



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 254**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99960397 .0**

86 Fecha de presentación : **16.11.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1135498**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2001**

54 Título: **Variantes de anticuerpos con una afinidad de unión mayor en comparación con los anticuerpos parentales.**

30 Prioridad: **18.11.1998 US 108945 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Chen, Yvonne, M.;**
Lowman, Henry, B. y
Muller, Yves

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Variantes de anticuerpos con una afinidad de unión mayor en comparación con los anticuerpos parentales.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a un procedimiento para producir variantes de anticuerpos anti-VEGF. En particular, se describen variantes de anticuerpos anti-VEGF de anticuerpos parentales que tienen uno o más aminoácidos insertados en una región hipervariable del anticuerpo parental y una afinidad de unión por un antígeno diana que es por lo menos aproximadamente dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo parental por el antígeno.

15 Descripción de la técnica relacionada

Los anticuerpos son proteínas que muestran especificidad de unión por un antígeno específico. Los anticuerpos nativos son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por un conjunto de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido concretos forman una superficie entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida regularmente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en 3 segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes de los dominios variables más altamente conservadas se denominan regiones de estructura (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprende cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas por 3 CDRs, las cuales forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDRs en cada cadena se mantienen juntos muy próximas por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)).

Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay 5 clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, sólo IgG1, IgG2, IgG3 e IgM se sabe que activan el complemento.

In vivo, la maduración de la afinidad de los anticuerpos está dirigida por la selección de antígenos de variantes de anticuerpos de mayor afinidad que son fabricados principalmente por hipermutagénesis somática. También ocurre frecuentemente un “desplazamiento del repertorio” en el que se observa que los genes de la línea germinal predominante de la respuesta secundaria o terciaria difieren de los de la respuesta primaria o secundaria.

Varios grupos de investigación han intentado mimetizar el proceso de maduración de la afinidad del sistema inmune mediante la introducción de mutaciones en los genes de los anticuerpos *in vitro* y la utilización de la selección de la afinidad para aislar mutantes con mejor afinidad. Dichos anticuerpos mutantes se pueden expresar en la superficie de bacteriófagos filamentosos y se pueden seleccionar anticuerpos por su afinidad por el antígeno o por su cinética de disociación (constante de disociación) del antígeno. Hawkins *et al.* J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992). La mutagénesis de paseo de CDR se ha utilizado para madurar la afinidad de anticuerpos humanos que se unen a la glicoproteína de la cubierta humana gp120 del virus de inmunodeficiencia humano tipo 1 (VIH-1) (Barbas III *et al.* PNAS (USA) 91: 3809-3813 (1994); y Yang *et al.* J. Mol. Biol. 254:392-403 (1995)); y un fragmento Fv de cadena única anti-cerbB-2 (Schier *et al.* J. Mol. Biol. 263:551-567 (1996)). El intercambio de cadenas de anticuerpos y la mutagénesis de CDR se utilizaron para madurar la afinidad de un anticuerpo humano de alta afinidad dirigido contra el tercer bucle hipervariable de VIH (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol. 256: 77-88 (1996)). Balint y Larrick Gene 137: 109-118 (1993) describen una técnica que denominan “mutagénesis parsimoniosa” que implica la mutagénesis por rastreo dirigida por oligodesoxirribonucleótidos asistida por ordenador a través de la cual se buscan simultáneamente y minuciosamente las tres CDR de un gen de la región variable para variantes mejoradas. Wu *et al.* maduraron la afinidad de un anticuerpo humanizado específico de $\alpha\nu\beta 3$ utilizando una estrategia de mutagénesis limitada inicial en la que cada posición de las seis CDR se mutó seguido de la expresión y el cribado de una biblioteca combinatoria que incluye los mutantes de

afinidad más elevada (Wu *et al.* PNAS (Estados Unidos) 95: 6037-6-42 (1998)). Los anticuerpos de fagos se revisan en Chiswell y McCafferty TIBTECH 10:80-84 (1992); y Arder y Barbas III Current Opinión in Biotech 8:503-508 (1997). En los casos descritos en las referencias anteriores en los que los anticuerpos mutantes con afinidad mejorada se compararon con un anticuerpo parental, el anticuerpo mutante tiene sustituciones de aminoácidos en una CDR.

Feeney *et al.* (J. Immunol, 143: 4061-4060, 1989) describen experimentos en los que los ratones se inmunizaron con fosforilcolina y se estudiaron las secuencias y propiedades de unión de los anticuerpos producidos en las respuestas primarias y secundarias.

Wilson *et al.* (J. Exp. Med., 187 (1): 59-70, 1998) describen los efectos de las inserciones y deleciones aleatorias en un gen Vh mutado somáticamente.

Descripción resumida de la invención

A diferencia de los anticuerpos madurados por afinidad de las referencias anteriores, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una variante de anticuerpo contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de un anticuerpo parental, comprendiendo dicho procedimiento la inserción de dos a diez residuos de aminoácido en una Región Determinante de Complementariedad (CDR) H3 de un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo parental, donde la variante de anticuerpo anti-VEGF tiene una afinidad de unión por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es por lo menos dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo parental, y donde por lo menos uno de los residuos insertados es arginina o lisina, o la inserción es adyacente al número de residuo 100 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo parental, utilizando la numeración de residuos del dominio variable como en Rabat.

La presente invención proporciona una variante de anticuerpo contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de un anticuerpo parental, cuya variante de anticuerpo anti-VEGF comprende una inserción de aminoácidos en o adyacente a una Región Determinante de Complementariedad (CDR) H3 de un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo parental, donde la variante de anticuerpo anti-VEGF tiene una afinidad de unión por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es por lo menos dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo parental y donde la CDR H3 del dominio variable de la cadena pesada de la variante de anticuerpo anti-VEGF comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID No: 85, SEC ID No: 53, SEC ID No: 86, SEC ID No: 78, SEC ID No: 54 y SEC ID No: 89. Estas secuencias de CDR H3 pueden estar dispuestas, por ejemplo, en la secuencia del dominio variable de la cadena pesada de SEC ID No: 98 ó 99; ver figura 1B). Preferiblemente, la variante del anticuerpo comprender además un dominio variable de cadena ligera y se une al antígeno de VEGF con una afinidad de unión más fuerte que Y0192 (ver las figuras 1A y 1B; SEC ID Nos 95 y 96).

En la presente invención se contemplan varias formas de la variante del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo pueden ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, que tiene una región constante de inmunoglobulina humana) o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un F(ab')₂). Además, la variante del anticuerpo puede estar marcada con un marcador detectable, inmovilizada en una fase sólida y/o conjugada con un compuesto heterólogo (tal como un agente citotóxico).

La presente invención proporciona además: ácido nucleico aislado que codifica la variante de anticuerpo que se reivindica; un vector que comprende el ácido nucleico, opcionalmente, unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; una célula huésped transformada con el vector; un proceso para producir la variante del anticuerpo que comprende el cultivo de esta célula huésped, de manera que el ácido nucleico se expresa y, opcionalmente, la recuperación de la variante del anticuerpo del cultivo de células huésped (por ejemplo, del medio de cultivo de células huésped).

La presente invención también proporciona una composición que comprende las variantes de anticuerpo reivindicadas y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Esta composición para uso terapéutico es estéril y se puede liofilizar.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B muestran una alineación de secuencias de la región variable de cadena ligera (figura 1A) y de la región variable de la cadena pesada (figura 1B) de diversas variantes del anticuerpo anti-VEGF humanizado F(ab)-12. EL clon del Fab en fago parental Y0192 contiene mutaciones en la cadena ligera que no afectan de manera significativa a la afinidad de unión a antígeno, y ha sido descrito (WO98/45331). Otra variante, Y0238-3, contiene mutaciones en la CDR H1 que mejoran la unión a antígeno (WO98/45331). La variante Y0239-19 contiene el motivo "VNERK" identificado en selecciones de las bibliotecas de inserción de la CDR H3 descritas en la presente invención. La variante Y0313-2 contiene las mutaciones en la CDR H1 de Y0238-3 combinadas con las mutaciones en la CDR H3 de Y0239-19. Las diferencias de F(ab)-12 están destacadas con rectángulos. Los identificadores de secuencia en las figuras 1A y 1B son los siguientes: dominio variable de la cadena ligera de F(ab)-12 (SEC ID No: 94); dominio variable de la cadena ligera de Y0192, Y0238-3, Y0239-19 e Y0313-2 (SEC ID No: 95); dominio variable de la cadena pesada de F(ab)-12 e Y0192 (SEC ID No: 96); dominio variable de la cadena pesada de Y0238-3 (SEC ID No: 97); dominio variable de la cadena pesada de Y0239-19 (SEC ID No: 98); y el dominio variable de la cadena pesada de Y0313-2 (SEC ID No: 99).

La figura 2 muestra la inhibición de la actividad de VEGF en un bioensayo basado en células mediante Fab, F(ab)-12 y variante de Fab Y0313-2.

La figura 3 muestra una parte del modelo tridimensional de F(ab)-12 en el complejo con VEGF tal y como se determina mediante cristalografía con rayos X (Muller *et al.*, Structure 6(9): 1153-1167 (1998)). El principal resto de la cadena de la región CDR H3 del anticuerpo se representa como un lazo magenta a la derecha. La representación en superficie de una parte de VEGF se representa a la izquierda, con varios residuos proximales destacados en rojo (ácidos) o morado (básicos). La cadena lateral de D41 de VEGF se puede observar como un sitio de potencial interacción con un hipotético péptido de inserción en la CDR H3.

La figura 4 muestra una superposición de partes del modelo tridimensional de F(ab)-12 en el complejo con VEGF (ambas moléculas en gris; Muller *et al.*, *supra*) con un modelo de la variante de inserción Fab Y0313-2 (verde) en el complejo con VEGF (amarillo). El último modelo se basa en la determinación cristalográfica por rayos X de la estructura del complejo variante descrito en la presente invención. La figura ilustra que se observa un pequeño cambio estructural en el complejo en comparación con el complejo de F(ab)-12, excepto en la proximidad inmediata de las mutaciones V104, N104a, E104b, R104c y K105.

La figura 5 muestra una comparación de las partes del modelo tridimensional de F(ab)-12 en el complejo con VEGF (a la derecha; Muller *et al.*, *supra*) con un modelo de Fab Y0313-2 en el complejo con VEGF (a la izquierda) tal y como se describe en la presente invención. En cada caso, VEGF se muestra en amarillo y el Fab respectivo se muestra en verde. En el complejo Y0313-2, se puede observar que V104 y R104c realizan nuevos contactos con VEGF.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada.

El término “región hipervariable” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman estructuralmente bucles definidos. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (es decir, los residuos 24-34 (“CDR L1”), 50-56 (“CDR L2”) y 89-97 (“CDR L3”) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (“CDR H1”), 50-65 (“CDR H2”) y 95-102 (“CDR H3”) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, los residuos 26-32 (“bucle L1”), 50-52 (“bucle L2”) y 91-96 (“bucle L3”) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (“bucle H1”), 53-55 (“bucle H2”) y 96-101 (“bucle H3”) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). En ambos casos, los residuos del dominio variable se numeran según Kabat *et al.*, *supra*. Los residuos “framework” o “FR” son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal y como se definen en la presente invención.

