la CDR-L3 de un homólogo humano o murino.

50 Como se ha indicado anteriormente, el injerto de las CDR no humanas en los armazones que se desvelan en el presente documento produce una molécula en donde las CDR se presentan en una conformación adecuada. Si es necesario, la afinidad del inmunoenlazador puede mejorarse injertando restos de almacén que interaccionan con antígeno del inmunoenlazador donador no humano. Estas posiciones pueden identificarse, por ejemplo,

55 (i) identificando la secuencia progenitora de la estirpe germinal respectiva o, como alternativa, usando las secuencias de consenso en el caso de secuencias almacén altamente homólogas;

(ii) generando una alineación de secuencia de secuencias de dominio variable donador con la secuencia progenitora de estirpe germinal o la secuencia de consenso de la etapa (i); y

60 (iii) identificando restos diferentes.

Se mutaron diferentes restos sobre la superficie de la molécula en muchos casos durante el proceso de generación de afinidad *in vivo*, presumiblemente para generar afinidad por el antígeno.

65

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un inmunoenlazador que comprende el armazón aceptor inmunoenlazador que se describe en el presente documento. Dicho inmunoenlazador puede ser, por ejemplo, un anticuerpo scFv, una inmunoglobulina de longitud completa, un fragmento Fab, un Dab o un Nanocuerpo.

- 5 En una realización preferida, el inmunoenlazador está unido a una o más moléculas, por ejemplo, un agente terapéutico tal como un agente citotóxico, una citocina, una quimiocina, 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.
- 10 El inmunoenlazador como se desvela en el presente documento puede usarse, por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico, aplicación terapéutica, validación de dianas o terapia génica.

La divulgación proporciona adicionalmente un ácido nucleico aislado que codifica el armazón aceptor inmunoenlazador que se desvela en el presente documento o el inmunoenlazador o inmunoenlazadores como se desvelan en el

15 presente documento.

Como se desvela en el presente documento, se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico que se desvela en el presente documento.

- 20 El ácido nucleico o el vector como se desvela en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, en terapia génica.

La divulgación abarca adicionalmente una célula hospedadora que comprende el vector y/o el ácido nucleico que se desvelan en el presente documento.

25

Además, se proporciona una composición, que comprende el armazón aceptor inmunoenlazador como se desvela en el presente documento, el inmunoenlazador como se desvela en el presente documento, el ácido nucleico aislado como se desvela en el presente documento o el vector como se desvela en el presente documento.

- 30 Las secuencias que se desvelan en el presente documento son las siguientes (los restos X son sitios de inserción de CDR):

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=1-50} WVRQAPGKGLEWVS
 (X)_{n=1-50} RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK(X)_{n=1-50} WGQGTL
 35 VTVSS

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

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 40 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLT VLG

SEQ ID NO: 3: armazón de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=1-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=1-50}
 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=1-50}
 WVRQAPGKGLEWVS(X)_{n=1-50} RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
 VYYCAK(X)_{n=1-50} WGQGLVTVSS

- 45 **SEQ ID NO: 4:** armazón de la cadena pesada variable de rFW 1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}

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

RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTLV TVSS

SEQ ID NO: 5: almacón de rFW1.4

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

GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=1-50}

WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50} RFTISRDTSKNTVYLQMNS

5 LRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTLVTVSS

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

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

RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTLVTVSS

10

SEQ ID NO: 7: almacón de rFW1.4 (V2)

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

GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=1-50}

WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=1-50} RFTISKDTSKNTVYLQMNSLR

AEDTAVYYCAR(X)_{n=1-50} WGQGTLVTVSS

15 **SEQ ID NO: 8:** enlazador

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

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

20

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

GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=1-50} FGQGTKLTVLG

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

Se ha desvelado un método general para injertar CDR en almacones aceptores humanos por Winter en la Patente de los EE.UU. N.º 5.225.539 y por Queen et al. en el documento WO9007861A1. La estrategia general para injertar CDR de anticuerpos monoclonales de conejo en almacones seleccionados se relaciona con la de Winter et al. y Queen et al., pero divergen en determinados aspectos clave. En particular, los métodos de la divulgación difieren de la metodología típica de Winter y Queen conocida en la técnica en que los almacones de anticuerpos humanos como se desvelan en el presente documento son particularmente adecuados como aceptores universales para anticuerpos donadores humanos o no humanos. Por tanto, a diferencia del método general de Winter y Queen, la secuencia almacón utilizada para los métodos de humanización de la divulgación no es necesariamente la secuencia almacón que presenta la mayor similitud de secuencia con la secuencia del anticuerpo no humano (por ejemplo, de conejo) del que derivan las CDR donadoras. Además, no se requiere el injerto de restos almacón de la secuencia donadora para

soportar la conformación de CDR. A lo sumo, pueden introducirse aminoácidos de unión a antígeno ubicados en el armazón u otras mutaciones que se produjeron durante la hipermutación somática.

Se describen a continuación detalles particulares de los métodos de injerto para generar anticuerpos humanizados 5 derivados de conejo con alta solubilidad y estabilidad.

En consecuencia, la divulgación proporciona un método de humanización de un inmunoenlazador donador de CDR de conejo que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y/o secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera. El método comprende las etapas de:

10

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

15

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

20

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

25

En una realización muy preferida, el método comprende la etapa de (i) injertar las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada en la cadena pesada e (ii) injertar las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera en la cadena ligera de un inmunoenlazador que tiene al menos un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, más preferentemente al menos un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7. Más preferentemente, el 30 inmunoenlazador es o comprende la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7.

En otra realización, con el fin de mejorar la unión al antígeno, el método puede comprender adicionalmente la etapa de sustituir restos del armazón aceptor por restos del donador que están implicados en la unión al antígeno.

35 En realizaciones de ejemplo de los métodos de la divulgación, en primer lugar se identifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo donador de CDR y se alinean las secuencias usando herramientas de alineación de secuencia convencionales (por ejemplo, algoritmo Needleman-Wunsch y matrices Blossum). La introducción de huecos y la nomenclatura de las posiciones de los restos puede hacerse usando un sistema convencional de numeración de anticuerpos. Por ejemplo, puede usarse el sistema de numeración AHO para dominios variables de 40 inmunoglobulina. El esquema de numeración de Kabat también puede aplicarse puesto que es el criterio más ampliamente adoptado para numerar los restos en un anticuerpo. La numeración de Kabat puede asignarse, por ejemplo, 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 sus colaboradores (Deret et al 1995). La definición de las regiones marco conservadas y CDR generalmente se realiza siguiendo la definición de Kabat, que se 45 basa en la variabilidad de secuencia y es la utilizada más habitualmente. Sin embargo, para CDR-H1, la designación es preferentemente una combinación de las definiciones de Kabat, datos de contacto medios generados mediante análisis de contactos entre anticuerpo y antígeno de un subconjunto de estructuras complejas 3D (MacCallum et al., 1996) y de Chotia que se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales (véase también la Fig. 1). Se proporcionan tablas de conversión para los dos sistemas de numeración diferentes utilizados para identificar 50 posiciones de restos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo en A. Honegger, *J.Mol.Biol.* 309 (2001) 657-670. El sistema de numeración de Kabat se describe adicionalmente en Kabat *et al.* (Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., Publicación del NIH N.º 91-3242). El sistema de numeración AHO se describe adicionalmente en Honegger, A. y Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.* 309: 657-6701.

55

Los dominios variables de los anticuerpos monoclonales de conejo pueden clasificarse, por ejemplo, en subgrupos humanos correspondientes usando, por ejemplo, una implementación 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.* 1 de febrero; 296 (1): 57-86).

60

Las conformaciones de CDR pueden asignarse a las regiones de unión al antígeno donadoras, posteriormente también pueden identificarse las posiciones de restos requeridas para mantener las diferentes estructuras canónicas. Las estructuras canónicas CDR para cinco de las seis regiones hipervariables de anticuerpos de anticuerpos de conejo (L1, L2, L3, H1 y H2) se determinan usando la definición de Chothia (1989).

65

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

- 5 En el caso (ii), dichas células que expresan el antígeno diana pueden ser, por ejemplo, células de mamífero, preferentemente células CHO o HEK293, células de levadura, preferentemente esferoblastos de levadura o células bacterianas que expresan naturalmente la diana de elección o se transforman para expresar la proteína diana en su superficie. Tras la expresión, el antígeno diana puede expresarse en la superficie celular ya sea integrado o unido a la membrana celular. Las células 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 diana expresado en la superficie de las células, es decir, caso (ii), se prefiere especialmente para las proteínas transmembrana, incluso más preferentemente para proteínas que abarcan múltiples membranas, tales como GPCR (*G Protein-Coupled Receptors*) o canales iónicos o cualquier otra proteína de la que la conformación nativa es difícil de mantener tras la expresión y purificación recombinante. En estos casos, la inmunización tradicional con la proteína recombinante es desaconsejable o imposible debido a la pérdida de la conformación nativa de proteínas/complejos integrales de membrana durante el proceso de purificación o debido a cantidades insuficientes de proteína pura. En una realización preferida, un mamífero, más preferentemente un conejo, se inmuniza con ADN en lugar de proteína recombinante, por ejemplo, mediante un protocolo de vacunación con ADN como se desvela en el documento WO/2004/087216. La vacunación con ADN induce una respuesta inmunitaria rápida contra un antígeno nativo. Puesto que no se necesita proteína recombinante, esta tecnología es, por un lado, muy rentable, por otro lado, y lo que es 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 de dicho mamífero inmunizado, preferentemente de dicho conejo o, como alternativa, pueden ser células B ingenuas (*naive B-cells*).

En una etapa posterior de dicho método, las células B, preferentemente las células B de memoria, se aíslan de los órganos linfáticos del animal inmunizado (tal como bazo o ganglios linfáticos), preferentemente 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 células B que expresan anticuerpos específicos de destino diana en su superficie y, en consecuencia, se unen al antígeno diana o al antígeno diana expresado en la superficie celular. En una realización muy preferida, las células B y/o las células diana se tiñen para permitir el aislamiento a través de citometría de flujo basada en la clasificación de complejos de célula B/célula diana o célula 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, la adhesión mediada por cadherinas (Panorchan et al, 2006, *J. Cell Science*, 119, 66-74; Leong et Hibma, 2005, *J. Immunol. Methods*, 302, 116-124) o integrinas (Gawaz et al, 1991, *J. Clin. Invest.*, 88, 1128-1134). Por tanto, en el caso (ii), las células que expresan la diana 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 tanto, pueden seleccionarse "eventos" bicolores, que consisten en dos células que se adhieren entre sí a través de interacciones receptor-diana de células B (véase la Fig. 2).

Como las IgG tienen generalmente una mayor afinidad que las IgM, preferentemente, se seleccionan células B positivas que expresan IgG pero no IgM en su superficie (que es característica de las células B de memoria). Para dicho propósito, se usa preferentemente la tinción multicolor, donde los anticuerpos específicos para IgG e IgM se marcan de forma diferencial, 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, podrían incubarse células B con células que expresan funcionalmente un GPCR (receptor acoplado a proteína G). Puede añadirse un agonista que señala a través de un GPCR a la mezcla para inducir el flujo de salida de Ca^{2+} mediado por GPCR desde el retículo endoplásmico. En caso de que un anticuerpo presentado en una célula B bloquee funcionalmente la señalización del agonista, el flujo de salida de Ca^{2+} también sería bloqueado por esta interacción célula-célula. El flujo de salida de Ca^{2+} puede medirse cuantitativamente mediante citometría de flujo. Por tanto, solo se clasificarían los conglomerados de células B/células diana que muestran aumento o disminución en el flujo de salida de Ca^{2+} .

La etapa de selección va seguida del 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 estirpe celular auxiliar, tal como una estirpe celular auxiliar de timoma (por ejemplo, EL4-B5, véase Zubler et al, 1985, *J. Immunol.*, 134 (6): 3662-3668). Preferentemente, se realiza una etapa de validación sometiendo a ensayo los anticuerpos generados para la unión específica a la diana, por ejemplo, para excluir los anticuerpos que se dirigen contra una proteína que se expresa en la superficie celular distinta de la proteína diana. 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 propósito. Dicho método permite la evaluación de la selectividad y la capacidad de los anticuerpos para competir con el ligando.

65

Después, los anticuerpos generados en la etapa mencionada anteriormente se analizan para identificar las CDR de dichos anticuerpos. Esto puede implicar etapas tales como purificar los anticuerpos, dilucidar su secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico.

5 Por último, las CDR pueden injertarse en armazones aceptores, por ejemplo, mediante síntesis génica con el método de extensión de oligo, preferentemente en los armazones aceptores descritos anteriormente. En una realización, el proceso de injerto de CDR reconocido en la técnica puede usarse para transferir CDR donadoras a armazones aceptores. En la mayoría de los casos, las tres CDR de la cadena pesada se trasplantan del anticuerpo donador a un armazón aceptor único y las tres CDR de la cadena ligera se trasplantan a un armazón aceptor diferente. Se espera
10 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 tanto, los contactos del antígeno con los contactos de la cadena principal podrían conservarse a pesar de las diferentes secuencias). De hecho, los dominios únicos (Ward et al, 1989, *Nature* 341, págs. 544-546) o incluso las CDR únicas (R. Taub et al, 1989, *J. Biol Chem* 264, págs. 259-265) pueden tener actividades de unión a antígeno solamente. Sin
15 embargo, si se trasplantan todas o solo algunas de las CDR, la intención del injerto de CDR es trasplantar el mismo sitio de unión al antígeno o casi el mismo, de anticuerpos animales a humanos (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. 5.225.539 (Winter)).

En otra realización, las CDR del anticuerpo donador pueden alterarse antes o después de su incorporación en el
20 armazón aceptor.

Como alternativa, la caracterización de los anticuerpos se realizaría solo en su formato de inmunoenlazador final. Para este enfoque, las secuencias CDR de anticuerpos expresados en células B clasificadas se recuperan mediante RT-PCR de las células B clasificadas cultivadas o de las células B clasificadas individuales directamente. Para dicho
25 propósito, la multiplicación de las células B y/o la etapa de validación descrita anteriormente y/o la etapa de análisis como se ha descrito anteriormente pueden no ser necesarias. La combinación de dos grupos de oligonucleótidos parcialmente solapados en los que un grupo de oligonucleótidos codifica para las CDR y un segundo grupo codifica las regiones marco conservadas de un armazón inmunoenlazador adecuado permitiría generar un inmunoenlazador humanizado en un procedimiento de PCR de una sola etapa. La secuenciación de alto rendimiento, la clonación y la
30 producción permitirían realizar la selección de clones basada en el rendimiento de los inmunoenlazadores humanizados purificados, en lugar de caracterizar la IgG secretada en el sobrenadante del cultivo celular. En una realización preferida del mismo, el inmunoenlazador es un scFv.

Sin embargo, el injerto de CDR puede dar como resultado una afinidad alterada del inmunoenlazador generado contra el antígeno debido a los restos del armazón que están en contacto con el antígeno. Dichas interacciones pueden ser
35 el resultado de la hipermutación somática. Por tanto, aún puede ser necesario injertar dichos aminoácidos del armazón del donador en el armazón del anticuerpo humanizado. Los restos de aminoácidos del inmunoenlazador no humano implicado en la unión al antígeno pueden identificarse mediante el examen de las secuencias y estructuras de la región variable del anticuerpo monoclonal de conejo. Cada resto en el armazón donador de CDR que difiere de la estirpe
40 germinal puede considerarse relevante. Si no puede establecerse la estirpe germinal más cercana, la secuencia puede compararse con el consenso del subgrupo o el consenso de las secuencias de conejo con un alto porcentaje de similitud. Los restos raros del armazón se consideran como resultado posible de la hipermutación somática y, por tanto, desempeñan una función en la unión.

45 Los anticuerpos de la invención pueden optimizarse adicionalmente para mostrar propiedades funcionales potenciadas, por ejemplo, solubilidad y/o estabilidad potenciadas. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención se optimizan de acuerdo con la metodología de "consenso funcional" que se desvela en la Solicitud PCT N.º de Serie PCT/EP2008/001958, titulada "*Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies*", presentada el 12 de marzo de 2008.

50 Por ejemplo, los inmunoenlazadores pueden compararse con una base de datos de scFvs seleccionados funcionalmente para identificar las posiciones de restos de aminoácidos que sean más o menos tolerantes a la variabilidad que las posiciones correspondientes en inmunoenlazador, lo que indica que dichas posiciones de restos identificadas pueden ser adecuadas para el diseño mediante ingeniería genética para mejorar la funcionalidad, tal
55 como la estabilidad y/o la solubilidad.

Las posiciones de restos armazón de ejemplo para la sustitución y las sustituciones armazón de ejemplo se describen en la Solicitud PCT N.º 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 N.º PCT/CH2008/000284,
60 titulada "Diseño mediante ingeniería genética basada en secuencias y optimización de anticuerpos monocatenarios", presentada el miércoles, 25 de junio de 2008. Por ejemplo, puede introducirse una o más de las siguientes sustituciones en una posición de aminoácido (se hace referencia a la numeración AHo para cada una de las posiciones de aminoácidos que se enumeran a continuación) en la región variable de la cadena pesada de un inmunoenlazador de la divulgación:

65

ES 2 771 150 T3

- (a) Q o E en la posición de aminoácido 1;
- (b) Q o E en la posición de aminoácido 6;
- 5 (c) T, S o A en la posición de aminoácido 7, más preferentemente T o A, incluso más preferentemente T;
- (d) A, T, P, V o D, más preferentemente T, P, V o D, en la posición de aminoácido 10,
- 10 (e) L o V, más preferentemente L, en la posición de aminoácido 12,
- (f) V, R, Q, M o K, más preferentemente V, R, Q o M en la posición de aminoácido 13;
- (g) R, M, E, Q o K, más preferentemente R, M, E o Q, incluso más preferentemente R o E, en la posición de aminoácido 14;
- 15 (h) L o V, más preferentemente L, en la posición de aminoácido 19;
- (i) R, T, K o N, más preferentemente R, T o N, incluso más preferentemente N, en la posición de aminoácido 20;
- 20 (j) I, F, L o V, más preferentemente I, F o L, incluso más preferentemente I o L, en la posición de aminoácido 21;
- (k) R o K, más preferentemente K, en la posición de aminoácido 45;
- (l) T, P, V, A o R, más preferentemente T, P, V o R, incluso más preferentemente R, en la posición de aminoácido 47;
- 25 (m) K, Q, H o E, más preferentemente K, H o E, incluso más preferentemente K, en la posición de aminoácido 50;
- (n) M o I, más preferentemente I, en la posición de aminoácido 55;
- 30 (o) K o R, más preferentemente K, en la posición de aminoácido 77;
- (p) A, V, L o I, más preferentemente A, L o I, incluso más preferentemente A, en la posición de aminoácido 78;
- 35 (q) E, R, T o A, más preferentemente E, T o A, incluso más preferentemente E, en la posición de aminoácido 82;
- (r) T, S, I o L, más preferentemente T, S o L, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 86;
- (s) D, S, N o G, más preferentemente D, N o G, incluso más preferentemente N, en la posición de aminoácido 87;
- 40 (t) A, V, L o F, más preferentemente A, V o F, incluso más preferentemente V, en la posición de aminoácido 89;
- (u) F, S, H, D o Y, más preferentemente F, S, H o D, en la posición de aminoácido 90;
- 45 (v) D, Q o E, más preferentemente D o Q, incluso más preferentemente D, en la posición de aminoácido 92;
- (w) G, N, T o S, más preferentemente G, N o T, incluso más preferentemente G, en la posición de aminoácido 95;
- (x) T, A, P, F o S, más preferentemente T, A, P o F, incluso más preferentemente F, en la posición de aminoácido 98;
- 50 (y) R, Q, V, I, M, F o L, más preferentemente R, Q, I, M, F o L, incluso más preferentemente Y, incluso más preferentemente L, en la posición de aminoácido 103; y
- 55 (z) N, S o A, más preferentemente N o S, incluso más preferentemente N, en la posición de aminoácido 107.

Adicionalmente o como alternativa, puede introducirse una o más de las siguientes sustituciones en la región variable de la cadena ligera de un inmunoenlazador de la divulgación:

- 60 (aa) Q, D, L, E, S o I, más preferentemente L, E, S o I, incluso más preferentemente L o E, en la posición de aminoácido 1;
- (bb) S, A, Y, I, P o T, más preferentemente A, Y, I, P o T, incluso más preferentemente P o T en la posición de aminoácido 2;
- 65

ES 2 771 150 T3

- (cc) Q, V, T o I, más preferentemente V, T o I, incluso más preferentemente V o T, en la posición de aminoácido 3;
- (dd) V, L, I o M, más preferentemente V o L, en la posición de aminoácido 4;
- 5 (ee) S, E o P, más preferentemente S o E, incluso más preferentemente S, en la posición de aminoácido 7;
- (ff) T o I, más preferentemente I, en la posición de aminoácido 10;
- (gg) A o V, más preferentemente A, en la posición de aminoácido 11;
- 10 (hh) S o Y, más preferentemente Y, en la posición de aminoácido 12;
- (ii) T, S o A, más preferentemente T o S, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 14;
- 15 (jj) S o R, más preferentemente S, en la posición de aminoácido 18;
- (kk) T o R, más preferentemente R, en la posición de aminoácido 20;
- (ll) R o Q, más preferentemente Q, en la posición de aminoácido 24;
- 20 (mm) H o Q, más preferentemente H, en la posición de aminoácido 46;
- (nn) K, R o I, más preferentemente R o I, incluso más preferentemente R, en la posición de aminoácido 47;
- 25 (oo) R, Q, K, E, T o M, más preferentemente Q, K, E, T o M, en la posición de aminoácido 50;
- (pp) K, T, S, N, Q o P, más preferentemente T, S, N, Q o P, en la posición de aminoácido 53;
- (qq) I o M, más preferentemente M, en la posición de aminoácido 56;
- 30 (rr) H, S, F o Y, más preferentemente H, S o F, en la posición de aminoácido 57; (ss) I, V o T, más preferentemente V o T, R, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 74;
- (tt) R, Q o K, más preferentemente R o Q, incluso más preferentemente R, en la posición de aminoácido 82;
- 35 (uu) L o F, más preferentemente F, en la posición de aminoácido 91;
- (vv) G, D, T o A, más preferentemente G, D o T, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 92;
- 40 (xx) S o N, más preferentemente N, en la posición de aminoácido 94;
- (yy) F, Y o S, más preferentemente Y o S, incluso más preferentemente S, en la posición de aminoácido 101; y
- 45 (zz) D, F, H, E, L, A, T, V, S, G o I, más preferentemente H, E, L, A, T, V, S, G o I, incluso más preferentemente A o V, en la posición de aminoácido 103.

En otras realizaciones, los inmunoenlazadores comprenden una o más de las mutaciones que potencian la estabilidad que se describen en la Solicitud Provisional de los EE.UU. N.º de serie 61/075.692, titulada "*Solubility Optimization of Immunobinders*", presentada el miércoles, 25 de junio de 2008. en determinadas realizaciones preferidas, el inmunoenlazador comprende una mutación potenciadora de la solubilidad en una posición del aminoácido seleccionada entre el grupo de posiciones de aminoácidos de la cadena pesada que consisten en 12, 103 y 144 (convención de numeración AHo). En una realización preferida, el inmunoenlazador comprende una o más sustituciones seleccionadas entre el grupo que consiste en: (a) Serina (S) en la posición de aminoácido de la cadena pesada 12; (b) Serina (S) o Treonina (T) en la posición de aminoácido de la cadena pesada 103; y (c) Serina (S) o

55 Treonina (T) en la posición de aminoácido de la cadena pesada 144. En otra realización, el inmunoenlazador comprende las siguientes sustituciones: (a) Serina (S) en la posición de aminoácido de la cadena pesada 12; (b) Serina (S) o Treonina (T) en la posición de aminoácido de la cadena pesada 103; y (c) Serina (S) o Treonina (T) en la posición de aminoácido de la cadena pesada 144.

60 En determinadas realizaciones preferidas, el inmunoenlazador comprende mutaciones que potencian la estabilidad en un resto de armazón del armazón 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 AHo. En una realización preferida, el armazón aceptor de la cadena ligera comprende una o más sustituciones seleccionadas entre el 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.

Puede usarse cualquiera de una diversidad de métodos disponibles para producir un anticuerpo humanizado que
5 comprenda una mutación como se ha descrito anteriormente.

En consecuencia, la presente divulgación proporciona un inmunoenlazador humanizado de acuerdo con el método que se describe en el presente documento.

10 En determinadas realizaciones preferidas, el antígeno diana de dicho inmunoenlazador es VEGF o TNF α .

Los polipéptidos que se describen en la presente divulgación o que se generan mediante un método de la presente divulgación pueden sintetizarse, por ejemplo, usando técnicas conocidas en la materia. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones variables deseadas pueden sintetizarse y los polipéptidos
15 pueden producirse mediante métodos recombinantes.