La expresión “el residuo del dominio variable que se numera como en Kabat” se refiere al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de CDR H2 y los residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de residuos se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat “estándar”.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región variable o de unión a antígeno. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diabodies; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen habitualmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo al obtener-

se de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención se pueden fabricar mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en la presente invención incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) “quiméricos” en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con, u homóloga, a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico con, u homólogo a, las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de, como mínimo, uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente, como mínimo, una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986), Reichmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena única” o “sFv” comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término “diabodies” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

La expresión “anticuerpos lineales” cuando se utiliza a lo largo de esta solicitud se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos tándem Fd (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Un “anticuerpo parental” es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que carece, o es deficiente en, uno o más residuos de aminoácido en o adyacente a una o más regiones hipervariables de la misma en comparación a una variante de anticuerpo tal y como se describe en la presente invención. De este modo, el anticuerpo parental tiene una región hipervariable más corta que la correspondiente región hipervariable de un anticuerpo de una variante de anticuerpo tal y como se describe en la presente invención. El polipéptido parental puede comprender un anticuerpo (incluyendo una variante alélica natural) de secuencia nativa (es decir, natural) o un anticuerpo con modificaciones (tal como otras inserciones, deleciones y/o sustituciones) en la secuencia de aminoácidos preexistente de una secuencia natural. Preferiblemente, el anticuerpo parental es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

Tal y como se utiliza en la presente invención, “variante de anticuerpo” se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo parental. Preferiblemente, la variante de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza. Dichas variantes necesariamente tienen menos de un 100% de identidad o similitud en la secuencia con el anticuerpo parental. En una realización preferida, la variante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos de aproximadamente un 75% a menos de un 100% de identidad o similitud en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferiblemente de aproximadamente un 80% a menos de un 100%, más preferiblemente de aproximadamente un 85% a menos de un 100%, más preferiblemente de aproximadamente un

90% a menos de un 100%, y aún más preferiblemente de aproximadamente un 95% a menos de un 100%. Identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en la presente invención como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, mismos residuos) a los residuos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se interpretará que afecte a la identidad o similitud en la secuencia. La variante del anticuerpo es generalmente aquella que tiene una región hipervariable más larga (por uno o más residuos de aminoácido; por ejemplo, por aproximadamente uno a aproximadamente 30 residuos de aminoácido y, preferiblemente, por aproximadamente dos a aproximadamente diez residuos de aminoácido) que la correspondiente región hipervariable de un anticuerpo parental.

Una “alteración de aminoácidos” se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos predeterminada. Entre las alteraciones de ejemplo se incluyen inserciones, sustituciones y deleciones.

Una “inserción de aminoácidos” se refiere a la introducción de uno o más residuos de aminoácido en una secuencia de aminoácidos predeterminada.

La inserción de aminoácidos puede comprender una “inserción de péptidos” en cuyo caso un péptido que comprende dos o más residuos de aminoácido unidos por un enlace o enlaces peptídicos se introduce en la secuencia de aminoácidos predeterminada. Cuando la inserción de aminoácidos implica la inserción de un péptido, el péptido insertado se puede generar mediante mutagénesis aleatoria, de manera que tiene una secuencia de aminoácidos que no existe en la naturaleza.

El residuo o residuos insertados pueden ser “residuos de aminoácido naturales” (es decir, codificados por código genético) y se seleccionan del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cistina (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr) y valina (Val).

La inserción de uno o más residuos de aminoácido no naturales también está comprendida por la definición de una inserción de aminoácido en la presente invención. Un “residuo de aminoácido no natural” se refiere a un residuo, diferente de los residuos de aminoácido naturales indicados anteriormente, que es capaz de unirse covalentemente a un residuo o residuos de aminoácido adyacentes en una cadena polipeptídica. Entre los ejemplos de residuos de aminoácido no naturales se incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácido tales como los descritos en Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202:301-336 (1991). Para generar dichos residuos de aminoácido no naturales, se pueden utilizar los procedimientos de Noren *et al.* Science 244:182 (1989) y Ellman *et al.*, *supra*. Brevemente, estos procedimientos implican la activación química de un ARNt supresor con un residuo de aminoácido no natural seguido de una transcripción y traducción *in vitro* del ARN.

Una inserción de aminoácidos “en una región hipervariable” se refiere a la introducción de uno o más residuos de aminoácido en una secuencia de aminoácidos de la región hipervariable.

Una inserción de aminoácidos “adyacente a una región hipervariable” se refiere a la introducción de uno o más residuos de aminoácido en el extremo N-terminal y/o C-terminal de una región hipervariable, de manera que por lo menos uno de los residuos de aminoácido insertados forma un enlace peptídico con el residuo de aminoácido N-terminal o C-terminal de la región hipervariable en cuestión.

Una “sustitución de aminoácidos” se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada por otro residuo de aminoácido diferente.

El término “interacciones potenciales de aminoácidos” se refiere a contactos o interacciones energéticamente favorables entre uno o más residuos de aminoácido presentes en un antígeno y uno o más residuos de aminoácido que no existen en un anticuerpo parental, pero que se pueden introducir en el mismo para aumentar los contactos de aminoácidos entre el antígeno y una variante de anticuerpo que comprende el residuo o residuos de aminoácido introducidos. Preferiblemente, las interacciones de aminoácidos de interés se seleccionan del grupo que consiste en enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones iónicas.

El término “antígeno diana” se refiere en la presente invención a un antígeno predeterminado al que se unen tanto un anticuerpo parental como una variante de anticuerpo tal y como se han definido en la presente invención. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Preferiblemente, el antígeno diana es un polipéptido. Aunque la variante de anticuerpo se une al antígeno diana con mejor afinidad de unión que el anticuerpo parental, éste generalmente tiene un valor de afinidad de unión (K_d) para el antígeno diana de no más de aproximadamente 1×10^{-5} M, y preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-6} M.

Un anticuerpo “aislado” es el que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilizaciones de diagnóstico y terapéuticas para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos.

y no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el procedimiento de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

“Tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Entre aquéllos que necesitan el tratamiento se incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno así como aquéllos a los que se debe prevenir el trastorno.

Un “trastorno” es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la variante de anticuerpo. Éste incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión.

“Mamífero” para los objetivos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, primates no humanos, y animales de zoológico, de deporte o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

El término “agente citotóxico” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen la adriamicina, la doxorubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina (“Ara-C”), la ciclofosfamida, el tiotepa, el taxótero (docetaxel), el busulfano, la citoxina, el taxol, el metotrexato, el cisplatino, el melfalano, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C, la mitoxantrona, la vincristina, la vinorelbina, el carboplatino, el tenipósido, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (ver Patente de Estados Unidos N° 4.675.187), el melfalano, y otros gases de nitrógeno relacionados.

El término “profármaco” tal y como se utiliza en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica a las células tumorales en comparación con el fármaco parental y que es capaz de ser activada o convertida enzimáticamente en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy”, Biochemical Society Transactions, 14, páginas 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), páginas 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos que contienen D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactamas, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Entre los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para su utilización en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

La palabra “marcador” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Por “fase sólida” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas que se engloban en la presente invención se incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, polivinilalcohol y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149.

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como las variantes de anticuerpo descritas en la presente invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica tal como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

Tal y como se utilizan en la presente invención, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan indistintamente y todas estas designaciones incluyen progenie. De este modo, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula sujeto primaria y cultivos derivados de la misma sin considerar el número de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica según se criba en la célula originalmente transformada. Cuando se pretendan designaciones diferentes, serán evidentes a partir del contexto.

II. Modos de llevar a cabo la presente invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para fabricar una variante de anticuerpo. El anticuerpo parental o el anticuerpo inicial se prepara mediante técnicas disponibles en el sector para generar dichos anticuerpos. En las siguientes secciones se describen con mayor detalle procedimientos de ejemplo para la generación de anticuerpos.

El anticuerpo parental se dirige contra un antígeno diana de interés. Preferiblemente, el antígeno diana es un polipéptido importante biológicamente y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar lugar a un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se consideran los anticuerpos dirigidos contra antígenos no-poli-peptídicos (tales como los antígenos de glicolípido asociados a tumor; ver Patente de Estados Unidos 5.091.178).

Cuando el antígeno es un polipéptido, puede tratarse de una molécula transmembrana (por ejemplo, un receptor) o de un ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos de ejemplo incluyen moléculas tales como la renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; el factor de liberación de la hormona del crecimiento; la hormona paratiroidea; la hormona de estimulación tiroidea; las lipoproteínas; la alfa-1-antitripsina; la cadena A de la insulina; la cadena B de la insulina; la proinsulina; la hormona de estimulación del folículo; la calcitonina; la hormona luteinizante; el glucagón; factores coagulantes tales como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular, y el factor de von Willebrands; factores anticogulantes tales como la Proteína C; el factor natriurético atrial; el surfactante pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como la uroquinasa o la orina humana o el activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); la bombesina; la trombina; el factor de crecimiento hematopoyético; los factores alfa y beta de necrosis tumoral; la encefalina; RANTES (expresión y secreción de células T normales reguladas en activación normal); la proteína inflamatoria de macrófago humano (MIP-1-alfa); una albúmina de suero tal como la albúmina de suero humana; la sustancia inhibidora de Muellerian; la cadena A de la relaxina; la cadena B de la relaxina; la prorrelaxina; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa; la DNasa; la IgE; un antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); los receptores para hormonas o los factores de crecimiento; la proteína A o D; los factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), la neurotrofina-3, 4, 5, ó 6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso; el factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como TGF-alfa y TGF-beta; los factores de crecimiento I y II de tipo insulina (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro); las proteínas de unión del factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD tales como la CD3, la CD4, la CD8, la CD19 y la CD20; la eritropoyetina; los factores osteoinductivos; las inmunotoxinas; una proteína morfogenética de hueso (BMP); un interferón tal como el interferón-alfa, beta, y gamma; factores de estimulación de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; las interleuquinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a la IL-10; la superóxido dismutasa; los receptores de células T; las proteínas de membrana superficiales; los factores de aceleración

de la descomposición; antígeno viral tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura del SIDA; las proteínas de transporte; los receptores de acogida; adreínas; las proteínas reguladoras; integrinas tales como la CD11a, la CD11b, la CD11c, la CD18, ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como los receptores de HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

Las dianas moleculares preferentes para anticuerpos comprendidas en la presente invención incluyen a proteínas CD tales como la CD3, la CD4, la CD8, la CD19, y la CD34; miembros de la familia del receptor ErbB tales como el receptor de EGF, el receptor de HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como la LFA-1, Mac1, p250,95, VLA-1, ICAM-1, VCAM y la integrina $\alpha v/\beta 3$ incluyendo subunidades alfa o beta de la misma (por ejemplo, los anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimientos tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; el receptor de flk2/flt3; el receptor de obesidad (OB); el receptor *mp1*; CTLA-4; la proteína C etc.

El antígeno utilizado para generar un anticuerpo puede aislarse a partir de una fuente natural del mismo, o puede producirse de manera recombinante o fabricarse utilizando otros procedimientos sintéticos. De modo alternativo, pueden utilizarse células que comprenden antígeno nativo o recombinante como inmunógenos para fabricar anticuerpos.

El anticuerpo parental puede tener fuerte afinidad de unión preexistente hacia el antígeno diana. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede unirse al antígeno de interés con un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y de un modo aún más preferente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M.

Por ejemplo, puede determinarse la “afinidad de unión” del anticuerpo mediante procedimientos de equilibrio (por ejemplo ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o cinéticos (por ejemplo análisis BIACORE™; ver Ejemplo 1 más adelante).

Además, el anticuerpo puede someterse a otros “ensayos de actividad biológica”, por ejemplo, con el fin de evaluar su “potencia” o actividad farmacológica y eficacia potencial como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso pretendido del anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de adhesión de la monocapa de queratinocitos y el ensayo de la respuesta de linfocitos mezclados (MLR) para ensayos de inhibición del crecimiento celular de tumores CD11a (ver WO98/23761) (tal y como se describe en WO 89/06692, por ejemplo); los ensayos de citotoxicidad celular dependientes de anticuerpo (ADCC) y de citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (Patente de Estados Unidos 5.500.362); los ensayos de hematopoyesis o actividad agonista (ver WO 95/27062); el ensayo de incorporación de timidina tritiada; y el ensayo azul alamar para medir la actividad metabólica de células en respuesta a una molécula tal como VEGF (ver Ejemplo 1 más adelante).

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental se altera para generar una variante de anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por el antígeno diana que el anticuerpo parental. La variante del anticuerpo tiene preferiblemente una afinidad de unión por el antígeno diana que es por lo menos dos veces más fuerte (por ejemplo se mejora la afinidad de unión desde aproximadamente dos veces hasta aproximadamente 1000 veces o incluso hasta aproximadamente 10.000 veces), preferiblemente por lo menos aproximadamente cinco veces más fuerte, y preferiblemente por lo menos aproximadamente diez veces o 100 veces más fuerte, que la afinidad de unión del anticuerpo parental por el antígeno. La mejora deseada o requerida en la afinidad de unión puede depender de la afinidad de unión inicial del anticuerpo parental.

Cuando el ensayo utilizado es un ensayo de actividad biológica, la variante del anticuerpo tiene preferiblemente una potencia en el ensayo de actividad biológica para elegir cual es como mínimo aproximadamente dos veces mayor (por ejemplo se mejora la potencia de aproximadamente dos veces hasta aproximadamente 1000 veces o incluso hasta aproximadamente 10.000 veces), preferiblemente por lo menos aproximadamente 20 veces mayor, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 50 veces mayor, y en ocasiones por lo menos aproximadamente 100 veces o 200 veces mayor, que la actividad biológica del anticuerpo parental en este ensayo.

Para generar la variante del anticuerpo, se realiza una inserción de entre 2 y 10 residuos de aminoácido en un CDR H3 de un dominio de cadena pesada del anticuerpo parental. A la hora de decidir el número de residuos que deben insertarse, se pueden tener en cuenta el intervalo de las longitudes de la región hipervariable en cuestión conocida. Si se realiza una inserción en la región hipervariable CDR H3, preferiblemente los residuos de aminoácido insertados se encuentran entre los residuos número 97 y 102 (por ejemplo, contiguo al residuo número 100, y preferiblemente en secuencia C-terminal a éste) del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo parental, utilizando la numeración de residuos de dominio variable según Kabat.

A la hora de decidir acerca del número de residuos de aminoácido que se deben insertar, se puede tener en cuenta la longitud deseada de la región hipervariable alterada. Por ejemplo, para la primera región hipervariable de un dominio variable de cadena pesada, la región hipervariable es preferiblemente el tramo de residuos del “bucle H1” de Clonthis *et al.*, *supra*, combinado con el tramo de residuos considerado para constituir la “CDR H1” según Kabat *et al.*, *supra*. De este modo, este primer bucle hipervariable del dominio variable de cadena pesada puede tener una longitud total desde aproximadamente ocho aminoácidos hasta aproximadamente 20 residuos incluyendo el residuo o residuos de aminoácido insertados. En relación con la segunda región hipervariable de un dominio variable de cadena pesada, la región hipervariable es preferiblemente “CDR H2” según Kabat *et al.*, *supra*, por ejemplo, que tiene una longitud total de desde aproximadamente 14 residuos de aminoácido hasta aproximadamente 25 residuos, incluyendo el residuo o

residuos de aminoácido insertados. Finalmente, en relación con la tercera región hipervariable de un dominio variable de cadena pesada, la región hipervariable es preferiblemente “CDR H3” según Kabat *et al.*, *supra*, por ejemplo, que tiene una longitud total de desde aproximadamente seis residuos de aminoácido hasta aproximadamente 30 residuos, incluyendo el residuo o residuos de aminoácido insertados.

Las variantes de anticuerpo con residuo o residuos de aminoácido insertados en una región hipervariable de las mismas pueden prepararse de forma aleatoria, especialmente cuando la afinidad de unión inicial del anticuerpo parental por el antígeno diana es tal que las variantes de anticuerpo producidas de manera aleatoria se pueden cribar fácilmente. Por ejemplo, la expresión de fagos proporciona un procedimiento conveniente de cribado de dichas variantes aleatorias.

Puede utilizarse un procedimiento más sistemático para fabricar variantes de anticuerpo. Este procedimiento implica las siguientes etapas generales, normalmente llevados a cabo secuencialmente:

(a) identificación de las interacciones potenciales de aminoácido entre una región hipervariable de un anticuerpo parental y un antígeno diana;

(b) preparación de una variante del anticuerpo parental mediante la introducción de un residuo de aminoácido dentro o contiguo a la región hipervariable del anticuerpo parental, donde el residuo de aminoácido introducido contribuye a las interacciones potenciales del aminoácido en (a); y

(c) selección de una variante de anticuerpo preparada del mismo modo que en (b) que tiene una afinidad de unión por el antígeno más fuerte que la del anticuerpo parental.

Según la etapa (a) de este procedimiento, se puede analizar un modelo molecular del anticuerpo parental formando un complejo con el antígeno. El modelo molecular puede obtenerse a partir de un cristal de rayos X o de resonancia magnética nuclear (RMN) de la estructura de este complejo. Ver, por ejemplo, Arnit *et al.* Science 233:747-753 (1986); y Muller *et al.* Structure 6(9):1153-1167 (1998)). De modo alternativo, pueden utilizarse programas informáticos para crear modelos moleculares de complejos anticuerpo/antígeno (ver, por ejemplo, Levy *et al.* Biochemistry 28:7168-7175 (1989); Brucoleri *et al.* Nature 335:564-568 (1998); y Clothia *et al.* Science 233:755-758 (1986)), cuando no se encuentra disponible una estructura del cristal.

En el procedimiento preferido, se analiza el modelo molecular del complejo antígeno/anticuerpo e identifica las áreas potenciales para incrementar las interacciones favorables energéticamente entre el antígeno y una región hipervariable del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden identificar las interacciones polares potenciales (por ejemplo los pares iónicos y/o enlaces de hidrógeno); las interacciones no polares (tales como las atracciones de Van der Waals y/o las interacciones hidrofóbicas); y/o las interacciones covalentes (por ejemplo el enlace o enlaces disulfuro) entre uno o más residuos de aminoácido del antígeno y uno o más residuos de aminoácido que pueden insertarse dentro o contiguos a una región hipervariable del anticuerpo. Preferiblemente por lo menos uno de los residuos insertados tiene una carga neta positiva o una carga neta negativa. Por ejemplo, por lo menos uno de los residuos insertados puede ser un residuo cargado positivamente, preferiblemente arginina o lisina.

La lisina, la arginina y la histidina son ejemplos de cadenas laterales que típicamente tienen carga positiva. El ácido aspártico y el ácido glutámico son ejemplos de cadenas laterales que típicamente tienen carga negativa. Estas cadenas laterales pueden experimentar interacciones iónicas (residuos positivos emparejados con residuos negativos), así como interacciones polares con cadenas laterales que tienen grupos funcionales polares: triptófano, serina, treonina, tirosina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Además, las interacciones polares o iónicas pueden estar mediadas por un disolvente intermedio (tal como el agua) o moléculas de soluto (por ejemplo fosfato o sulfato).

La alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, el triptófano, la metionina, y la tirosina son típicamente ejemplos de residuos que pueden estar implicados en interacciones hidrofóbicas, o interacciones de Van der Waals no polares; no obstante, las cadenas laterales no polares de otros residuos, tal como la lisina o la arginina, pueden participar también en dichas interacciones. Las cadenas laterales aromáticas como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano pueden formar interacciones de apilamiento aromáticas (π), o pueden actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno.

Además, los átomos de la cadena principal de cualquier residuo (incluida la glicina) pueden experimentar interacciones de Van der Waals o hidrofóbicas; y los átomos de nitrógeno y el oxígeno del carbonilo de la cadena principal, pueden experimentar interacciones polares (enlaces de hidrógeno). En algunos casos, puede formarse un enlace covalente (disulfuro) a partir de un residuo de cisteína del anticuerpo con un residuo de cisteína del antígeno.

Finalmente, las modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, la glicosilación o la fosforilación) o un grupo prostético (por ejemplo, hemo o dedo de zinc) pueden proporcionar grupos funcionales adicionales (oxígenos de carboxilato o fosfato; átomos de zinc o hierro) para la interacción entre el anticuerpo y el antígeno.

De este modo, se puede, por ejemplo, introducir uno o más residuos de aminoácido cargados dentro o contiguos a la región hipervariable del anticuerpo parental en una localización tridimensional apropiada, de manera que el residuo o los residuos introducidos sean capaces de formar par o pares iónicos con uno o más residuos cargados opuestamente en el antígeno. De forma similar, se pueden crear par o pares de enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals,

etc., mediante la introducción de residuos de aminoácido apropiados en una localización apropiada dentro o contigua a una región hipervariable del anticuerpo.

La variante del anticuerpo puede comprender alteraciones adicionales, tales como las supresiones o las substituciones de aminoácidos en la región hipervariable del anticuerpo en el que se realice la inserción. Esto se muestra en el ejemplo posterior, en el que la región hipervariable se modificó mediante substituciones de aminoácidos así como inserciones de aminoácidos.

En general, cualquier residuo de aminoácido insertado o péptido insertado necesitará salir de la cadena polipeptídica del anticuerpo existente en una posición residual (x), extenderse hasta un punto suficientemente cercano al sitio de un nuevo contacto de manera que alguna parte de la cadena lateral del aminoácido o la cadena principal del péptido puede formar una interacción, y volver a reintroducirse en la cadena polipeptídica del anticuerpo existente en una posición (y) (en la cual $y > x$ en la secuencia lineal).

Es deseable que el residuo de aminoácido o el péptido insertado no perturben significativamente la estructura del anticuerpo en un sentido global o local, más allá de las inmediaciones del residuo de aminoácido o del péptido insertado recientemente. En concreto, el residuo de aminoácido o el péptido insertado preferiblemente no distorsionan los residuos FR del anticuerpo, o los residuos del anticuerpo o el antígeno implicados en los contactos existentes. Esto puede evaluarse en un complejo real o modelado.

Si ambos residuos de salida/reintroducción (x e y) carecen de contactos intramoleculares e intermoleculares significativos (es decir, ambos dentro del anticuerpo, y entre el anticuerpo y el antígeno), entonces puede llevarse a cabo una inserción de aminoácido o péptido mediante la adición de un segmento de péptido entre los residuos x e y, dejando inalterados los residuos x e y. De modo alternativo, uno de los dos o ambos residuos x e y pueden suprimirse y reemplazarse por un segmento de péptido de más de 2 residuos.