Por ejemplo, una vez que se ha decidido la secuencia de una región variable humanizada, esa región variable o un polipéptido que la comprende pueden prepararse mediante técnicas bien conocidas en la materia de la biología molecular. Más específicamente, pueden usarse técnicas de ADN recombinante para producir una amplia gama de
20 polipéptidos transformando una célula hospedadora 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; los dominios variables de las mismas u otros fragmentos de unión a antígeno de las mismas)).

En una realización, puede prepararse un vector de expresión que incluye un promotor que está unido operativamente
25 a una secuencia de ADN que codifica al menos V_H o V_L. Si es necesario o si se desea, puede prepararse un segundo vector de expresión que incluye un promotor que está unido operativamente 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 estirpe celular (por ejemplo, una estirpe celular de mamífero inmortalizada) puede transformarse entonces con uno o ambos vectores de expresión y puede cultivarse en condiciones que permitan
30 la expresión del dominio variable quimérico o anticuerpo quimérico (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/GB85/00392 de Neuberger *et al.*).

En una realización, pueden prepararse regiones variables que comprenden CDR donadoras y secuencias de aminoácidos FR aceptoras y después pueden introducirse cambios en las moléculas de ácido nucleico para efectuar
35 la sustitución de aminoácidos de CDR.

Los ejemplos de métodos reconocidos en la técnica para preparar una molécula de ácido nucleico que codifica una variante de secuencia de aminoácidos de un polipéptido incluyen, pero sin limitación, preparación mediante mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de un
40 ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido.

La mutagénesis dirigida al sitio es un método preferido para preparar variantes de sustitución. Esta técnica es bien conocida en la materia (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)). Resumiendo, cuando se realiza la mutagénesis dirigida al sitio de ADN, el ADN
45 parental se altera hibridando en primer lugar 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 cadena única del ADN parental como molde. Por tanto, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada se incorpora en el ADN bicatenario resultante.

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

Otro método para preparar variantes, la 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 que se ha de mutar. Se identifica el codón o codones en el ADN parental que se ha de mutar. Debe haber un sitio de endonucleasa de
60 restricción único en cada lado del sitio o sitios de mutación identificados. Si no existen dichos sitios de restricción, pueden generarse usando el método de mutagénesis mediada por oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlos en ubicaciones apropiadas en el ADN que codifica el polipéptido. El ADN plasmídico se corta en estos sitios para linealizarlo. Un oligonucleótido bicatenario que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la mutación o mutaciones deseadas se sintetiza usando procedimientos convencionales, en donde
65 las dos cadenas del oligonucleótido se sintetizan por separado y después se hibridan entre sí usando técnicas

convencionales. Este oligonucleótido bicatenario se denomina casete. Este casete está diseñado para tenga extremos 5' y 3' que sean compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de manera que pueda ligarse directamente al plásmido. Este plásmido ahora contiene la secuencia de ADN mutada.

- 5 Una región variable generada mediante los métodos de la divulgación puede remodelarse y alterarse adicionalmente para aumentar adicionalmente la unión al antígeno. Por tanto, las etapas descritas anteriormente pueden ir precedidas o seguidas de etapas adicionales, incluyendo, por ejemplo, maduración por afinidad. Además, pueden usarse datos de enlace empíricos para una optimización adicional.
- 10 Un experto en la materia entenderá que los polipéptidos de la divulgación pueden modificarse adicionalmente de manera que varíen en la secuencia de aminoácidos, pero no en la actividad deseada. Por ejemplo, pueden hacerse a la proteína sustituciones de nucleótidos adicionales que conduzcan a sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácidos "no esenciales". Por ejemplo, puede reemplazarse un resto de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. En otra realización, puede reemplazarse una cadena de aminoácidos por una cadena estructuralmente similar que difiera en cuanto a su orden y/o composición de miembros de la familia de cadenas laterales, es decir, puede hacerse una sustitución conservadora, en la que un resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar.
- 15
- 20 Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo 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, asparragina, 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).
- 25

Aparte de las sustituciones de aminoácidos, la presente divulgación contempla otras modificaciones, por ejemplo, de las secuencias de aminoácidos de la región Fc con el fin de generar una variante de la región Fc con función efectora alterada. Se puede, por ejemplo, suprimir uno o más restos de aminoácidos de la región Fc con el fin de reducir o potenciar la unión a un FcR. En una realización, uno o más de los restos de la región Fc pueden modificarse con el fin de generar dicha variante de la región Fc. En general, no se suprimirán más de uno a aproximadamente diez restos de la región Fc de acuerdo con la presente realización de la divulgación. La región Fc en el presente documento que comprende una o más supresiones de aminoácidos conservará preferentemente al menos aproximadamente el 80 % y preferentemente al menos aproximadamente el 90 % y mucho más preferentemente al menos aproximadamente el 95 %, de la región Fc de partida o de una región Fc humana de secuencia nativa.

30

35

También pueden prepararse variantes de la región Fc de inserción de aminoácidos, variantes que tienen una función efectora alterada. Por ejemplo, puede introducirse al menos un resto de aminoácido (por ejemplo, de uno a dos restos de aminoácido y generalmente no más de diez restos) adyacente a una o más de las posiciones de la región Fc identificadas en el presente documento como que repercute en la unión de FcR. Por "adyacente" se entiende dentro de uno a dos restos de aminoácidos de un resto de la región Fc identificado en el presente documento. Dichas variantes de la región Fc pueden mostrar una unión de FcRn potenciada o disminuida.

40

Dichas variantes de la región Fc generalmente comprenderán al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. En una realización, pueden combinarse modificaciones de aminoácidos. 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 en el presente documento. En otra realización, un polipéptido puede tener una unión alterada a FcRn y a otro receptor de Fc.

45

- 50 En una realización, los polipéptidos que se describen en la presente divulgación o que se generan mediante un método de la presente divulgación, por ejemplo, regiones variables de Ig humanizada y/o polipéptidos que comprenden regiones variables de Ig humanizada pueden producirse mediante métodos recombinantes. Por ejemplo, puede insertarse una secuencia de polinucleótidos que codifique un polipéptido en un vector de expresión adecuado para la expresión recombinante. Cuando el polipéptido es un anticuerpo, pueden insertarse polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena ligera y pesada adicionales, opcionalmente unidos a regiones constantes, en el mismo o diferente vector de expresión. Una secuencia marcadora de afinidad (por ejemplo, un marcador His(6)) puede unirse o incluirse opcionalmente dentro de la secuencia de polipéptidos para facilitar la purificación corriente abajo. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina están unidos operativamente a secuencias de control en el vector o vectores de expresión que garantizan la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina. Las secuencias de control de expresión incluyen, pero sin limitación, promotores (por ejemplo, promotores asociados de forma natural o heterólogos), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferentemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucarióticas. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de nivel alto de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y purificación del polipéptido.
- 55
- 60
- 65

Estos vectores de expresión normalmente son replicables en los organismos hospedadores como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Habitualmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina o resistencia a la neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.704.362).

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

Otros microbios, tales como la levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* y *Pichia* son hospedadores de levadura de ejemplo, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores inducibles en levaduras 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 divulgación, *E. coli* y *S. cerevisiae* son células hospedadoras preferidas.

Además de los microorganismos, también puede usarse el cultivo de tejidos de mamíferos para expresar y producir los polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas). Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). En realidad, se prefieren las células eucariotas, porque en la técnica se han desarrollado varias estirpes celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas) e incluyen estirpes celulares CHO, diversas estirpes celulares Cos, células HeLa, células 293, estirpes 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 corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Son secuencias de control de la expresión preferidas los promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, las secuencias codificantes de la cadena pesada y ligera y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, habitualmente se utiliza transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, la electroporación, la lipofección, la biolística o la transfección basada en virus pueden usarse para otros hospedadores celulares. (Véase, a título general, 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, a título general, Sambrook *et al.*, citado anteriormente). Para la producción de animales transgénicos, pueden microinyectarse transgenes en ovocitos fertilizados o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias y los núcleos de dichas células pueden transferirse a oocitos enucleados.

El polipéptido objeto también puede incorporarse en transgenes para su introducción en el genoma de un animal transgénico y su posterior expresión, 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 unión operativa con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Los polipéptidos pueden expresarse usando un único vector o dos vectores. Por ejemplo, las cadenas pesada y ligera de anticuerpos pueden clonarse en vectores de expresión separados y cotransfectarse en células.

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

Una vez expresados, los polipéptidos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo la 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, a título general, *Scopes, Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., (1982)).

Cualquiera de las regiones variables de Ig humanizada o los polipéptidos que las comprenden pueden ser expresadas por células hospedadoras o estirpes celulares en cultivo. También pueden expresarse en células *in vivo*. La estirpe celular que se transforma (por ejemplo, se transfecta) para producir el anticuerpo alterado puede ser una estirpe celular de mamífero inmortalizada, tal como las de origen linfoide (por ejemplo, una estirpe celular de mieloma, hibridoma,

trioma o cuadroma). La estirpe celular también puede incluir células linfoides normales, tales como células B, que se han immortalizado mediante transformación con un virus (por ejemplo, el virus de Epstein-Barr).

Aunque normalmente la estirpe celular utilizada para producir el polipéptido es una estirpe celular de mamífero, también pueden usarse estirpes celulares de otras fuentes (tales como bacterias y levaduras). En particular, pueden usarse cepas bacterianas derivadas de *E. coli*, especialmente, por ejemplo, presentación de fagos.

Algunas estirpes celulares linfoides immortalizadas, tales como las estirpes celulares de mieloma, en su estado normal, secretan cadenas ligeras o pesadas de Ig aisladas. Si una estirpe celular de este tipo se transforma con un vector que expresa un anticuerpo alterado, preparado durante el proceso de la divulgación, no será necesario realizar las etapas restantes del proceso, a condición de que la cadena secretada normalmente sea complementaria con el dominio variable de la cadena de Ig codificada por el vector preparado anteriormente.

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

En el caso donde la estirpe celular immortalizada secreta una cadena ligera o pesada complementaria, la estirpe celular transformada puede producirse, por ejemplo, transformando una célula bacteriana adecuada con el vector y después fusionando la célula bacteriana con la estirpe celular immortalizada (por ejemplo, mediante fusión de esferoplastos). Como alternativa, el ADN puede introducirse directamente en la estirpe celular immortalizada mediante electroporación.

En una realización, puede haber presente una región variable de Ig humanizada como se describe en la presente divulgación o generada mediante un método de la presente divulgación en un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo. Los fragmentos pueden producirse de forma recombinante y diseñarse mediante ingeniería genética, sintetizarse o producirse mediante la 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. Como alternativa, el fragmento puede ser un fragmento $F(ab')_2$. Estos fragmentos pueden crearse mediante digestión de 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. Otra alternativa más es usar un anticuerpo de "monocatenario". Los fragmentos F_v monocatenario (scFv) pueden construirse de varias maneras. Por ejemplo, el extremo C-terminal de V_H puede unirse al extremo N-terminal de V_L . Normalmente, un enlazador (por ejemplo, (GGGS)₄) se coloca entre V_H y V_L . Sin embargo, el orden en que pueden unirse las cadenas puede invertirse y pueden incluirse marcadores que faciliten la detección o purificación (por ejemplo, marcadores Myc, His o FLAG) (pueden añadirse marcadores tales como estos a cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la divulgación; su uso no se restringe a scFv). En consecuencia, y como se indica a continuación, los anticuerpos marcados están dentro del alcance de la presente divulgación. En realizaciones alternativas, los anticuerpos que se describen en el presente documento o se generan mediante los métodos que se describen en el presente documento, pueden ser dímeros de cadena pesada o dímeros de cadena ligera. Adicionalmente, puede usarse una cadena ligera o pesada de anticuerpo, o porciones de la misma, por ejemplo, un anticuerpo de dominio único (DAb).

En otra realización, hay presente una región variable de Ig humanizada como se describe en la presente divulgación o generada mediante un método de la presente divulgación en un anticuerpo monocatenario (ScFv) o un minicuerpo (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.837.821 o el documento WO 94/09817A1). Los minicuerpos son moléculas diméricas constituidas por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende una molécula de ScFv (un polipéptido único que comprende uno o más sitios de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio V_L unido por un enlazador flexible a un dominio V_H fusionado con un dominio CH3 a través de un péptido de conexión). Las moléculas ScFv pueden construirse en una orientación V_H -enlazador- V_L o en una orientación V_L -enlazador- V_H . La bisagra flexible que une los dominios V_L y V_H que constituye el sitio de unión a antígeno comprende preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos. Un péptido de conexión de ejemplo para este propósito es (Gly4Ser)₃ (Huston *et al.* (1988). *PNAS*, 85: 5879). Se conocen en la técnica otros péptidos de conexión.

Se conocen bien en la técnica métodos de preparación de anticuerpos monocatenarios, 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 producirse construyendo un componente ScFv y conectando el componente péptido-CH3 usando métodos que se describen en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. 5.837.821 o el documento WO94/09817A1). Estos componentes pueden aislarse de plásmidos separados como fragmentos de restricción y después pueden ligarse y volver a clonarse en un vector apropiado. Puede verificarse el ensamblaje adecuado mediante digestión de restricción y análisis de la 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, puede construirse un minicuerpo tetravalente. Pueden construirse minicuerpos tetravalentes de la misma manera que los minicuerpos, excepto porque se unen dos moléculas de ScFv usando un enlazador flexible, por ejemplo, que tiene una secuencia de aminoácidos $(G_4S)_4G_3AS$.

5 En otra realización, puede haber presente una región variable humanizada como se describe en la presente divulgación o generada mediante un método de la presente divulgación en un diacuerpo. Los diacuerpos son similares a las moléculas de scFv, pero por lo general tienen un enlazador de restos de aminoácidos corto (menos de 10 y preferentemente 1-5) que conecta ambos dominios variables, de manera 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
10 dominio V_H y V_L (respectivamente) en una segunda cadena polipeptídica (documento WO 02/02781).

En otra realización, puede haber presente una región variable humanizada de la divulgación en un fragmento o una porción inmunorreactivos 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 una realización de ejemplo, la
15 porción de unión a FcR es una región Fc completa.

Preferentemente, los métodos de humanización que se describen en el presente documento dan como resultado regiones variables de Ig en las que la afinidad por el antígeno no cambia sustancialmente en comparación con el anticuerpo donador.

20 En una realización, se unen polipéptidos que comprenden los dominios variables de la presente divulgación a antígenos con una afinidad de unión superior a (o igual a) una constante de asociación K_a de aproximadamente $10^5 M^{-1}$, $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$ or $10^{12} M^{-1}$, (incluyendo las afinidades intermedias de estos valores).

25 La afinidad, la avidéz y/o la especificidad pueden medirse de varias maneras. En general, e independientemente de la manera precisa en que se define o mide la afinidad, los métodos de la divulgación mejoran la afinidad de los anticuerpos cuando generan un anticuerpo que es superior en cualquier aspecto de su aplicación clínica al anticuerpo (o anticuerpos) a partir del que se preparó (por ejemplo, los métodos de la divulgación se consideran eficaces o satisfactorios cuando un anticuerpo modificado puede administrarse a una dosis más baja o con menos frecuencia o
30 mediante una vía de administración más conveniente que un anticuerpo (o anticuerpos) a partir del que se preparó).

Más específicamente, la afinidad entre un anticuerpo y un antígeno al que se une puede medirse mediante diversos ensayos, incluyendo, por ejemplo, un ensayo ELISA, un ensayo BiaCore o el ensayo KinExA™ 3000 (disponible de
35 Sapidyne Instruments (Boise, ID)). Resumiendo, se recubren perlas de sefarosa con antígeno (el antígeno utilizado en los métodos de la divulgación puede ser cualquier antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno de cáncer; una proteína de la superficie celular o una proteína secretada; un antígeno de un patógeno (por ejemplo, un antígeno bacteriano o vírico (por ejemplo, un antígeno de VIH, un antígeno de gripe o un antígeno de hepatitis)) o un alérgeno) mediante unión covalente. Se preparan diluciones de anticuerpo que han de someterse a ensayo y se añade cada
40 dilución a los pocillos designados en una placa. Después se añade un anticuerpo de detección (por ejemplo, conjugado de anticuerpo anti-IgG humana de cabra-HRP) a cada pocillo seguido de un sustrato cromógeno (por ejemplo, HRP). La placa se lee después en un lector de placas de ELISA a 450 nm y se calculan los valores de CE50. (Se entiende, sin embargo, que los métodos que se describen en el presente documento son aplicables en general; no se limitan a la producción de anticuerpos que se unen a cualquier antígeno o clase de antígenos particular).

45 Los expertos en la materia reconocerán que determinar la afinidad no siempre es tan simple como mirar una única figura. Puesto que los anticuerpos tienen dos brazos, su afinidad aparente por lo general es muy superior a la afinidad intrínseca entre la región variable y el antígeno (se cree que esto se debe a la avidéz). La afinidad intrínseca puede medirse usando scFv o fragmentos Fab.

50 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 derivatizarse 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 a al menos dos sitios
55 de unión diferentes o moléculas diana. El anticuerpo de la invención puede derivatizarse o unirse a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; dichas moléculas multiespecíficas también tienen por objeto estar incluidas en la expresión "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, puede unirse un anticuerpo de la invención funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética,
60 asociación no covalente u otro) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, antígenos específicos de tumores o específicos de patógenos, péptidos o miméticos de unión, de manera que dé como resultado una molécula biespecífica. En consecuencia, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera molécula de unión que tiene especificidad para una primera diana y una segunda molécula de unión que tiene especificidad para uno o más epítotos diana adicionales.

65

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, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un Fv monocatenario. 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 monocatenaria como se describe en Ladner *et al.*

5 Patente de los EE.UU. N.º 4.946.778.

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

- 10 Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugando las especificidades de unión del constituyente usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y después conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede usarse una diversidad 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)ciclohaxano-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 los descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* N.º 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229: 81-83) y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes conjugados
- 15 20 preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse a través de enlaces sulfhidrilo de las regiones bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra se modifica para que contenga un número impar de restos de sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la

25 conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. 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

30 una molécula monocatenaria que comprenda un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprenda dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. número 5.260.203; la Patente de los EE.UU. Número 5.455.030; la Patente de los EE.UU. Número 4.881.175; la Patente de los EE.UU. Número 5.132.405; la Patente de los EE.UU.

35 Número 5.091.513; la Patente de los EE.UU. Número 5.476.786; la Patente de los EE.UU. Número 5.013.653; la Patente de los EE.UU. Número 5.258.498; y la Patente de los EE.UU. Número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación de células individuales basada

40 en citometría de flujo (por ejemplo, análisis por 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 mediante el empleo de un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de anticuerpos pueden detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo unido a enzima o un fragmento de anticuerpo que reconoce y se une específicamente a los complejos

45 anticuerpo-VEGF. Como alternativa, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radioactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society*, marzo de 1986). El isótopo radiactivo puede detectarse mediante medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

50

En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo de conejo humanizado, o un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados se denominan en el presente documento "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier

55 agente que sea perjudicial para (por ejemplo, destruir) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo,

60 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), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por

65 ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicamicinas, maytansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Hay un ejemplo de un conjugado de anticuerpos contra calicamicina disponible en el mercado (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

5

Las citoxinas pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención usando la tecnología de enlazador disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazador que se han utilizado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Puede elegirse un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico

10

o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para un análisis adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con 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: 730-763; 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.

15

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Se establece en la técnica un método para preparar radioinmunoconjugados. Hay ejemplos de radioinmunoconjugados disponibles en el mercado, incluyendo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y pueden usarse métodos similares para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

20

Los conjugados de anticuerpos de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada y no debe considerarse que el resto farmacológico se limita a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas 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 diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

30

Las técnicas para conjugar dichos restos 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.* (ed.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "*Antibodies For Drug Delivery*", en *Controlled Drug Delivery* (2a Ed.), Robinson *et al.* (ed.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*", en *Monoclonal Antibodies '84: Aplicaciones biológicas y clínicas*. Pinchera *et al.* (ed.), págs. 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.), págs. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe *et al.*, "*The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates*", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

35

En un aspecto, la divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de conejo humanizados para el tratamiento de la enfermedad. La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a preparaciones que están en una forma de manera que permiten que la actividad biológica del anticuerpo o derivado de anticuerpo sea inequívocamente eficaz y que no contienen componentes adicionales que sean 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 mamífero sujeto para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado.

40

Una formulación "estable" es aquella en la que el anticuerpo o derivado de anticuerpo en la misma conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. Hay disponibles en la materia diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pub. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Preferentemente, 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 durante al menos 2 años. Además, la formulación es preferentemente estable después de la congelación (hasta, por ejemplo, -70 °C) y descongelación de la formulación.

50

55

60

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 del color y/o la claridad, o como se mide mediante dispersión de luz UV o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

- 5 Un anticuerpo o derivado de anticuerpo "conserva su estabilidad química" en una formulación farmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es de manera que se considera que la proteína aún conserva su actividad biológica como se define a continuación. La estabilidad química puede evaluarse detectando y cuantificando formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede implicar la modificación del 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.

- 15 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 el 10 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica presentada en el momento la formulación se preparó como se determina en un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo. A continuación se elaboran otros ensayos de "actividad biológica" para anticuerpos.

- 20 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 puede medirse usando un osmómetro de tipo presión de vapor o congelación con hielo, por ejemplo.

- 25 Un "poliol" es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles preferidos en el presente documento 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 los iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un "azúcar no reductor" es uno que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Son ejemplos de azúcares reductores fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa 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.

- 35 Cuando se desea que la formulación sea estable a la congelación-descongelación, el poliol es preferentemente uno que no cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20 °C) de manera que desestabiliza el anticuerpo en la formulación. Los azúcares no reductores tales como sacarosa y trehalosa son los polioles preferidos en el presente documento, prefiriéndose la trehalosa sobre la sacarosa, debido a la estabilidad superior de la solución de trehalosa.

- 40 Como se usa en el presente documento, "tampón" se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes ácido-base conjugados. El tampón de la presente divulgación tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0; preferentemente de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,5; y mucho más preferentemente tiene un pH de aproximadamente 5,0. Los ejemplos de tampones 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 tampones de ácido orgánico. Cuando se desea una formulación estable a la congelación-descongelación, el tampón preferentemente no es fosfato.

- 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 el tratamiento de un trastorno para el tratamiento del cual el anticuerpo o derivado de anticuerpo es eficaz. Una "enfermedad/trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo o derivado de anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

- 55 Un "conservante" es un compuesto que puede incluirse en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en el mismo, facilitando de este modo la producción de una formulación multiusos, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametoniocloruro, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es el alcohol bencílico.

- 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 farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, uno o más de entre agua, tampones (por ejemplo, solución salina neutra o solución salina tamponada 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.

- 5 Como se ha señalado anteriormente, pueden incluirse (pero no necesariamente) otros principios activos en las composiciones farmacéuticas que se proporcionan en el presente documento.

Un vehículo es una sustancia que puede asociarse con un anticuerpo o derivado de anticuerpo antes de la administración a un paciente, con frecuencia con el fin de controlar la estabilidad o la biodisponibilidad del compuesto.

- 10 Los vehículos para su uso dentro de dichas formulaciones son generalmente biocompatibles y también pueden ser biodegradables. Los vehículos incluyen, por ejemplo, moléculas monovalentes o multivalentes tales como albúmina sérica (por ejemplo, humana o bovina), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidoaminas. Los vehículos también incluyen vehículos sólidos tales como perlas y micropartículas que comprenden, por ejemplo, poliglicolato de polilactato, poli(lactida-co-glicolida), poliacrilato, látex,
- 15 almidón, celulosa o dextrano. Un vehículo puede portar los compuestos de varias maneras, incluyendo enlaces covalentes (ya sea directamente o a través de un grupo enlazador), interacción no covalente o mezcla.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier forma apropiada de administración, incluyendo, por ejemplo, la administración tópica, oral, nasal, rectal o parenteral. En determinadas realizaciones, se prefieren

- 20 composiciones en una forma adecuada para su uso oral. Dichas formas incluyen, por ejemplo, píldoras, comprimidos, pastillas, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas o jarabes o elixires. Dentro de otras realizaciones más, las composiciones que se proporcionan en el presente documento pueden formularse en forma de un liofilizado. El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular,
- 25 espinal, intracraneal, intratecal e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar.

Las composiciones destinadas al uso oral pueden prepararse 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

- 30 preparaciones atractivas y agradables al paladar. Los comprimidos contienen el principio activo mezclado con excipientes fisiológicamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Dichos 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 disgregación (por ejemplo, almidón o ácido algínico), agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de
- 35 magnesio, ácido esteárico o talco). Los comprimidos pueden no recubrirse o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y, por tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

- 40 Las formulaciones para su uso oral también pueden presentarse en forma de cápsulas de gelatina dura en donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín) o en forma de cápsulas de gelatina blanda en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso (por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva). Las suspensiones acuosas contienen el anticuerpo o derivado de anticuerpo mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos
- 45 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 la 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
- 50 de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tales como monooleato de polietilensorbitano). 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 aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina. Los jarabes y elixires
- 55 pueden formularse con agentes edulcorantes, tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden comprender uno o más demulcentes, conservantes, agentes aromatizantes y/o agentes colorantes.

Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo los principios 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. Pueden añadirse agentes edulcorantes, tales como los establecidos anteriormente, y/o agentes aromatizantes para proporcionar preparaciones orales agradables al paladar. Dichas suspensiones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como el ácido ascórbico.

65

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo mezclado con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados se ejemplifican por los ya mencionados anteriormente. También puede haber presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes
5 edulcorantes, aromatizantes 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
10 ejemplo, goma arábica o goma de tragacanto), fosfátidos de origen natural (por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol), anhídridos (por ejemplo, monooleato de sorbitano) y productos de condensación de ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol con óxido de etileno (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitano). Una emulsión también puede comprender uno o más agentes edulcorantes y/o aromatizantes.

15 La composición farmacéutica puede prepararse en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril en la que el modulador, dependiendo del vehículo y la concentración utilizada, se suspende o disuelve en el vehículo. Una composición de este tipo puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes, humectantes y/o de suspensión adecuados tales como los mencionados anteriormente. Entre los vehículos y
20 disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, el 1,3-butanodiol, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, pueden emplearse aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, pueden usarse ácidos grasos tales como el ácido oleico en la preparación de composiciones inyectables, y pueden disolverse adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y/o agentes tamponantes
25 en el vehículo.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de 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 generalmente pueden prepararse usando tecnología bien conocida y pueden administrarse
30 mediante, por ejemplo, implantación oral, rectal o subcutánea, o mediante implantación en el sitio diana deseado. Los vehículos para su uso dentro de dichas formulaciones son biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferentemente 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 la duración esperada de la liberación y de la naturaleza de la
35 enfermedad/trastorno que ha de tratarse o prevenirse.

Los anticuerpos o derivados de anticuerpos proporcionados en el presente documento generalmente se administran en una cantidad que consigue una concentración en un líquido corporal (por ejemplo, sangre, plasma, suero, LCR, líquido sinovial, linfa, líquido intersticial celular, lágrimas u orina) que es suficiente para unirse de manera detectable a
40 una diana tal como, por ejemplo, VEGF, y prevenir o inhibir dichas enfermedades/trastornos mediados por diana, por ejemplo, enfermedades/trastornos mediados por VEGF. Se considera que una dosis es eficaz si da como resultado un beneficio discernible para el paciente como se describe en el presente documento. Las dosis sistémicas preferidas varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por día (de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por día), siendo las dosis orales generalmente
45 aproximadamente 5-20 veces más altas que las dosis intravenosas. La cantidad de anticuerpo o derivado de anticuerpo que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del hospedador tratado y el modo de administración particular. Las formas de dosificación unitarias generalmente contendrán entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de un principio activo.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden acondicionarse para tratar afecciones que responden a un anticuerpo o derivado de anticuerpo dirigido, por ejemplo, a VEGF. Las composiciones farmacéuticas acondicionadas pueden incluir un recipiente que contiene una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo como se describe en el presente documento e instrucciones (por ejemplo, etiquetado) que indican que la composición contenida ha de usarse para tratar una enfermedad/trastorno que responde a un anticuerpo o derivado de anticuerpo después de la
55 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 de polialqueno, polialquencileno o polioxialquencileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o no ramificado.
60 Dicho grupo efector puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo*. Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) (PEG) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) o derivados de los mismos. Los polímeros de origen natural particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos. El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da. Para la aplicación local
65 donde el anticuerpo se diseña para penetrar en el tejido, el peso molecular preferido del polímero es de

aproximadamente 5000 Da. La molécula de polímero puede unirse 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. Con respecto a la unión de los restos de PEG, se hace referencia a "*Poly(ethylene glycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications*", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York y

5 "*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 ha descrito anteriormente, se prepara la formulación farmacéutica que lo comprende. El anticuerpo que ha de formularse no se ha sometido a

10 liofilización previa y la formulación de interés en el presente documento es una formulación acuosa. Preferentemente, 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 deseados y el modo o modos de administración, por ejemplo. De aproximadamente 0,1 mg/ml a

15 aproximadamente 50 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml y mucho más preferentemente de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml es una concentración de anticuerpo de ejemplo en la formulación.

Se prepara una formulación acuosa que comprende el anticuerpo o derivado de anticuerpo en una solución de pH tamponado. El tampón de la presente divulgación tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a

20 aproximadamente 6,0, preferentemente de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,5 y mucho más preferentemente tiene un pH de aproximadamente 5,0. Los ejemplos de tampones 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 tampones de ácido orgánico. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente

25 1 mM a aproximadamente 50 mM, preferentemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y la isotonicidad deseada de la formulación. El tampón preferido es acetato de sodio (aproximadamente 10 mM), pH 5,0.

Un poliol, que actúa como tonificador y puede estabilizar el anticuerpo, se incluye en la formulación. En realizaciones preferidas, la formulación no contiene una cantidad tonificante de una sal tal como cloruro de sodio, ya que esto puede

30 provocar que el anticuerpo o derivado de anticuerpo precipite y/o pueda dar como resultado oxidación a pH bajo. En realizaciones preferidas, el poliol es un azúcar no reductor, tal como sacarosa o trehalosa. El poliol se añade a la formulación en una cantidad que puede variar con respecto a la isotonicidad deseada de la formulación. Preferentemente, la formulación acuosa es isotónica, en cuyo caso las concentraciones adecuadas del poliol en la

35 formulación están en el intervalo de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 15 % p/v, preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 10 % p/v, por ejemplo. Sin embargo, también pueden ser adecuadas formulaciones hipertónicas o hipotónicas. La cantidad de poliol añadido también puede modificarse 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 añade un tensioactivo a la formulación de anticuerpo o derivado de anticuerpo. Los tensioactivos de ejemplo incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). La cantidad de tensioactivo añadido es de manera que reduce la

40 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

45 aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,5 %, preferentemente de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,2 % y mucho más preferentemente de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,1 %.

En una realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (es decir, anticuerpo o derivado de anticuerpo, tampón, poliol y tensioactivo) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol

50 bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y Cl de bencetonio. En otra realización, puede incluirse un conservante en la formulación, en particular cuando la formulación es una formulación de múltiples dosis. La concentración de conservante puede estar en el intervalo de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 2 %, mucho más preferentemente de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 1 %. Puede incluirse uno o más vehículos,

55 excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables tales como los que se describen en la 21a edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Osol, A. Ed. (2006) en la formulación a condición de que no afecten negativamente 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 tamponantes adicionales; codisolventes; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes,

60 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 que han de usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante 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, preferentemente un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa en forma de un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. En realizaciones preferidas, la formulación se administra al mamífero mediante administración intravenosa. Para dichos propósitos, la formulación puede inyectarse usando una jeringa o por medio de una vía IV, por ejemplo.

La dosis apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") del anticuerpo dependerá, por ejemplo, de la afección que ha de tratarse, de la gravedad y del curso de la afección, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo, del tipo de anticuerpo utilizado y del criterio del médico tratante. El anticuerpo o derivado de anticuerpo se administra adecuadamente al paciente en un momento o durante una serie de tratamientos y puede administrarse 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 para tratar la afección en cuestión.

Como propuesta 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, siendo el intervalo típico de anticuerpo utilizado de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrado a diario, por ejemplo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. 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, preferentemente una formulación acuosa, y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales y jeringas. El recipiente puede formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. Un recipiente de ejemplo es un vial de vidrio de un solo uso de 3-20 cc. Como alternativa, para una formulación de múltiples dosis, el recipiente puede ser un vial de vidrio de 3-100 cc. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta pegada o asociada al recipiente puede indicar instrucciones para su uso. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

En determinadas realizaciones preferidas, el artículo de fabricación comprende un inmunoconjugado liofilizado como se describe en el presente documento o generado mediante los métodos que se describen en el presente documento.

Ejemplificación

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

Materiales y métodos

En general, la puesta en 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 convencionales 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*, ed. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992). Se han descrito en detalle anteriormente métodos para injertar CDR de conejo y otros anticuerpos monoclonales no humanos sobre armazones de anticuerpos humanos seleccionados. Se exponen a continuación ejemplos de dichos experimentos de injerto.

Con fines de mejor comprensión, los injertos denominados "mín" son aquellos en los que las CDR se injertaron en el armazón 1.4 o un dominio variable del mismo, mientras que los injertos denominados "máx" son aquellos en los que las CDR se injertaron en el armazón 1.4 o un dominio variable del mismo y en donde el armazón comprende adicionalmente restos de armazón donador que interactúan con el antígeno.

Ejemplo 1: Diseño de rFW1.4

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

1.1.1. Recogida de secuencias de inmunoglobulina de conejo

Se recogieron secuencias de dominios variables de anticuerpos maduros de conejo y estirpes germinales de diferentes bases de datos de código abierto (por ejemplo, base de datos Kabat e IMGT) y se ingresaron en una base de datos personalizada como secuencias de aminoácidos de código de una letra. Para todo el análisis los inventores usaron solo la porción de aminoácidos correspondiente a la región V (variable). Se descartaron las secuencias en la base de datos KDB completas en menos del 70 % o que contenían múltiples restos indeterminados en las regiones marco conservadas.

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.

1.1.2. Alineaciones y numeración de secuencias de conejo

Las secuencias de anticuerpos de conejo se alinearon usando herramientas de alineación de secuencia convencionales basadas en el algoritmo Needleman-Wunsch y las matrices Blossum. La introducción de huecos y la nomenclatura de las posiciones de los restos 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, puesto que es el criterio más ampliamente adoptado para numerar los restos en un anticuerpo. La numeración de Kabat se asignó 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 sus colaboradores (Deret et al 1995).

La definición de las regiones marco conservadas y CDR se realizó siguiendo la definición de Kabat, que se basa en la variabilidad de secuencia y es la más utilizada. No obstante, la designación de CDR-H1 fue un compromiso entre diferentes definiciones incluyendo, AbM, kabat, datos de contacto medios generados mediante análisis de contactos entre anticuerpo y antígeno de un subconjunto de estructuras complejas 3D (MacCallum et al., 1996) y Chotia, que se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales (descritas anteriormente y que se muestran en la Fig. 1).

1.1.3. Frecuencia y conservación de las posiciones de los restos

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

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

dónde: N Número total de aminoácidos, r es el número de aminoácidos diferentes presentes en cada posición y n es el número de restos de un tipo de aminoácido particular.

1.1.4. Análisis de linaje de la región V de conejo

Se usaron herramientas de análisis de filogenia para estudiar el repertorio de conejo. Las secuencias de aminoácidos de la región V se agruparon usando algoritmos de agrupación y topológicos. La matriz de distancia se calculó para toda la matriz y se usó como indicación del uso de la estirpe germinal. Se calculó la secuencia de consenso de cada grupo y se identificó el homólogo de la secuencia de la estirpe germinal de conejo más cercana. Además, la secuencia de consenso global se derivó para todo el conjunto de secuencias.

1.1.5. Asignación de subgrupo humano.

Para cada secuencia representativa de conejo de los diferentes grupos, el subgrupo humano más homólogo se identificó usando una implementación 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 armazón aceptor humano

Con el modelo del repertorio de conejo del análisis de secuencia descrito anteriormente, se identificaron los restos en el armazón implicado generalmente en el posicionamiento de las CDR de conejo. Entre los armazones que tenían una alta homología con respecto al repertorio de conejo y los respectivos grupos, se seleccionó uno que tenía buenas propiedades biofísicas entre un conjunto de secuencias completamente humanas. El armazón seleccionado para que sirviera como armazón aceptor pertenece al subgrupo de cadena ligera variable kappa 1 y al subgrupo de cadena variable pesada III con la ID de ESBATech KI 27, a43 correspondientemente. Este armazón de anticuerpo estable y

soluble se ha identificado mediante la detección de una biblioteca de scFv de bazo humano usando un método de detección basado en levaduras denominado sistema de "Control de calidad" (Auf der Maur et al., 2004) y se designó "FW1.4". Aunque la secuencia armazón estable y soluble FW1.4 presenta alta homología, no era la secuencia más homóloga disponible. Los restos identificados se incorporaron en dicho armazón aceptor para generar rFW1.4.

5

Con la información sobre la diversidad de la secuencia de aminoácidos, el uso de la estirpe germinal y las características estructurales de los anticuerpos de conejo, los inventores analizaron FW1.4 para determinar la compatibilidad de las posiciones de restos requerida para conservar la conformación de CDR en el nuevo armazón humano. Los inventores examinaron las regiones variables de FW1.4 para determinar la compatibilidad de las

10

i. Restos que forman parte de las secuencias canónicas para estructuras de bucle.

ii. Restos de armazón ubicados en la interfaz V_L/V_H .