Con frecuencia, los residuos x e y, y/o residuos intermedios en el anticuerpo parental, pueden estar implicados en contactos intramoleculares e intermoleculares significativos. En este caso, estas interacciones pueden mantenerse o reemplazarse con residuos que contribuyen en interacciones similares, a la vez que se permite que un residuo o péptido insertado salga o se reintroduzca en la cadena. Esto puede llevarse a cabo mediante la substitución de los dos residuos x e y y/o residuos intermedios en el anticuerpo parental con residuos aleatorios, los cuales pueden someterse posteriormente al cribado por afinidad (o al cribado por otras actividades biológicas) para identificar variantes con afinidad aumentada.

Este procedimiento sistemático se ilustra en la Figura 3, por ejemplo, en la que se identificaron los residuos D41 y E42 en el antígeno de VEGF como candidatos potenciales para la interacción con los residuos introducidos en la CDR H3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo parental.

De este modo, tal y como se ilustra en las Figuras 4 y 5, el D41 del antígeno de VEGF es capaz de formar un par iónico con el residuo insertado R104c en CDR H3 del anticuerpo variante YO313-2 del Ejemplo posterior. La Figura 5 muestra además cómo el residuo V104 en el anticuerpo variante YO313-2 es capaz de formar una interacción hidrofóbica con los residuos de 93 a 95 del antígeno de VEGF. De este modo, puede observarse que se identifican las áreas potenciales donde los contactos entre el antígeno y el anticuerpo pueden aumentarse para incrementar la afinidad de la variante del anticuerpo.

Generalmente, se realizan cambios en regiones hipervariables próximas al antígeno cuando el antígeno y el anticuerpo forman un complejo juntos. Por ejemplo, la región hipervariable del anticuerpo parental que puede modificarse tal y como se describe en la presente invención generalmente tienen uno o más residuos de aminoácido dentro de aproximadamente 20 Å de uno o más residuos de aminoácido del antígeno. La región hipervariable a alterar en la presente invención puede ser una que, en el anticuerpo parental, no realice un contacto significativo con el antígeno (es decir, una región hipervariable que no contacte puede ser modificada hasta convertirse en una región hipervariable que contacte). De modo preferente, no obstante, la región hipervariable a modificar contacta con el antígeno y el procedimiento de la presente invención sirve para incrementar los contactos entre el antígeno y la región hipervariable que ya está en contacto.

En otra realización, se pueden identificar los residuos de la región hipervariable que interaccionan con el antígeno mediante mutagénesis de rastreo de alanina del antígeno y/o el anticuerpo parental (Muller *et al.* Structure 6(9): 1153-1167 (1998)) o por otros medios. Las regiones hipervariables identificadas como las que contactan con el antígeno son candidatas para la inserción o inserciones de aminoácidos tal y como se describe en la presente invención.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, aunque no se limitan a éstos, la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), mutagénesis de PCR, mutagénesis de cassette de una variante preparada previamente o una versión no-variante del anticuerpo parental. El procedimiento preferido para fabricar variantes es la mutagénesis dirigida de sitio (ver, por ejemplo, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)). Además, una secuencia de ácido nucleico puede fabricarse de forma sintética, una vez se ha alcanzado conceptualmente la secuencia de aminoácidos deseada. También puede fabricarse la variante del anticuerpo mediante síntesis de péptidos, unión de péptidos u otros procedimientos.

Tras la producción de la variante del anticuerpo, puede determinarse la actividad de esa molécula en relación con el anticuerpo parental. Tal y como se ha indicado anteriormente, esto puede implicar la determinación de la afinidad de unión y/o otras actividades biológicas del anticuerpo. En una realización preferida de la presente invención, se prepara un panel de variantes de anticuerpos y se criban por las afinidades de unión por el antígeno y/o la potencia en uno o más ensayos de actividad biológica. Una o más de las variantes de anticuerpo seleccionadas de un cribado inicial se someten opcionalmente a uno o más ensayos adicionales de actividad biológica para confirmar que la variante o variantes del anticuerpo han aumentado su actividad en más de un ensayo.

Un procedimiento preferido de fabricación y cribado de mutantes de inserción implica la expresión de las variantes del anticuerpo en la superficie del bacteriófago filamentosos y la selección de las variantes del anticuerpo según su afinidad por el antígeno, mediante su cinética de disociación (constante de disociación) del antígeno, o algunos otros cribados por la afinidad o potencia del anticuerpo. Éste fue el procedimiento empleado para identificar variantes de anticuerpo con actividad biológica aumentada en el Ejemplo posterior.

Aparte de las anteriores inserciones en la región hipervariable del anticuerpo parental se pueden realizar otras alteraciones en las secuencias de aminoácidos de una o más regiones hipervariables. Por ejemplo, las inserciones de aminoácidos anteriores pueden combinarse con supresiones o sustituciones de otros residuos de la región hipervariable. Además, pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de residuos de FR en el anticuerpo parental donde éstas den lugar a un incremento de la afinidad de unión de la variante del anticuerpo por el antígeno. Como ejemplos de residuos de la región de estructura a modificar se incluyen aquellos que se unen directamente al antígeno de manera no covalente (Amit *et al.* Science 233:747-753 (1986)); los que interaccionan con/efectúan la conformación de una CDR (Clothoia *et al.* J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)); y/o los que participan en el punto de contacto VL - VH (EP 239 400 B1). Dichas alteraciones en las secuencias de aminoácidos pueden presentarse en el anticuerpo parental, pueden realizarse simultáneamente con la inserción o inserciones de aminoácidos de la presente invención o pueden realizarse después de generar una variante con una inserción de aminoácido.

Las variantes del anticuerpo pueden ser sometidas a otras modificaciones, a veces dependiendo de la utilidad prevista para el anticuerpo. Tales modificaciones pueden implicar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, la fusión a polipéptido o polipéptidos heterólogos y/o la modificación covalente. En cuanto a las alteraciones de las secuencias de aminoácidos, anteriormente se indicaron modificaciones de ejemplo. Por ejemplo, también puede sustituirse cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación correcta de la variante del anticuerpo, generalmente por serina, para aumentar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar enlaces cruzados aberrantes. En cambio, el enlace o enlaces de cisteína pueden añadirse al anticuerpo para aumentar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv). Otro tipo de variante de aminoácido tiene un modelo de glicosilación alterado. Esto puede conseguirse mediante la supresión de uno o más grupos carbohidrato encontrados en el anticuerpo, y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de anticuerpos es típicamente mediante unión a N o unión a O. La unión a N hace referencia a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que la X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De este modo, la presencia de alguna de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O hace referencia a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, los más comunes son la serina o la treonina, aunque también pueden utilizarse la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos, de manera que ésta contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o la substitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

Las técnicas de producción de anticuerpos, que pueden ser el anticuerpo parental y por tanto requieren modificación según las técnicas elaboradas en la presente invención, son las siguientes:

A. Preparación de anticuerpos

(i) Preparación de antígenos

Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados a otras moléculas, se pueden utilizar como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, se pueden utilizar fragmentos de éstos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De modo alternativo, se pueden utilizar células que expresan la molécula transmembrana como inmunógeno. Dichas células pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerígenas) o pueden ser células que han sido transformadas mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para la preparación de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(ii) *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación a través de los residuos de cisterna), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^2 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación, por ejemplo de $100\text{ }\mu\text{g}$ o $5\text{ }\mu\text{g}$ de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección de la solución de manera intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde los animales son estimulados con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en el adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después, los animales sangran y se ensaya el suero para la concentración de anticuerpos. Los animales se estimulan hasta que la concentración es constante. Preferiblemente, los animales se estimulan con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugados a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden realizar en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, se utilizan de manera adecuada agentes de agregación, tales como alumbre para aumentar la respuesta inmune.

(iii) *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar utilizando el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975) o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o mono macaco, se inmuniza tal como se ha descrito anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. De modo alternativo, los linfocitos se pueden inmunizar *in Vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academia Press, (1986), páginas 59-103).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se cultivan y desarrollan en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, soportan un nivel de producción a nivel elevado estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 que se pueden obtener del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California Estados Unidos y las células SP-2 o X-63-Ag8-653 que se pueden obtener de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) páginas, 51-63)).

Se ensaya el medio de cultivo en que las células de hibridoma crecen para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academia Press 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede situar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá con más detalle a continuación.

En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos utilizando generalmente las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348: 552-554 (1990). Claxton *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante la recombinación de cadena (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como una infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res. 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias de murino homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no son inmunoglobulinas.

Habitualmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas están sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo de un origen que es no humano. Estos residuos de aminoácido no humanos se indican frecuentemente como residuos “importados”, que se adquieren habitualmente de un dominio variable “importado”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la fabricación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el procedimiento denominado “mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra toda la biblioteca de secuencias humanas de dominio variable conocidas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta entonces como la FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una FR particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma FR se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

Es más importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo la afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles habitualmente y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. El examen de estas observaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias del receptor y importador, de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como la mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión a antígeno.

De modo alternativo, ahora es posible producir animales transgénicos no humanos (por ejemplo, ratones), que son capaces, después de inmunización, de producir un completo repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos después de la estimulación de los antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); y Duchosal *et al.*, Nature 355: 258 (1992). Los anticuerpos también puede derivar de bibliotecas de expresión de fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 591-597 (1991); Vaughan *et al.*, Nature Biotech 14: 309 (1996)).

(v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos derivaron a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. De modo alternativo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se pueden acoplar químicamente para formar fragmentos de $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente de una cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico habitual. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de Fv de cadena única (scFv). Véase WO 93/16185.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión durante por lo menos dos antígenos diferentes. Mientras dichas moléculas sólo se unirán normalmente a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos trispecíficos, están comprendidos por esta expresión cuando se utiliza en la presente invención. Entre los ejemplos de BsAbs se incluyen aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula desencadenante citotóxica, tal como anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185HER2/FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-célula B maligna (1D10), anti-CD3/anti-P185HER2, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti análogo de la hormona estimuladora de melanocitos, anti-receptor EGF/anti-CD3, anti-cD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión a células neuronales (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado a carcinoma de "pan" (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs con un brazo que se une específicamente a un antígeno de tumor y un brazo que une a una toxina, tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena A de ricina, anti-CEA/anti-alcaloide de vinca; BsAbs para convertir profármacos activados por enzimas tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco fosfato de mitomicina a alcohol de mitomicina); BsAbs que se pueden utilizar como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tisular (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA); BsAbs para dirigir complejos inmunes a los receptores de la superficie celular tales como anti-lipoproteína de baja densidad (LDL)/anti-receptor Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII o FcγRIII); BsAbs para su uso en terapia de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus del herpes simplex (HSV), anti-complejo de receptor de células T:CD3/antigripe, anti-FcγR/anti-VIH; BsAbs para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185HER2/anti-hapteno; BsAbs como adyuvantes de vacunas; y BsAbs como herramientas de diagnóstico tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano picante (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC. Entre los ejemplos de anticuerpos trispecíficos se incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. En WO 93/08829, y en Trautnecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, CH2, y regiones CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1)

que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN's que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones cuando proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen una particular importancia.

En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de una inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Según otra estrategia descrita en WO 96/27011, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio de CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico a la cadena o cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/300373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier procedimiento de reticulación. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando uniones químicas. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierten al Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos de Fab'-SH de *E. coli*, los cuales se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra tumores de mama humana dianas.

Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

5 (vii) *Diseño de la función efectora*

Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora con el fin de aumentar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el residuo o residuos de cisteína se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de interna-
10 lización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una mayor actividad anti-tumoral también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf *et al.* Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente,
15 se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis complementaria y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

20 (viii) *Inmunconjugados*

La presente invención también se refiere a inmunconjugados que comprenden el anticuerpo descrito en la presente invención conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, radioconjugados).