15

iii. La plataforma de restos directamente debajo de las CDR

iv. Restos centrales superiores e inferiores

20

v. Restos de armazón que definen el subtipo

1.3. Injerto de CDR de conejo

Los injertos se generaron simplemente combinando las secuencias de CDR (de acuerdo con la definición anterior) de un anticuerpo con la secuencia armazón de FW1.4 o rFW1.4. Se identificaron los restos potencialmente implicados en la unión. Para cada secuencia de dominio variable de conejo, se identificó el homólogo de estirpe germinal de conejo más cercano. Si no se podía establecer la estirpe germinal más cercana, la secuencia se comparó con el consenso de subgrupo o el consenso de secuencias de conejo con un alto porcentaje de similitud. Los restos de armazón raros se consideraron como un posible resultado de la hipermutación somática y, por tanto, desempeñaban un papel en la unión. Por consiguiente, dichos restos se injertaron en el armazón aceptor.

30

1.4 Resultados

Mediante el análisis del repertorio de anticuerpos de conejo en términos de estructura, diversidad de secuencia de aminoácidos y uso de estirpe germinal, se descubrieron 5 posiciones de restos en la cadena ligera de FW1.4 que se modificaron para mantener la conformación de bucle de las CDR de conejo. Estas posiciones están altamente conservadas en anticuerpos de conejo. El resto de consenso para estas 5 posiciones se dedujo a partir del repertorio de conejo y se introdujo en el armazón aceptor humano 1.4. Con la modificación de estas posiciones conservadas, dicho armazón se volvió prácticamente compatible con las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cualquier CDR de conejo. El rFW1.4 principal que contenía diferentes CDR de conejo se expresa bien y se produce bien al contrario de las cadenas simples de tipo silvestre. Se crearon 16 miembros derivados de la combinación de este armazón y CDR de conejo. La caracterización detallada mostró funcionalidad.

40

Ejemplo 2: Sistema de detección de células B

45

Se ha establecido un sistema de detección basado en FACS (clasificación de células individuales basada en citometría de flujo) en ESBA Tech con el fin de seleccionar las células B que se unen a una diana de interés a través de sus receptores de células B (BCR). Una diana era, por ejemplo, una proteína soluble, es decir, un anticuerpo monocatenario (ESBA903) marcado con un colorante fluorescente (PE y PerCP). La suspensión de linfocitos se preparó a partir del bazo de conejos inmunizados con la diana 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).

50

Las células B positivas para ESBA903 que expresaban IgG pero no IgM en su superficie se clasificaron en placas de 96 pocillos (Figura 3; tabla 2). Por medio de una estirpe celular auxiliar de timoma (EL4-B5: véase Zubler et al., 1985, *J. Immunol.*, 134 (6): 3662-3668), proliferaron células B seleccionadas, se diferenciaron en células plasmáticas y secretaron anticuerpos. La afinidad de estas IgG por la diana se verificó mediante mediciones 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. Por último, se aisló ARNm de 6 clones de interés y se injertaron CDR en el armazón monocatenario FW1.4.

60

65

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

Clon de células B	ka [Ms ⁻¹]	kd [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.

5

Población	n.º de eventos	% parental	% 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
903-células de unión	160	2,9	0,2

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

- 10 Con el fin de evaluar si la presión alta en la corriente de citometría de flujo rompe o no la unión covalente entre dos células, se realizó el siguiente experimento. Se incubaron células CHO transfectadas de manera estable con TNFalfa unido a membrana (células B-220) con perlas recubiertas con un anticuerpo anti-TNFalfa marcado con PE. En la presente configuración, las perlas imitan 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-CD 19). Después de 2 horas de incubación a 4 °C con agitación, la suspensión de célula-perla se analizó mediante FACS (usando una boquilla de 130 um). 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) aproximadamente se unen aproximadamente dos tercios de las perlas a las células (585 unidas contra 267 sin unir). Por el contrario, en las muestras de control (paneles medio e inferior), casi ninguna perla se une a las células CHO. Adicionalmente, 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-TNF alfa se unen a las células CHO, mientras que la gran mayoría de las perlas anti-CD 19 permanecen sin unir. El porcentaje de perlas que se unen a la célula en cada muestra se detalla en la tabla 5. Por tanto, se demuestra que la selección específica de células B individuales que se unen a una proteína
- 15
- 20
- 25 diana de membrana integral a través de su receptor de células B es posible usando citometría de flujo.

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

Población	n.º de Eventos	% Parental	% 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

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

Población	n.º de Eventos	% Parental	% 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	n.º de Eventos	% Parental	% 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)

5

Población	n.º de Eventos	% Parental	% 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 en perlas	% de perlas unidas
Muestra 1	CHO-TNF α (B220)	anti-TNF α	68,0
Muestra 2	CHO-TNF α (B220)	anti-CD19	0,9
Muestra 3	CHO ts	anti-TNF α	1,5
Muestra 4	CHO-TNF α (B220)	anti-TNF α	47,0
		anti-CD19	0,4

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

Se seleccionaron cuatro anticuerpos de conejo anti-TNF α de "Rabmabs" (EPI-1, EPI-15, EP-34, EP-35 y EP-42) para el injerto de CDR. El esquema experimental general para el injerto de CDR, la humanización y la caracterización preliminar de anticuerpos donadores de conejo humanizados se realizó como se esboza en la descripción. A diferencia de los métodos de humanización tradicionales que emplean el armazón aceptor de anticuerpos humanos que comparte la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donador no humano, las CDR de conejo se injertaron en un armazón humano (FW 1.4) que se preseleccionó por sus propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad) usando un ensayo de Control de Calidad (documento WO0148017). Estas secuencias armazón estables y solubles presentaron una alta homología con los RabMab.

Se generaron injertos de CDR para cada uno de los RabMab usando la metodología que se describe en el presente documento. En los injertos "Mín", solo se trasplantaron las CDR de conejo de los dominios V_L y V_H del anticuerpo donador de conejo al armazón aceptor humano FW1.4. Los injertos "Máx" se refieren al injerto de las CDR de conejo a rFW1.4.

Los scFv que se describen y se caracterizan en el presente documento se produjeron como se indica a continuación. Las secuencias de V_L humanizadas se conectaron a secuencias de V_H humanizadas a través del enlazador de la SEQ ID NO: 8 para producir un scFv de la siguiente orientación: NH₂-V_L-enlazador-V_H-COOH. En muchos casos, se sintetizaron de novo secuencias de ADN que codificaban los diversos scFv en el proveedor de servicios Entelechon GmbH (www.entelechon.com). Los insertos de ADN resultantes se clonaron en el vector de expresión bacteriano pGMP002 a través de sitios de restricción NcoI y HindIII introducidos en el extremo 5' y 3' de la secuencia de ADN scFv, respectivamente. Entre la secuencia de ADN del dominio VL y el dominio VH, se encuentra un sitio de restricción BamHI. En algunos casos, el ADN que codifica scFv no se sintetizó de novo, pero las construcciones que expresaban scFv se clonaron mediante la combinación aleatoria de dominios. En consecuencia, los dominios V_L se cortaron y se introdujeron en las nuevas construcciones a través de sitios de restricción NcoI y BamHI, los dominios V_H a través de sitios de restricción BamHI y HindIII. En otros casos, se introdujeron mutaciones puntuales en el dominio V_H y/o V_L usando métodos de PCR de ensamblaje de última generación. La clonación de GMP002 se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2008006235. La producción de los scFvs se realizó de forma análoga que para ESBA105 como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2008006235.

La Tabla 3 representa un resumen de los datos de caracterización detallados para los cuatro anticuerpos monoclonales de conejo (EP6, EP19, EP34, EP35 y EP43) y sus variantes injertadas con CDR. Aunque los injertos de CDR presentaron un amplio intervalo de actividades en los ensayos de unión BIACore y L929, ensayos de citotoxicidad mediada por TNF α , 3 de los 4 injertos máximos ("máx") presentaron actividades terapéuticamente relevantes.

EP43max presentó la afinidad de unión más favorable (K_d de 0,25 nM) y una excelente CE50 en el ensayo de citotoxicidad. Estos datos muestran que FW1.4 (SEQ ID No: 1 y 2) es una región marco conservada aceptadora humana soluble y estable de ejemplo para injertar CDR de conejo.

5 Ensayo de potencia

La actividad neutralizante de los aglutinantes anti-TNF α se evaluó en un ensayo de citotoxicidad mediada por TNF α L929. La toxicidad de las 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 era a una concentración de TNF de 1000 pg/ml. Todas las células L929 se cultivaron en RPMI 1640 con rojo 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 fenol y 5 % de suero de ternera fetal. Se añaden diferentes concentraciones (0-374 ng/ml) de aglutinantes anti-TNF a las células L929 en presencia de 1000 pg/ml de hTNF con el fin de determinar la concentración a la que el efecto antagonista alcanza la inhibición semimáxima (CE50 %) La curva de dosis-respuesta se ajustó a una regresión sigmoidea no lineal con pendiente variable y se calculó la CE50.

Análisis de unión Biacore de scFv anti-TNF

Para las mediciones de afinidad de unión, se emplearon mediciones de resonancia de plasmón superficial con BIAcore™-T100 usando un chip sensor NTA y TNF marcado con His (producido en ESBATech). La superficie del chip sensor NTA consiste en una matriz de dextrano carboximetilado preinmovilizado con ácido nitrilotriacético (NTA) para la captura de moléculas marcadas con histidina a través de la quelación Ni²⁺+NTA. Los trímeros de TNF α N-his humano (5 nM) son capturados por el níquel a través de sus marcadores his N-terminales y se inyecta ESBA105 (analito) a varias concentraciones que varían de 30 nM a 0,014 nM en etapas de dilución en serie con factor de dilución 3. En la etapa de regeneración, el complejo formado por níquel, ligando y analito se lava. 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 (UR). Todas las mediciones se realizan a 25 °C. Se generaron sensorgramas para cada muestra de scFv anti-TNF después de la corrección de la célula de referencia en línea seguida de la sustracción de la muestra de tampón. 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.

Tabla 3: Segunda generación de aglutinantes de TNFalfa

35

Descripción	ID	L929*	kon	koff	K_D	FT-IR TM °C	Rendimiento RF**
EP1_mín	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_máx	1072	ND***	1,11E+04	6,30E-04	5,69E-08	-	44
EP6_máx	674	1,1	2,84E+05	1,45E-04	5,12E-10	48,1	12
EP15_máx	1074	0,39	1,53E+06	2,26E-03	1,48E-09	68,6	57,8
EP19_máx	1007	0,6	2,25E+04	6,54E-05	2,91E-09	53,5	52
EP34_máx	791	10,5	5,86E+05	1,68E-05	2,86E-11	72,4	4,05
EP35_máx	1089	5,20	7,72E+05	1,50E-04	1,94E-10	-	0,66
EP42_máx	1077	ND***	1,21E+05	4,19E-04	3,46E-09	-	47,6
EP43_máx	676	6,4	1,78E+05	4,48E-05	2,51E-10	74,3	21,73
EP34mín_C-His	790	0,2					
EP19máx_C-His	789	1,9					

*L929 [CE50-E105/CE50-X], comparado en unidades de masa [ng/ml] con respecto al rendimiento de ES BA105 (documento WO06/131013)

** (mg/l de solución de plegamiento); *** No Determinado

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

- Se seleccionaron ocho Rabmab anti-VEGF (375, 435, 509, 511, 534, 567, 578 y 610) para el injerto de CDR. A
- 5 diferencia de los métodos de humanización tradicionales que emplean el armazón aceptor de anticuerpos humanos que comparte la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donador no humano, las CDR de conejo se injertaron en un armazón aceptor humano FW1.4 (SEQ ID No: 1 y 2) que se preseleccionó por sus propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad) usando un ensayo de Control de Calidad (documento WO0148017).
- 10 Se generaron varios injertos de CDR para cada uno de los RabMab (anticuerpos de conejo) usando la metodología que se describe en el presente documento (véase el Ejemplo 4). Los injertos "Mín" comprendieron un injerto mínimo en donde solo se trasplantaron las CDR de conejo de los dominios V_L y V_H del anticuerpo donador de conejo al armazón aceptor humano FW1.4 (SEQ ID No: 1). Los injertos "Máx" comprendieron no solo las CDR de conejo para V_L y V_H , sino también algunos restos armazón adicionales del donador de conejo que se predijo que eran importantes
- 15 para la unión a antígeno. En el caso de 578máx, la región marco conservada del dominio variable de la 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 "Mín" y "Máx". Se describe su potencia como inhibidores de VEGF, que se mide usando ELISA de competición de VEGFR
- 20 y/o ensayo HUVEC. Estos datos muestran que FW1.4 (SEQ ID No: 1 y 2) es una región marco conservada aceptadora humana soluble y estable de ejemplo para injertar CDR de conejo.

Análisis de unión Biacore de scFvs anti-VEGF

- 25 Se sometió a ensayo la capacidad de unión a Biacore de scFvs y se midió la afinidad de unión usando el método de resonancia de plasmón de superficie de ejemplo con BIAcore™-T100. Las proteínas VEGF, sometidas a ensayo para determinar la unión mediante 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 de 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 ejemplificaron anteriormente, se acopló a 1 de las 4 células de flujo
- 30 diferentes en un chip sensor CM4 usando un procedimiento de acoplamiento de amina convencional. El intervalo de respuestas obtenidas con estas moléculas de VEGF inmovilizadas después del acoplamiento y el bloqueo fueron ~250-500 unidades de respuesta (UR) para hVEGF₁₆₅, ~200 UR para hVEGF₁₁₀, hVEGF₁₂₁, VEGF₁₆₄ murino, VEGF₁₆₄ de rata y VEGF₁₁₀ de conejo y ~400 UR para PLGF. La cuarta célula de flujo de cada chip se trató de manera similar, excepto porque no se inmovilizaron proteínas antes del bloqueo y la célula de flujo se usó como referencia en línea.
- 40 Se inyectaron 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 tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %) en las células de flujo a una caudal de 30 µl/min durante 5 min. Se permitió que la disociación del scFv anti-VEGF del VEGF en el chip CM4 transcurriera durante 10 min a 25 °C. Se generaron sensorgramas para cada muestra de scFv anti-VEGF después de la corrección de la célula de referencia en línea seguida de la sustracción de la muestra de tampón. 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.
- 45

Ensayo HUVEC de inhibición de VEGF

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

- Se usaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (Promocell), agrupadas de varios donadores,
- 55 en el pase 2 al pase 14. Las células se sembraron a 1000 células/pocillo en 50 µl de medio de crecimiento de células endoteliales completo (ECGM) (Promocell), que contenía ECGS/H al 0,4 %, Suero de ternero fetal al 2 %, Factor de crecimiento epidérmico 0,1 ng/ml, Hidrocortisona 1 µg/ml, Factor básico de fibroblastos 1 ng/ml y penicilina/estreptomina al 1 % (Gibco). Dea 7 a 8 h más tarde, se añadieron a las células 50 µl de medio sin alimentación (ECGM sin suplementos que contenía FCS al 0,5 % inactivado por calor y penicilina/estreptomina al
- 60 1 %) y las células se privaron de alimento durante 15 a 16 horas. Las diluciones en serie con factor de dilución 3 de scFvs anti-VEGF (0,023-150 nM) y se preparó 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 sin alimentación y se preincubaron durante 30-60 min a temperatura ambiente. Las diferentes concentraciones de VEGF se usaron para compensar sus diferentes actividades biológicas relativas. Se usaron concentraciones que estimulaban la proliferación
- 65 inducida por VEGF submáxima (CE₉₀). Se añadieron 100 µl de las mezclas a las placas de cultivo de tejidos de 96

ES 2 771 150 T3

pocillos que contenían la suspensión HUVEC y se incubaron durante 4 días en una incubadora humidificada a 37 °C/CO2 al 5 %. La proliferación de HUVEC se evaluó midiendo la absorbancia a 450 nm (620 nm utilizado como longitud de onda de referencia) después de la adición de 20 µl/pocillo de reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche) usando un lector de microplacas Sunrise (Tecan). Los datos se analizaron usando un ajuste de curva logística de 4 parámetros y la concentración de scFv anti-VEGF requerida para inhibir la proliferación de HUVEC en un 50 % (CE50) se derivó de las curvas de inhibición.

Tabla 4

ID	N.º de proteína.	Actividad rel. hVEGR2 ELISA comp. (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{test} [nM])	Actividad rel. hVEGR1 ELISA comp. (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{test} [nM])	Mediciones Biacore		
				hVEGF ₁₆₅		
				ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
375-mín	857	0,3	ND	9,27E+05	5,01E-03	5,41E-09
375-máx	873	0,6	ND	2,44E+06	6,55E-03	2,68E-09
375-máx C-His	877	0,4	ND	2,93E+05	8,75E-04	2,98E-09
509-mín	854	1,0	2,9	6,23E+05	1,14E-03	1,82E-09
509-máx	855	4,1	13	2,26E+06	2,72E-03	1,21E-09
509-máxII	856	0,6	0,09	8,38E+05	2,82E-03	3,37E-09
511-mín	801	4,9	0,7	5,05E+05	1,28E-03	2,53E-09
511-máx	802	8,7	8	6,59E+05	4,40E-05	6,67E-11
534-mín C-His	807	0,1	ND	2,71E+05	9,21E-03	3,41E-08
534-máx	793	1,1	ND	1,88E+06	1,73E-02	9,21E-09
567-mín	884	9,7	57	2,01E+06	4,61E-04	2,30E-10
567-máx	874	4,1	15,7/54,5	1,20E+06	2,26E-04	1,88E-10
578-mín	820	4,1	4,8	1,14E+06	1,03E-02	9,01E-09
578-máx	821	9,6	35,5/51,6	7,00E+05	3,07E-04	4,39E-10
610-mín	882	0,1	ND	2,51E+05	2,65E-03	1,06E-08
610-máx	883	0,4	ND	5,09E+05	6,01E-04	1,18E-09
435-mín	944	ND	ND	ND	ND	ND
435-máx	945	7,6	ND	1,67E+05	7,55E-04	4,53E-09

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ESBATech, an Alcon Biomedical Research Unit LLC
- 5 <120> Humanización de anticuerpos de conejo utilizando un armazón universal de anticuerpo
- <130> EP791651FZ210pau
- <140> no asignado aún
- 10 <141> 2009-06-25
- <150> EP09768695.0
- <151> 2009-06-25
- 15 <150> PCT/CH2009/000222
- <151> 2009-06-25
- <150> 61/155,041
- <151> 2009-02-24
- 20 <150> 61/155,105
- <151> 2009-02-24
- <150> 832/09
- 25 <151> 2009-06-02
- <150> 61/075,697
- <151> 2008-06-25
- 30 <150> 61/075,692
- <151> 2008-06-25
- <160> 25
- 35 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 232
- <212> PRT
- 40 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> armazón de la cadena pesada variable de FW1.4 (a43)
- 45 <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 que se encuentre en la naturaleza
- 50 <220>
- <221> CDR
- <222> (90)..(139)
- <223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural
- 55 <220>
- <221> CDR
- <222> (172)..(221)
- 60 <223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos se pueden encontrar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural
- <400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 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 Xaa
 35 40 45
 10 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 15 Xaa 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
 20 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 Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 30 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
 35 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 40 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
 45 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 2

50 <211> 231

ES 2 771 150 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> almac3n de la cadena ligera variable de FW1.4(KI27)

<220>

<221> CDR

<222> (24)..(73)

10 <223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 amino3cidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier amino3cido que se encuentre de manera natural

<220>

15 <221> CDR

<222> (89)..(138)

<223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 amino3cidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier amino3cido que se encuentre de manera natural

20 <220>

<221> CDR

<222> (171)..(220)

<223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 amino3cidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier amino3cido que se encuentre de manera natural

25

<400> 2

30 **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

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

40 **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

45 **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
100 105 110

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

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

ES 2 771 150 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
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 Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

20 <210> 3
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> armazón de FW1.4

30 <220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(73)
 <223> LCDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

35 <220>
 <221> CDR
 <222> (89)..(138)
 <223> LCDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

40 <220>
 <221> CDR
 <222> (171)..(220)
 <223> LCDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

45 <220>
 <221> CDR
 <222> (277)..(326)
 <223> HCDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

50 <220>
 <221> CDR
 <222> (341)..(390)
 <223> HCDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

<220>

ES 2 771 150 T3

<221> CDR

<222> (423)..(472)

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

5

<400> 3

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

ES 2 771 150 T3

	210		215		220													
5	Thr 225	Lys	Leu	Thr	Val	Leu 230	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly 235	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	240	
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	255	
10	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro 265	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg 270	Leu	Ser		
	Cys	Ala	Ala	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
15			275					280						285				
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
			290					295						300				
20	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			
25	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	Xaa	
30			355					360						365				
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
			370					375						380				
35	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys		
						390					395					400		
	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala		
40					405					410						415		
	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
				420						425						430		
45	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		

ES 2 771 150 T3

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

Val Ser Ser

5

<210> 4
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> armazón de la cadena pesada variable de rFW1.4

<220>

15

<221> CDR
<222> (26)..(75)
<223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

20

<220>
<221> CDR
<222> (90)..(139)
<223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

25

<220>
<221> CDR
<222> (172)..(221)
<223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

30

<400> 4

35

40

45

50

55

ES 2 771 150 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 10 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 15 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 20 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 25 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 30 Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 40 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 45 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 5
<211> 483
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> almacón de rFW1.4

<220>

10 <221> CDR

<222> (24)..(73)

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

15 <220>

<221> CDR

<222> (89)..(138)

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

20

<220>

<221> CDR

<222> (171)..(220)

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

25

<220>

<221> CDR

<222> (277)..(326)

30 <223> HCDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

<220>

<221> CDR

35 <222> (341)..(390)

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

<220>

40 <221> CDR

<222> (423)..(472)

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

45 <400> 5

50

55

60

ES 2 771 150 T3

	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
5	Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Thr	Cys	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				
10	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	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	
15	65				70					75					80	
	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				85					90					95		
20	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
25			115				120					125				
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	
		130					135				140					
30	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
35					165					170					175	
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa

ES 2 771 150 T3

				180					185					190			
5	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				195				200					205				
10	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Gly	Gln	Gly	
				210				215					220				
15	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
	225					230						235					240
20	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	
					245						250					255	
25	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	
					260				265						270		
30	Cys	Thr	Ala	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			275						280						285		
35	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
									295						300		
40	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	305					310							315				320
45	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
							325					330				335	
50	Glu	Trp	Val	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				340													350
55	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
																	365
60	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
																	380
65	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	
							390				395					400	
70	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	
					405						410					415	
75	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				420							425						430

ES 2 771 150 T3

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

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

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

15 Val Ser Ser

<210> 6

<211> 232

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> armazón de la cadena pesada variable de rFW1.4(V2)

25

<220>

<221> CDR

<222> (26)..(75)

30 <223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

<220>

<221> CDR

<222> (90)..(139)

35 <223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

<220>

<221> CDR

40 <222> (172)..(221)

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

<400> 6

45

ES 2 771 150 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 10 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 15 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 25 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 30 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

<210> 7

<211> 483

45 <212> PRT

<213> Secuencia_Artificial

<220>

<223> amaz3n de rFW1.4(V2)

50

<220>

<221> CDR

ES 2 771 150 T3

<222> (24)..(73)

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

5 <220>

<221> CDR

<222> (89)..(138)

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

10

<220>

<221> CDR

<222> (171)..(220)

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

15

<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 que se encuentre de manera natural

<220>

<221> CDR

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

<223> HCDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

<220>

30 <221> CDR

<222> (423)..(472)

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

35 <400> 7

40

ES 2 771 150 T3

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

ES 2 771 150 T3

	145				150					155					160	
5	Gln	Pro	Asp	Asp	Phe 165	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys 170	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa 175	
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
				180						185				190		
10	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
15	210						215					220				
	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	225					230					235					240
20	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
25			260						265					270		
	Cys	Thr	Val	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			275					280						285		
30	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
35	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
					325					330					335	
40	Glu	Trp	Val	Gly	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			
45	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

ES 2 771 150 T3

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

5 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 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
 435 440 445

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

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

Val Ser Ser

20 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> enlace

<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

30 <210> 9
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> armazón de la cadena ligera variable de FW1.4 sustituida

<220>

<221> CDR

<222> (24)..(73)

40 <223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

<220>

<221> CDR

<222> (89)..(138)

45 <223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre de manera natural

ES 2 771 150 T3

<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 que se encuentre de manera natural

<400> 9

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

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

10 <210> 10
<211> 122

ES 2 771 150 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VH 43_FW1.4_mod

5 <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

<210> 11
<211> 111
<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VL 43_FW1.4_mod

<400> 11
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

ES 2 771 150 T3

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

5 <212> PRT

<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
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

10

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> VL 511_FW1.4_mod

ES 2 771 150 T3

<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

<210> 14

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<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 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

10

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

ES 2 771 150 T3

<210> 15
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> VL 578_FW1.4_mod

<400> 15
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
10 <211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VH 534_FW1.4_mod

ES 2 771 150 T3

<400> 16

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

5 <212> PRT

<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 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

10 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 2 771 150 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 15

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
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

ES 2 771 150 T3

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
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> VH 578rFW1.4

<400> 20
 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
 10 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 771 150 T3