25 Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunconjugados se han descrito anteriormente. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Existe un conjunto de radionúcleos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y Re.

35 Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen
40 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionúcleos al anticuerpo. Ver WO94/11026.

45 En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un “receptor” (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcado de tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado no enlazado de la circulación utilizando un agente clarificador y, a continuación, la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúcleo).

50 (ix) *Inmunoliposomas*

Las variantes de anticuerpo descritas en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como
55 los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa
60 con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal y como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) mediante la reacción de intercambio de enlaces disulfuro. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina). Véase
65 Gabizon *et al.*, J. Nacional Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

(x) *Terapia con profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpos (ADEPT)*

El anticuerpo de la presente invención también se puede utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a un enzima activador de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO 81/01145) a un fármaco anticancerígeno activo. Véase, por ejemplo, WO88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4.965.278.

El componente enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

Entre los enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; srilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticancerígeno, 5-fluorouacilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas divisores de carbohidratos, tales como beta-galactosidasa y neuraminidasa útil para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivados con beta-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. De modo alternativo, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", se pueden utilizar para convertir los profármacos de la presente invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal como se describe en la presente invención para la liberación del abisma en una población de células tumorales.

Los enzimas de la presente invención se puede unir covalentemente a la variante de anticuerpo mediante técnicas bien conocidas en el sector, tales como la utilización de los reactivos de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. De modo alternativo, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención unido a por lo menos una parte funcionalmente activa de un enzima de la presente invención se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el sector (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature, 312: 604-608 (1984)).

(xi) *Fusiones de epítomos de unión a receptor de rescate de anticuerpos*

En ciertas realizaciones de la presente invención, se puede desear utilizar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración en el tumor, por ejemplo. En este caso, se puede desear modificar el fragmento de anticuerpo con el fin de aumentar su vida media en el suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, mediante la mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo en una etiqueta ("tag") epítipo que, a continuación, se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptidos).

El epítipo de unión a receptor de rescate preferiblemente constituye una región en la que uno o más residuos de aminoácido de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferiblemente, se transfieren tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferiblemente, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o V_H, o más de una de dichas regiones, del anticuerpo. De modo alternativo, el epítipo se toma del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región C_L o la región V_L, o ambas, del fragmento de anticuerpo. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.739.277, concedida el 14 de abril de 1998.

(xii) *Modificaciones covalentes*

Las modificaciones covalentes del anticuerpo están incluidas en el alcance de la presente invención. Se pueden realizar mediante síntesis química o mediante división enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula mediante la reacción de los residuos de aminoácido dirigidos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C terminales.

La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo se puede realizar química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da lugar a la división de la mayoría o todos los azúcares a excepción del azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja el anticuerpo intacto. La desglicosilación química se describe en Hakimuddin, *et al.* Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y Edge, *et al.* Anal. Biochem., 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato en anticuerpos se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura *et al.* Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno del conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

B. Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

La presente invención también proporciona ácido nucleico aislado que codifica una variante de anticuerpo tal como se describe en la presente invención, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción de la variante del anticuerpo.

Para la producción recombinante de la variante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica la variante del anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de la variante del anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción.

(i) Componente secuencia señal

La variante de anticuerpo de la presente invención se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es aquella que es reconocida y procesada (es decir, es dividida mediante una señal peptidasa) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal del anticuerpo natural, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp o enterotoxinaII estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal natural puede ser sustituida por, por ejemplo, la secuencia líder de la invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo secuencias líder de α -factor *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa o la señal descrita en WO 90/13646. En la expresión de células de mamíferos, están disponibles las secuencias señal de mamíferos, así como las secuencias líder secretoras virales, por ejemplo, la señal de herpes simplex gD.

El ADN para dicha región precursora está unida en el marco de lectura al ADN que codifica la variante de anticuerpo.

(ii) Componente origen de replicación

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. En general, en vectores de clonación, esta secuencia es la que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y varios orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el componente origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano).

(iii) Componente gen de selección

Los vectores de clonación y expresión pueden contener un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman de manera satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, de este modo, sobreviven a la pauta de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) en actividad de DHFR.

De modo alternativo, las células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen la DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo, proteína DHFR natural, y otro marcador seleccionable, tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase, la Patente de Estados Unidos No. 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un medio adecuado para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) son complementadas por cepas conocidas que portan el gen Leu2.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 se puede utilizar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De modo alternativo, se describió para *K. lactis* un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante. Van den Berg, *Biol/Technology*, 8: 135 (1990). También se han descrito vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúmina de suero humano recombinante maduro por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

(iv) *Componente promotor*

Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen el promotor *phoA*, los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo.

Las secuencias de promotores son conocidas para eucariotas. Prácticamente todos los genes de eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en dirección 5' desde el sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes de eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otros enzimas glucolíticos, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafofosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tiene la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se utilizan de manera ventajosa con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y más preferiblemente el virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen de manera conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano se obtiene de manera conveniente como un fragmento de restricción HindIII. En la Patente de Estados Unidos No. 4.419.446 se describe un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector. En la Patente de Estados Unidos No. 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. De modo alternativo, la repetición larga terminal del sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

(v) *Componente elemento potenciador*

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa frecuentemente mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Muchas secuencias de potenciador actualmente se conocen de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) en elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) *Componente terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN's o ADN's eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase WO 94/1102 y el vector de expresión descrito en la misma.

(vii) *Selección y transformación de células huésped*

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención son células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores descritas anteriormente. Entre las procariotas adecuadas para este objetivo se incluyen, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como, *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas son adecuadas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo. El *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es entre los microorganismos huésped eucariotas inferior utilizados el más utilizado habitualmente. Sin embargo, una serie de otros géneros, especies, y cepas están disponibles habitualmente y son útiles en la presente invención, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. Níger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes bacterianas y las correspondientes cepas de huéspedes de insectos permisivos de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una serie de cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como el virus según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

Sin embargo, ha habido un interés creciente en células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en el cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster cría (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata de búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCI51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC5; células FS4; y una línea de hematoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, la selección de transformantes o la amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células huésped

Las células huésped utilizadas para producir la variante de anticuerpo de la presente invención se puede cultivar en una serie de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Tagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; ó 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la Patente de Estados Unidos Re. 30,985 se pueden utilizar como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse si es necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCINTM), elementos traza (definido como los compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el rango de micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir en concentraciones adecuadas que serían conocidos por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y será evidente para el técnico habitual en la materia.

(ix) Purificación de anticuerpos

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, la variante de anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretado en el medio. Si la variante de anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, la debris particulada, células huésped o fragmentos lisados, se elimina, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Biol Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. La debris celular se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran generalmente en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpos preparados a partir de células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo ésta última la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isótopo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en la variante de anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, *J. Immunol Meth* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isótopos de ratón y para $\gamma 3$ humanas (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero se disponen de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permite mayores velocidades de flujo y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando la variante de anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABXTM (J.T. Baker Philipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SefarosaTM, cromatografía en una resina de intercambio de anión o catión (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico también están disponibles dependiendo de la variante de anticuerpo a recuperar.

C. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de la variante de anticuerpo se prepararan para su almacenamiento mediante la mezcla de la variante de anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidono-

na; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraponentes formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta a tratar, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente un agente inmunosupresor. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo previsto.

Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación controladas. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la variante de anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradable, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se desnaturalizan o agregan como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear varias estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuros, se puede conseguir la estabilización mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización de aditivos adecuados y el desarrollo de composiciones específicas de matriz de polímeros.

D. Usos no terapéuticos de la variante de anticuerpo

Las variantes de anticuerpo de la presente invención se pueden utilizar como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina Sefadex o papel de filtro, utilizando los procedimientos bien conocidos en la técnica. La variante de anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificar y, a continuación, el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra a excepción del antígeno a purificar, que está unido a la variante de anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante de anticuerpo.

Las variantes de anticuerpo también pueden ser útiles en los ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para la detección de la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o suero específicos.

Para las aplicaciones de diagnóstico, la variante de anticuerpo se marcará habitualmente con un grupo detectable. Existen numerosos marcadores disponibles que se pueden agrupar generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ¹³¹I. La variante de anticuerpo se puede marcar con el radioisótopo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2. Coligen *et al.*, Ed., Wiley-Interscience. Nueva York, Nueva York, Pubs., (1991), por ejemplo, y la radiactividad se puede medir utilizando recuento por centelleo.

(b) Están disponibles marcadores fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina y Texas Red. Los marcadores fluorescentes se pueden conjugar a la variante de anticuerpo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, *supra.*, por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar utilizando un fluorímetro.

(c) Varios marcadores de enzima-sustrato están disponibles y la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de éstos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en

un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. De modo alternativo, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia están descritas anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se vuelve electrónicamente excitado mediante una reacción química y puede entonces emitir luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Entre los ejemplos de marcadores enzimáticos se incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenada, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárico oxidasa (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym* (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 72: 147-166 (1981).

Entre los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilén diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y

(iii) beta-D-galactosidasa (beta-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil-beta-D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metillumbeliferil-beta-D-galactosidasa.

Para los expertos en la materia, están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato. Para una revisión general de las mismas, véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.275.149 y 4.318.980.

Algunas veces, el marcador está directamente conjugado con la variante de anticuerpo. El técnico experto conocerá las técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, la variante de anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente se pueden conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, de este modo, el marcador se puede conjugar con la variante de anticuerpo de esta manera indirecta. De modo alternativo, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con la variante de anticuerpo, la variante de anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con una variante de anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). De este modo, se puede conseguir la conjugación indirecta del marcador con la variante de anticuerpo.

En otra realización de la presente invención, la variante de anticuerpo no necesita estar marcado, y la presencia del mismo se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une a la variante de anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención se puede utilizar en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques*, páginas 147-158 (CRC Press. Inc., 1987).

Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de prueba para la unión con una cantidad limitada de variante de anticuerpo. La cantidad de antígeno en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos generalmente están insolubilizados antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos se pueden separar de manera adecuada del patrón y el analito que permanecen no unidos.

Los ensayos de sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de prueba se une a un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido y, a continuación, un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo de tres partes insolubles. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado en sí mismo con un grupo detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es un enzima.

Para la inmunohistoquímica, la muestra de tumor puede ser reciente o congelada o puede estar envuelta de parafina y fijada con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, la variante de anticuerpo se marca con un radionucleido (tal como ¹¹¹Tn, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ¹²⁵I, ³H, ³²P o ³⁵S), de manera que el tumor se puede localizar utilizando inmunocentelleografía.

E. Kits de diagnóstico

- A modo de comodidad, la variante de anticuerpo de la presente invención se puede disponer en un kit, es decir, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el ensayo de diagnóstico. Cuando la variante de anticuerpo está marcada con un enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores necesarios por el enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectables). Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar de forma amplia para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivos que tienen la concentración apropiada.

F. Usos *in vivo* para la variante de anticuerpo

- Para aplicaciones terapéuticas, las variantes de anticuerpo de la presente invención se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, en forma de una dosis farmacéuticamente aceptable, tal como las descritas anteriormente, incluyendo aquellas que se pueden administrar a un humano de forma intravenosa como un bolo o mediante la infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Los anticuerpos también se administran de manera adecuada mediante rutas intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como sistémicos. Se espera que la ruta intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores de ovario. Además, la variante de anticuerpo se administra de manera adecuada mediante infusión por pulsos, particularmente con dosis descendentes de la variante de anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se proporciona mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

- Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de la variante de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, si la variante de anticuerpo se administra con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta a la variante de anticuerpo, y la discreción del médico responsable. La variante de anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

- El ejemplo de la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-VEGF. Los anticuerpos anti-VEGF son útiles en el tratamiento de varias enfermedades y trastornos neoplásicos y no neoplásicos. Los neoplasmas y las condiciones relacionadas que son susceptibles de tratamiento incluyen carcinomas de mama, carcinomas de pulmón, carcinomas gástricos, carcinomas del esófago, carcinomas colorrectal, carcinomas de ovario, tecomas, arrenoblastomas, carcinomas cervicales, carcinomas de endometrio, hiperplasia del endometrio, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernosa, hemangioblastoma, carcinomas de páncreas, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, meiomiosarcomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilm, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como la asociada con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs.

- Entre las condiciones neoplásicas que son susceptibles de tratamiento se incluyen artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras retinopatías proliferativas incluyendo retinopatía de premadurez, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, hiperplasias de la tiroides (incluyendo la enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otros tejidos, inflamación crónica, inflamación de pulmón, síndrome nefrótico, preeclampsia, ascitis, efusión pericardial (tal como la asociada con la pericarditis) y la efusión pleural.

- La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa principal de la pérdida de visión severa en la población de la tercera edad. La forma exudativa de AMD se caracteriza por una neovascularización coroidal y el desprendimiento de las células epiteliales del pigmento retinal. Debido a que la neovascularización coroidal está asociada a un brusco empeoramiento del pronóstico, se espera que los anticuerpos de VEGF de la presente invención sean especialmente útiles en la reducción de la gravedad de AMD.

- Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 $\mu\text{g/kg}$ hasta 15 $\mu\text{g/kg}$ (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de variante de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar desde, aproximadamente, 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar la desaparición deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

- La composición de variantes de anticuerpo se formulará, dosificará y administrará de manera consistente con una buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno concreto a tratar, el mamífero a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el punto de liberación del agente, la ruta

de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos para el practicante médico. La “cantidad terapéuticamente eficaz” de la variante de anticuerpo a administrar estará regida por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno. Aunque no es necesario, la variante de anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de variante de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descritos anteriormente. Éstos se utilizan en general en las mismas dosis y con rutas de administración tal como se utiliza anteriormente en la presente invención o aproximadamente de un 1 a un 99% de las dosis empleadas en la presente invención hasta ahora.

G. Artículos de fabricación

En otra realización de la presente invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un marcador. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de prueba. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. Los recipientes contienen una composición que es eficaz para el tratamiento de la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es la variante de anticuerpo. El marcador en, o asociado con, el recipiente indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Pueden incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospecto de un medicamento con instrucciones para su uso.

Ejemplo 1

En este ejemplo, se preparan variantes de anticuerpo que contienen inserciones de péptido al azar dentro de los CDR del anticuerpo mediante expresión en fagos que incrementan sustancialmente la afinidad de un Fab humanizado por VEGF. La cristalografía sugiere que estos cambios tienen como resultado un incremento del área de contacto con el antígeno.

Estructura del *Co-Cristal de rayos X de VEGF:Fab*: Se preparó una estructura del cristal del complejo entre el antígeno de VEGF y el anticuerpo parental anti-VEGF tal y como se describe en Muller *et al.*, Structure 6(9):1153-1167 (1998). La conclusión de que los tres CDRs de VH son los determinantes principales de la unión de Fab a VEGF tiene soporte en la estructura del cristal de alta resolución del complejo VEGF:Fab (v36). Además, los determinantes de mayor energía coinciden en gran parte con los principales residuos de contacto del Fab en el complejo.

Se diseñaron diversas bibliotecas dispuestas al azar con la inserción de un péptido colocado en las CDRs de contacto con el antígeno que, a partir de la estructura del cristal, se esperaba que incrementaran el contacto potencial entre el anticuerpo y el antígeno.

Diseño de Bibliotecas de Inserción en Bucle Aleatorias de CDR: En base al examen de la estructura del cristal de VEGF:Fab, se postuló que los contactos adicionales, que contribuyen en la energía de unión adicional entre el Fab y el VEGF, podría generarse mediante la adición de inserciones de péptido dentro de una o más CDRs del Fab. Debido a que la naturaleza y las contribuciones relativas de dichas interacciones adicionales serían difíciles de predecir, se insertaron directamente las secuencias de bucle aleatorias (X_n) en cada una de las cuatro CDRs próximas al sitio de unión del VEGF existente utilizando codones NNS, y un vector de Fab desplazado del marco de lectura como plantilla. Se eligió la longitud del bucle en base a las distancias en la estructura del cristal entre los puntos de entrada/salida del bucle en la región hipervariable y los sitios de posible interacción en la superficie de VEGF. Además, se suprimieron uno o más residuos dentro de cada bucle en algunas de esas plantillas, según se vea necesario para acomodar el nuevo bucle de péptido.

Los tres bucles citados fueron diseñados para VH1, incluyendo inserciones de 4, 5, ó 6 residuos entre Y27 y T28. En VH2, se colocaron dos péptidos insertados de 3 ó 4 residuos entre Y54 y T55. También en VH2, se utilizó un péptido aleatorio de 6 residuos para reemplazar los residuos T55 y H56. En VH3, se utilizó un péptido de 4 residuos o de 5 residuos para reemplazar G104, y se utilizó un péptido de 5 residuos o de 6 residuos para reemplazar a los residuos G104 y S105. Finalmente, en VL3, se insertó un péptido aleatorio de 4 ó 6 residuos entre S92 y T93.

Selecciones de Segunda Generación de Bibliotecas de anti-VEGF: se construyeron plantillas para la mutagénesis aleatoria empezando a partir del fagémido Fab-g3 pY0192 (WO98/45331) y los oligonucleótidos desplazados en el marco de lectura (los cuales evitan la expresión de una plantilla funcional Fab): YC-82, YC-85, YC-89, YC-92, YC-94, e YC-97 (Tabla 1).

TABLA 1

Oligos desplazados del marco de lectura para la mutagénesis de plantilla por inserción en CDR				
Oligo #	Región	Secuencia	SEC. ID	Nº:
YC-82	VL3	C TGT CAA CAG TAT AGC T ACC GTG CCG TGG ACG	SEC. ID	Nº: 1
YC-85	VH1	GCA GCT TCT GGC TAT G ACC TTC ACC AAC TAT G	SEC. ID	Nº: 2
YC-89	VH2	GA TGG ATT AAC ACC TAT G ACC GGT GAA CCG ACC	SEC. ID	Nº: 3
YC-92	VH2	GA TGG ATT AAC ACC TAT T GAA CCG ACC TAT GCT G	SEC. ID	Nº: 4
YC-94	VH3	GTACCCGCACTAT TATGAGCAGCCACTGGTAT TTC	SEC. ID	Nº: 5
YC-97	VH3	G TAC CCG CAC TAT TAT G AGC CAC TGG TAT TTC	SEC. ID	Nº: 6

Los correspondientes oligonucleótidos al azar (que utilizan NNS en los sitios destinados a la situación aleatoria) fueron YC-83, YC-84 en VL3; YC-86, YC-87, YC-88 en VH1; YC-90, YC91 y YC-93 en VH2; e YC-95, YC-96, YC-98, YC-99 en VH3. Ver la Tabla 2 a continuación.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 301 254 T3

TABLA 2

Oligos aleatorios para las construcciones de bibliotecas de inserciones en CDR				
Oligo #	Región	(Comentarios)	Secuencia	SEC. ID Nº:
YC-83	VL3	(insertar 4 residuos)	C TGT CAA CAG TAT AGC NNS NNS NNS NNS ACC GTG CCG TGG ACG	SEC. ID Nº: 7
YC-84	VL3	(insertar 6 residuos)	C TGT CAA CAG TAT AGC NNS NNS NNS NNS NNS NNS ACC GTG CCG TGG ACG	SEC. ID Nº: 8
YC-86	VH1	(insertar 4 residuos)	GCA GCT TCT GGC TAT NNS NNS NNS NNS ACC TTC ACC AAC TAT G	SEC. ID Nº: 9
YC-87	VH1	(insertar 5 residuos)	GCA GCT TCT GGC TAT NNS NNS NNS NNS NNS ACC TTC ACC AAC TAT G	SEC. ID Nº: 10
YC-88	VH1	(insertar 6 residuos)	GCA GCT TCT GGC TAT NNS NNS NNS NNS NNS NNS ACC TTC ACC AAC TAT G	SEC. ID Nº: 11
YC-90	VH2	(insertar 3 residuos)	GA TGG ATT AAC ACC TAT NNS NNS NNS ACC GGT GAA CCG ACC	SEC. ID Nº: 12
YC-91	VH2	(insertar 4 residuos)	GA TGG ATT AAC ACC TAT NNS NNS NNS NNS ACC GGT GAA CCG ACC	SEC. ID Nº: 13
YC-93	VH2	(insertar 6 residuos)	GA TGG ATT AAC ACC TAT NNS NNS NNS NNS NNS NNS GAA CCG ACC TAT CGT G	SEC. ID Nº: 14
YC-95	VH3	(insertar 4	G TAC CCG CAC TAT TAT	SEC. ID

ES 2 301 254 T3

		residuos)	NNS NNS NNS NNS AGC AGC CAC TGG TAT TTC	Nº: 15
YC-96	VH3	(insertar 5 residuos)	G TAC CCG CAC TAT TAT NNS NNS NNS NNS NNS AGC AGC CAC TGG TAT TTC	SEC. ID Nº: 16
YC-98	VH3	(insertar 5 residuos)	G TAC CCG CAC TAT TAT NNS NNS NNS NNS NNS AGC CAC TGG TAT TTC	SEC. ID Nº: 17
YC-99	VH3	(insertar 6 residuos)	G TAC CCG CAC TAT TAT NNS NNS NNS NNS NNS NNS AGC CAC TGG TAT TTC	SEC. ID Nº: 18

Los transformantes resultantes produjeron bibliotecas con complejidades que oscilan desde 6×10^7 hasta 5×10^8 sugiriendo que las bibliotecas eran exhaustivas en el cubrimiento de todas las variantes posibles.

Se clasificó cada biblioteca por separado durante la primera ronda; a partir de entonces, se combinaron las bibliotecas con el mismo sitio de inserción y se clasificaron juntas como una. Por tanto, la biblioteca YC-83 se combinó con la biblioteca YC-84; la biblioteca YC-86 con las bibliotecas YC-87 e YC-88; la biblioteca YC-90 con la YC-91; la biblioteca YC-95 con la YC-96; y la biblioteca YC-98 con la YC-99. Estas bibliotecas se clasificaron esencialmente tal y como se describe en WO98/45331, excepto la incubación con tampón PBS/TWEEN 20® después de unión al fago tal y como se describe en la Tabla 3.