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> VL 578rFW1.4

<400> 21
 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
 10 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> VH 511rFW1.4

15 <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

ES 2 771 150 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 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 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> 23

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> VL 511rFW1.4

<400> 23

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 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 Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
85 90 95

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

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> VH 43rFW1.4

ES 2 771 150 T3

<400> 24

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

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

10 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

1. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:
- 5
- (i) CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de un anticuerpo lagomorfo donador o fragmento de unión a antígeno del mismo y CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo lagomorfo donador o fragmento de unión a antígeno del mismo;
- 10
- (ii) un armazón de la cadena ligera humana variable que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 85 % con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2; y
- 15
- (iii) un armazón de la cadena pesada humana variable, en donde la secuencia de aminoácidos del armazón de la cadena pesada variable es idéntica en al menos un 85 % con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 4 y comprende al menos cuatro de los siguientes aminoácidos: 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 AHo).
2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable comprende:
- 20
- (a) treonina (T) en la posición 24 (numeración AHo);
- 25
- (b) treonina (T) en la posición 84 (numeración AHo); o
 - (c) valina (V) en la posición 89 (numeración AHo).
3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes aminoácidos: Serina (S) en la posición 12; Serina (S) o Treonina (T) en la posición 103; y Serina (S) o Treonina (T) en la posición 144 (numeración AHo).
- 30
4. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable comprende adicionalmente Glicina (G) en la posición 141 (numeración AHo).
- 35
5. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.
- 40
6. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho armazón de la cadena ligera variable comprende la SEQ ID NO: 2.
7. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho armazón de la cadena ligera variable comprende treonina (T) en la posición 87 (numeración AHo).
- 45
8. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 7, en donde dicho armazón de la cadena ligera variable comprende la SEQ ID NO: 9.
9. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho armazón de la cadena pesada variable y dicho armazón de la cadena ligera variable se unen a través de una secuencia de enlace que comprende la SEQ ID NO: 8.
- 50
10. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7.
- 55
11. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 10, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7.
- 60
12. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho armazón de la cadena ligera variable comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes aminoácidos: 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 Valina (V) en la posición 103 (numeración AHo).

13. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un scFv.

14. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde el armazón de la cadena pesada humana variable comprende adicionalmente una valina (V) en la posición 25 y/o una lisina (K) en la posición 82 (numeración AHo).

10

16. Molécula biespecífica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o 15.

15 17. Molécula biespecífica de la reivindicación 16, que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes.

18. Molécula biespecífica de la reivindicación 16 o 17, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está unido a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (incluyendo un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario), antígenos específicos de tumores o específicos de patógenos, péptidos o un mimético de unión.

Figura 1

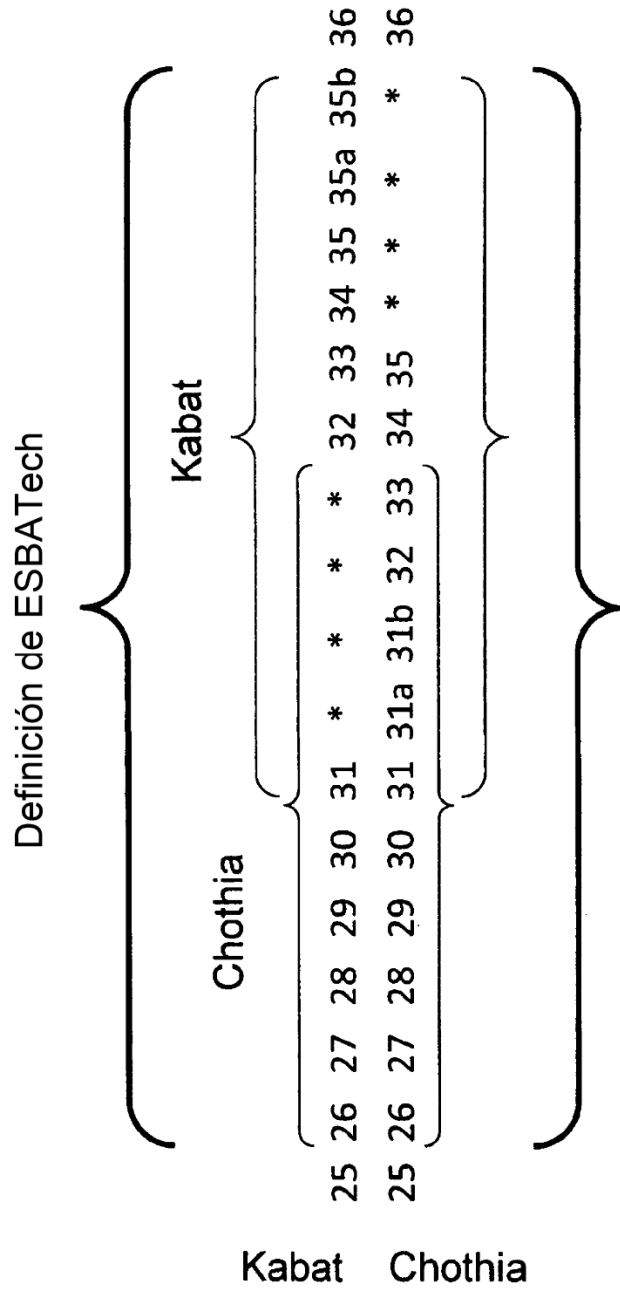


Figura 2

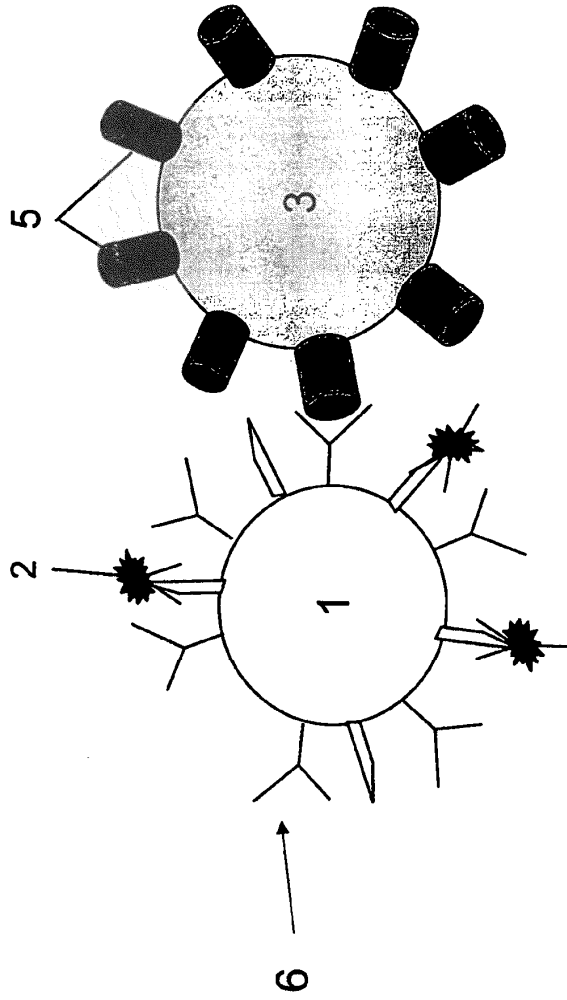


Figura 3A

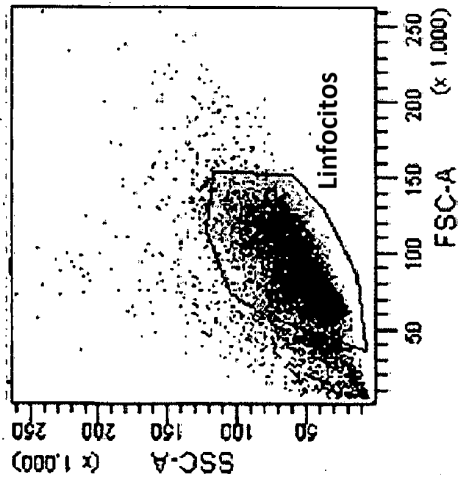


Figura 3B

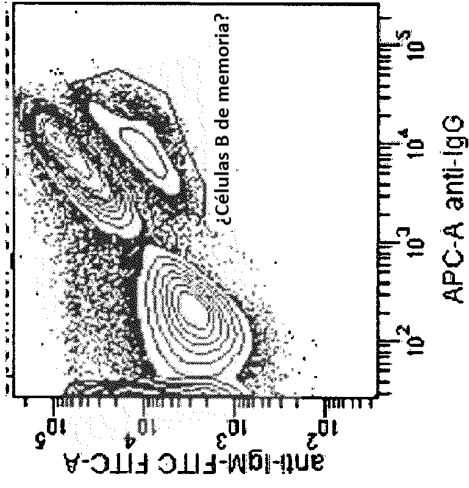


Figura 3C

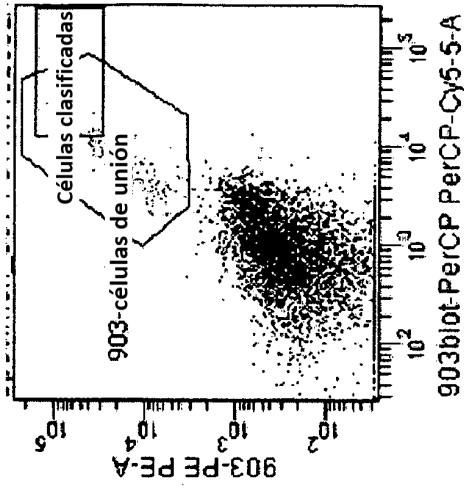


Figura 4

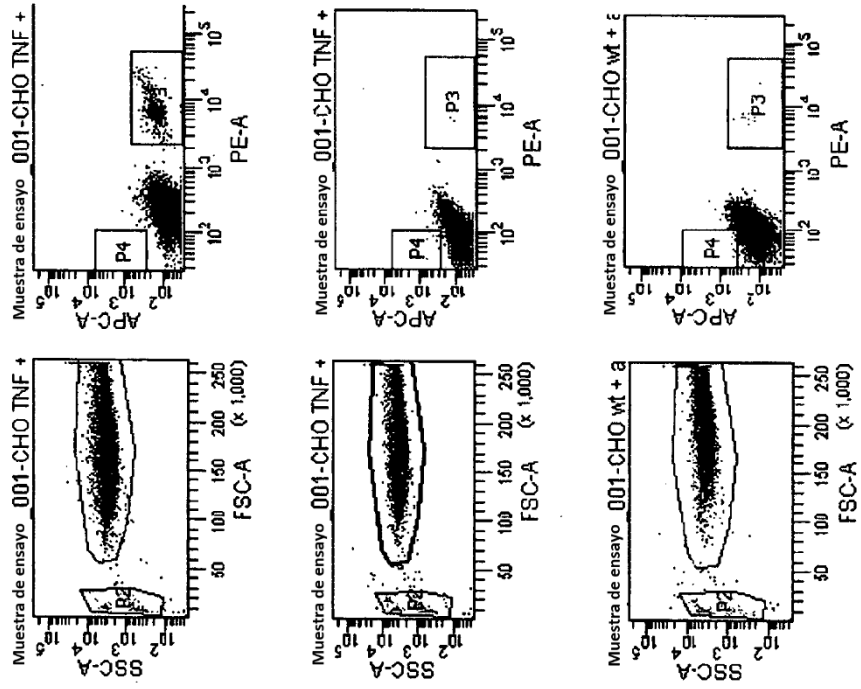


Figura 5

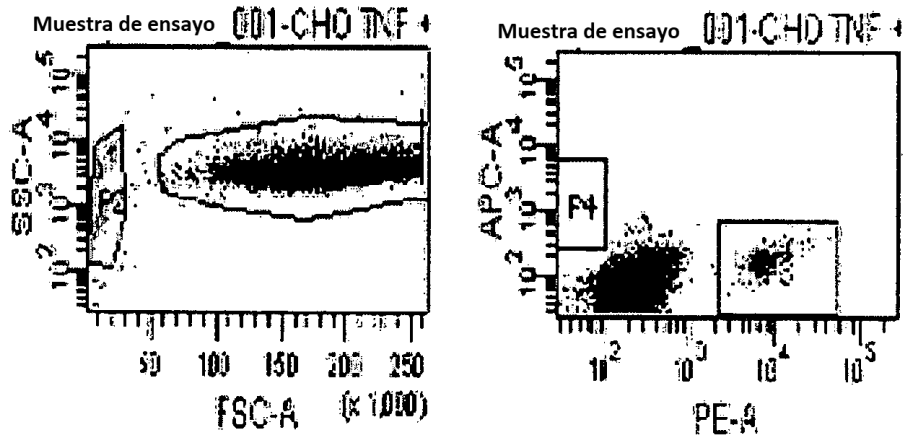


Figura 6