TABLA 3

Condiciones para las selecciones secundarias de variantes de Fab			
ronda de selección	tiempo de incubación (h)	solución de la incubación	temp. de la incubación (°C)
1	0	0	temperatura ambiente
2	1	tampón ELISA	temperatura ambiente
3	2	1 μ M de VEGF/ELISA	temperatura ambiente
4	18	1 μ M de VEGF/ELISA	temperatura ambiente
5	37	1 μ M de VEGF/ELISA	temperatura ambiente
6	17 h a t.a./30 h a 37°C	igual que las anteriores	temperatura ambiente/37°C
7	63	igual que las anteriores	37°C
8	121	igual que las anteriores	37°C

El tampón ELISA contenía un 0,5% de albúmina de suero bovino y un 0,05% de TWEEN 20® en PBS. Se incluyó el VEGF en el tampón de incubación para minimizar la posibilidad de volverse a unir el fago al VEGF cubierto en la superficie de la placa.

ES 2 301 254 T3

La clasificación de algunas de estas bibliotecas produjo enriquecimientos de fagos de unión a VEGF sobre 5 a 8 rondas de selección. Después de cinco a ocho rondas de selecciones, se aislaron de diez a veinte clones de cada biblioteca a partir de placas que contenían carbenicilina y que albergaban colonias de *E. coli* (XL1) que habían sido infectadas con un grupo de fagos eluidos. Se recogieron las colonias y se desarrollaron con el fago ayudante para obtener ADN de cadena única para la secuenciación. Se recogieron los clones de aquellas bibliotecas que se enriquecieron para la secuenciación de ADN. Los resultados se muestran en la Tabla 4. No se secuenciaron las bibliotecas que no mostraron enriquecimiento.

Resumen de las bibliotecas de inserción en CDR					
Oligos		CDR	Sitio de Inserción	Nº de residuos añadidos	
Oligo de parada	Oligo de inserción			Netos	Total
YC-85	YC-86	H1	Y27^T28	4	4
YC-85	YC-87	H1	Y27^T28	5	5
YC-85	YC-88	H1	Y27^T28	6	6
YC-89	YC-90	H2	Y54^T55	3	3
YC-89	YC-91	H2	Y54^T55	4	4
YC-92	YC-93	H2	Y54^E57	4	6
YC-94	YC-95	H3	Y103^S105	3	4
YC-94	YC-96	H3	Y103^S105	4	5
YC-97	YC-98	H3	Y103^106	3	5
YC-97	YC-99	H3	Y103^S106	4	6
YC-82	YC-83	L3	S92^T93	4	4
YC-82	YC-84	L3	S92^T93	6	6

Para VH1, tan sólo la biblioteca YC-86 mostró enriquecimiento. La secuenciación reveló que, a pesar de que se diseñó una inserción de 4 residuos en esta biblioteca, todos los clones secuenciados no contenían una inserción neta, pero en cambio sí mutaciones puntuales en T28 y F29. Esto sugiere que este anticuerpo es relativamente intolerante a las inserciones en esta región hipervariable.

Se observó un resultado similar para las bibliotecas de VH2, en las cuales tan sólo la biblioteca YC-90 mostró enriquecimiento. De nuevo, los clones encontrados fueron de tipo natural (Y0192) o de una mutación puntual, Y54W. Esto sugiere que este anticuerpo es también relativamente intolerante a las inserciones en el CDR de VH2.

De nuevo, se obtuvo un resultado similar de las bibliotecas de VL3. En este caso, tan sólo la biblioteca YC-83 mostró enriquecimiento, y los clones seleccionados tuvieron mutaciones puntuales en T93 y/o V94, más que la inserción diseñada. Esto sugiere que este anticuerpo también es relativamente intolerante a las inserciones en el CDR de VL3.

Por el contrario, mostraron enriquecimiento dos bibliotecas de VH3: YC-95 e YC-98. Además, la secuenciación de los clones seleccionados mostró que las variantes de Fab contenían además secuencias de inserción.

A continuación en las Tablas 5-15 se muestran las secuencias de aminoácidos de las variantes de anti-VEGF a partir de diversas bibliotecas. Se muestra sólo la secuencia de la región aleatoria tal y como se deduce a partir de la secuencia de ADN. Se muestran en negrita los sitios en los que se hicieron secuencias insertadas aleatorias. Un asterisco indica un fagémido contaminante de otra biblioteca.

ES 2 301 254 T3

TABLA 5

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 7 de la biblioteca de YC-86 (fago eluido de VEGF)			
Nombre	Secuencia de VH1 (residuos 26-35)	SEC. ID N°:	(# clones /10)
YO241-1	GYDFTNYGIN	SEC. ID N°: 19	4
YO241-6	GYDYTNyGIN	SEC. ID N°: 20	3
YO241-7	GYDWTNYGIN	SEC. ID N°: 21	3

TABLA 6

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 7 de la biblioteca de YC-90 (fago eluido de VEGF)			
Nombre	Secuencia de VH2 (residuos 50-62)	SEC. ID N°:	(# clones /10)
YO242-1	WINTWTGEPTYAA	SEC. ID N°: 22	4
*YO192			6

TABLA 7

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 7 de la biblioteca de YC-83 (fago eluido de VEGF)			
Nombre	Secuencia de VL3 (residuos 89-97)	SEC. ID N°:	(# clones /10)
YO241-2	QQYSATPWT	SEC. ID N°: 23	1
YO241-3	QQYSNVPWT	SEC. ID N°: 24	3
YO241-4	QQYSAVPWT	SEC. ID N°: 25	4
YO241-5	QQYSSVPWT	SEC. ID N°: 26	1

ES 2 301 254 T3

TABLA 8

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 5 de la biblioteca de YC-95 (fago eluido de VEGF)			
Nombre	Secuencia de VH3 (residuos 99-111) + inserciones	SEC. ID N°:	(# clones/10)
YO228-1	YPHY YAKER SSHWYFDV	SEC. ID N°: 27	1
YO228-2	YPHY YVGET SSHWYFDV	SEC. ID N°: 28	1
YO228-3	YPHY YARDR SSHWYFDV	SEC. ID N°: 29	1
YO228-4	YPHY YERDGK SSHWYFDV	SEC. ID N°: 30	1
YO228-5	YPHY YRNEK SSHWYFDV	SEC. ID N°: 31	1
YO228-6	YPHY YVGEQ SSHWYFDV	SEC. ID N°: 32	1
YO228-7	YPHY YQRDR SSHWYFDV	SEC. ID N°: 33	1
YO228-8	YPHY YQKQSK SSHWYFDV	SEC. ID N°: 34	1
YO228-9	YPHY YQNEGP SSHWYFDV	SEC. ID N°: 35	1
YO228-10	YPHY YGNHR SSHWYFDV	SEC. ID N°: 36	1

TABLA 9

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 5 de la biblioteca de YC-95 (fago eluido de HCl)			
Nombre	Secuencia de VH3 (residuos 99-111) + inserciones	SEC. ID N°:	(# clones/10)
YO229-1	YPHY YRTEK SSHWYFDV	SEC. ID N°: 37	1
YO229-2	YPHY YLKDR SSHWYFDV	SEC. ID N°: 38	1
YO229-4	YPHY YQDEK SSHWYFDV	SEC. ID N°: 39	1
YO229-5	YPHY YVGEK SSHWYFDV	SEC. ID N°: 40	1
YO229-6	YPHY YRDER SSHWYFDV	SEC. ID N°: 41	1
YO229-7	YPHY YTYDK SSHWYFDV	SEC. ID N°: 42	1
YO229-8	YPHY YHTRGG SSHWYFDV	SEC. ID N°: 43	1
YO229-9	YPHY YLNDK SSHWYFDV	SEC. ID N°: 44	1
YO229-10	YPHY YYRDR SSHWYFDV	SEC. ID N°: 45	1
*YO239-1			1

ES 2 301 254 T3

TABLA 10

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 7 de la biblioteca de YC-95 (fago eluido de VEGF)			
Nombre	Secuencia de VH3 (residuos 99-111) + inserciones	SEC. ID N°:	(# clones/10)
YO239-1	YPHY R NERSSHWYFDV	SEC. ID N°: 46	1
YO239-2	YPHY K NDKSSHWYFDV	SEC. ID N°: 47	1
YO239-3	YPHY L ADRSSHWYFDV	SEC. ID N°: 48	1
YO239-4	YPHY V NERSSHWYFDV	SEC. ID N°: 49	1
YO239-5	YPHY L KDKSSHWYFDV	SEC. ID N°: 50	1
YO239-6	YPHY L KDGRSSHWYFDV	SEC. ID N°: 51	1
YO239-7	YPHY E RDGRSSHWYFDV	SEC. ID N°: 52	1
YO239-8	YPHY L RDGRSSHWYFDV	SEC. ID N°: 53	1
YO239-9	YPHY L GESSHWYFDV	SEC. ID N°: 54	1
YO239-10	YPHY L GEKSSHWYFDV	SEC. ID N°: 55	1

TABLA 11

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 5 de la biblioteca YC-98 (fago eluido de HCl)			
Nombre	Secuencia de VH3 (residuos 99-111) + inserciones	SEC. ID N°:	(# clones/10)
YO261-1	YPHY L KDRSSHWYFDV	SEC. ID N°: 56	2
YO261-2	YPHY L KDGMSSHWYFDV	SEC. ID N°: 57	2
*YO239-4			1
*YO239-9			5

ES 2 301 254 T3

TABLA 12

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 5 de la biblioteca de YC-98 (fago eluido de VEGF)			
Nombre	Secuencia de VH3 (residuos 99-111) + inserciones	SEC. ID N°:	(# clones/10)
YO228-11	YPHYE EKQ RKSHWYFDV	SEC. ID N°: 58	1
YO228-12	YPHYE KED KKSHWYFDV	SEC. ID N°: 59	1
YO228-13	YPHYE SHQ RKSHWYFDV	SEC. ID N°: 60	1
YO228-14	YPHYE SGE RESHWYFDV	SEC. ID N°: 61	1
YO228-15	YPHYE QSE GRSHWYFDV	SEC. ID N°: 62	1
YO228-16	YPHYE SVE GGSHWYFDV	SEC. ID N°: 63	1
YO228-17	YPHYE PS PRGSHWYFDV	SEC. ID N°: 64	1
YO228-18	YPHYE QR NGKSHWYFDV	SEC. ID N°: 65	1
YO228-19	YPHYE ARE GGSHWYFDV	SEC. ID N°: 66	1
YO228-20	YPHYE SNE RKSHWYFDV	SEC. ID N°: 67	1

TABLA 13

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 5 de la biblioteca de YC-98 (fago eluido de HCl)			
Nombre	Secuencia de VH3 (residuos 99-111) + inserciones	SEC. ID N°:	(# clones/10)
YO229-11	YPHYE RGD RKSHWYFDV	SEC. ID N°: 68	1
YO229-12	YPHYE SDE KKSHWYFDV	SEC. ID N°: 69	1
YO229-13	YPHYE RSQ RKSHWYFDV	SEC. ID N°: 70	1
YO229-14	YPHYE AWR DRRSHWYFDV	SEC. ID N°: 71	1
YO229-15	YPHYE ANR ERKSHWYFDV	SEC. ID N°: 72	1
YO229-16	YPHYE VND KTSHWYFDV	SEC. ID N°: 73	1
YO229-17	YPHYE VEE TESHWYFDV	SEC. ID N°: 74	1
YO229-18	YPHYE EKE RKSHWYFDV	SEC. ID N°: 75	1
YO229-19	YPHYE SHE RVSHWYFDV	SEC. ID N°: 76	1

ES 2 301 254 T3

TABLA 14

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 7 de la biblioteca de YC-98 (fago eluido de HCl)			
Nombre	Secuencia de VH3 (residuos 99-111) + inserciones	SEC. ID N°:	(# clones /10)
YO239-11	YPHY YRDER SHWYFDV	SEC. ID N°: 77	1
YO239-12	YPHY YAHEKK SHWYFDV	SEC. ID N°: 78	1
YO239-13	YPHY YLKDRK SHWYFDV	SEC. ID N°: 79	1
YO239-14	YPHY YQHDRT SHWYFDV	SEC. ID N°: 80	1
YO239-15	YPHY YVTDK SHWYFDV	SEC. ID N°: 81	1
YO239-16	YPHY YLRDKK SHWYFDV	SEC. ID N°: 82	1
YO239-17	YPHY YSHERK SHWYFDV	SEC. ID N°: 83	1
YO239-18	YPHY YLNERK SHWYFDV	SEC. ID N°: 84	1
YO239-19	YPHY YVNERK SHWYFDV	SEC. ID N°: 85	2
YO240-1	YPHY YLTDHK SHWYFDV	SEC. ID N°: 86	1

TABLA 15

Secuencias de proteína de variantes de anti-VEGF a partir de la Ronda 8 de la biblioteca de YC-98 (fago eluido de HCl)			
Nombre	Secuencia de VH3 (residuos 99-111) + inserciones	SEC. ID N°:	(# clones /10)
YO261-4	YPHY YLKDGKK SHWYFDV	SEC. ID N°: 87	1
YO261-5	YPHY YRRDKK SHWYFDV	SEC. ID N°: 88	1
YO261-6	YPHY YLKDKK SHWYFDV	SEC. ID N°: 89	1
YO261-7	YPHY YLHDRK SHWYFDV	SEC. ID N°: 90	1
YO261-8	YPHY YLSDKK SHWYFDV	SEC. ID N°: 91	1
YO239-19	YPHY YVNERK SHWYFDV	SEC. ID N°: 92	1
*YO239-13			1
*YO239-16			3

Con el fin de cuantificar las afinidades relativas de unión al antígeno, se transformaron diversos ADN de variantes de anti-VEGF en la cepa 34B8 de *E. coli*, expresadas como Fab, y se purificaron mediante el paso del “shockate” periplasmático a través de una columna de proteína G (Pharmacia) tal y como se describe en WO98/45331.

ES 2 301 254 T3

Variante Y0313-2 de combinación de CDR: Se realizó un intento para incrementar la afinidad de unión del antígeno mediante la combinación de una mutación del VH2 de CDR descubierta previamente con una variante de inserción descrita en la presente invención. Se utilizó un oligonucleótido mutagénico, YC-107 (Tabla 16), para combinar las mutaciones de inserción encontradas en el VH3 de CDR, del clon Y0239-19, con mutaciones T28D/N31H del VH2 de CDR del clon Y0243-1 (WO98/45331) del VH2 de CDR.

TABLA 16

Oligo de mutagénesis para añadir un péptido de inserción en CDR				
Oligo #	Región	(Comentarios)	Secuencia	SEC. ID N°:
YC-107	VH3	(inserción de VNERK de la biblioteca YC-98)	TAC CCG CAC TAT TAT GTG AAC GAG CGG AAG AGC CAC TGG TAT TTC	SEC. ID N°: 93

Se designó como Y0313-2 a la variante de CDR combinada resultante. Se preparó una muestra de proteína Fab tal y como se ha descrito anteriormente para el análisis BIACORE™.

Análisis BIACORE™: Se calcularon las afinidades de unión a VEGF de los fragmentos de Fab a partir de constantes de la velocidad de asociación y disociación medidas utilizando un sistema de resonancia de plasmón de superficie (BIACORE™, Inc., Piscataway, NJ). Se activó un chip biosensor para el acoplamiento covalente de VEGF utilizando clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor (BIACORE™, Inc., Piscataway, NJ). El VEGF (8-109) se intercambió tamponado en 20 mM de acetato sódico, a pH 4,8 y se diluyó hasta aproximadamente 50 mg/mL. Se inyectaron alícuotas de VEGF a una velocidad de flujo de 2 µL/min para conseguir aproximadamente 700-1400 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Se inyectó una solución de etanolamina 1M como agente de bloqueo.

Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones dobles en serie de Fab en tampón de PBS/TWEEN (0,05% de TWEEN 20™ en solución salina tamponada de fosfato) a 25°C a una velocidad de flujo de 10 µL/min. Se calcularon las constantes de disociación en equilibrio, las Kds, a partir de las mediciones de SPR, como "koff/kon" (Tabla 17).

TABLA 17

Cinética de la unión Fab-VEGF a partir de las mediciones de BIACORE™				
Variante	Kon (10 ⁴ /M/s)	koff (10 ⁴ /s)	Kd (nM)	Kd (wt) / Kd (mut)
Y0192	4,1	1,21	2,9	-1-
Y0241-4	4,4	1,41	3,2	0,9
Y0241-7	4,6	1,28	3,0	1,0
Y0241-6	4,7	1,29	2,7	1,1
Y0242-1	4,7	0,86	1,8	1,6
Y0239-19	3,6	0,10	0,30	9,7
Y0239-8	3,8	0,18	0,50	5,8
Y0240-1	2,5	0,13	0,50	5,8
Y0239-2	3,6	1,64	4,6	0,6
Y0239-12	5,7	0,34	0,6	4,8
Y0239-9	3,97	0,19	0,5	6,0
Y0261-6	4,4	0,25	0,6	5,0
Y0313-2	3,11	0,11	0,36	8,0

Los resultados de las mediciones de SPR demostraron que la afinidad aumentaba principalmente mediante una velocidad de disociación más lenta (en oposición a la asociación más rápida).

Para la variante de inserción Y0239-19, se observó un incremento de aproximadamente 10 veces en la afinidad de unión (Tabla 17). No obstante, la adición de las mutaciones de VH1 no incrementaron adicionalmente la afinidad, tal y como se indicó para la variante Y0313-2.

Ensayo de VEGF Basado en Células: Se ensayaron dos variantes de Fab del anticuerpo anti-VEGF acerca de su capacidad de antagonizar VEGF (recombinante; versión 1-165) en la inducción del crecimiento de las HuVECs (células endoteliales de la vena umbilical humana). Se utilizó el ensayo con azul de alamar (H. Gazzano-Santoro *et al.* J Immunol Methods 202:163-171 (1997)) para medir la actividad metabólica de células en respuesta a la VEGF.

Se ensayaron dos variantes de Fab del anticuerpo anti-VEGF acerca de su capacidad de antagonizar la actividad de VEGF (recombinante; versión 1-165) en la inducción del crecimiento de las HuVECs (células endoteliales de la vena umbilical humana). Se siembran las células HuVEC en una placa de microtitulación de 96 pocillos en medio completo (Cell Systems, Kirkland, WA) que se había recubierto con factor de unión de Cell Systems. Las células se dejaron unirse durante 24 horas. En el segundo día, se diluyen VEGF y Fab en medio de ensayo (DMEM/F12 + penicilina/estreptomicina, 0,1% de gelatina). Para los experimentos con anticuerpo, se añade una concentración constante de 5 ng/ml de VEGF a todos los pocillos seguido de la adición de varias concentraciones de Fab de anti-VEGF (aproximadamente 10 μ g/ml y diluciones). El VEGF y el Fab se incuban con las células HuVEC durante 2 días, tras lo cual se añaden 25 mL de azul de alamar. Tras un período de incubación de 4 horas, se lee la fluorescencia en un lector de Placa de Fluorescencia de Cytofluor. Los medios utilizados para estos ensayos son de Cell Systems.

Los resultados (Figura 2) muestran que el Fab con la variante de inserción Y0313-2 tiene aproximadamente una potencia incrementada de 100 veces más que el anticuerpo humanizado original, F(ab)-12.

Cristalización y Determinación de la Estructura por Rayos X del Fab con la Inserción Y0313-2 formando un complejo con VEGF: Los cristales de VEGF formando un complejo con el fragmento Y0313 de Fab se desarrollaron a temperatura ambiente mediante la difusión de vapor utilizando el método de la gota colgante. El tampón de cristalización que contenía cloruro de sodio 0,1 M, Tris 20 mM a pH 7,5, y el complejo VEGF:Fab a una concentración de 8 mg/mL se mezcló con una misma cantidad de solución de reserva (PEG 4000 al 15%, isopropanol al 5%, MES 0,1 mM, pH 6,0, Citrato 0,2 M, Sulfato de Amonio 0,2 M y 1 mM de SPADNs ácido (2-(p-sulfofenilazo)-1,8-dihidroxi-3,6-naftaleno disulfónico)). Los cristales resultantes pertenecen al grupo espacial monoclinico P2 con parámetros de célula de $a=107,6$ Å, $b=65,8$ Å, $c=123,8$ Å, y $\beta=93,4^\circ$ y contienen un dímero de VEGF unido a dos fragmentos de Fab en la unidad asimétrica.

Previamente al enfriamiento súbito con nitrógeno líquido, se sumergieron los cristales en las aguas madres artificiales que contenían glicerol al 20%. Se recogieron una serie de datos de difracción a partir de un único cristal a 100 K en un detector CCD en la Advanced Light Source (Berkeley, CA). Se procesaron los datos utilizando MOS-FLM (Leslie, A MOSFLM Users Guide, MRC-LMB, Cambridge (1994)) y programas del grupo CCP4 (Collaborative Computing Project No. 4 Acta Crystallog. sect. D, 50: 760-763 (1994)). El conjunto de datos finales fueron de buena calidad ($R_{\text{sim}} = 7,4\%$) con una completación del 94,5% para todos las reflexiones entre 25 Å y 2,8 Å de resolución.

Se obtuvieron fases iniciales para el complejo mediante substitución molecular, utilizando los dominios constantes y los dominios variables del fragmento de Fab F(ab)-12 como modelos de búsqueda separados. Podría colocarse un modelo del dominio de unión al receptor de VEGF de modo inequívoco en un mapa de diferencias de densidad resultante.

El refinamiento del modelo con el programa X-PLOR (Bruenger *et al.* Science 235: 458-460. (1987)) tuvo como resultado un valor final de R del 21,2% con una R libre del 26,6% utilizando todos los datos entre 2,8 Å y 25 Å.

Nuevos Contactos Anticuerpo-Antígeno en el Complejo de Fab con Inserción con VEGF: Los resultados de la cristalografía de rayos X muestran que la introducción de la inserción (Asn 104a, Glu 104b y Arg 104c (nota: la numeración de los residuos de Y0313-2 es secuencial con residuos insertados dada una letra, en lugar de según Kabat *et al.*, *supra*) junto con las dos sustituciones (G104V y S105K) que la rodean, incrementa la cantidad total de superficie enterrada en el punto de contacto entre VEGF y el anticuerpo en aproximadamente un 20% (ver Figura 4), en comparación con la estructura del complejo F(ab)-12 (Muller *et al.*, Structure 6(9): 1153-1167 (1998)). Los principales contribuyentes en la ampliación del área de contacto son los residuos Val 104 y Arg 104c. Juntos, estos dos residuos justifican los 220 Å² adicionales de superficie enterrada en el fragmento de Fab. La cadena lateral de la Val 104 está empaquetada de forma apretada contra la cadena principal de los residuos 93 a 95 de VEGF. La Arg 104c recién introducida forma una interacción cargada con el grupo carboxilo de la Asp 41 de VEGF y también está en contacto con el anillo de fenilo de la Tyr 39 (ver Figura 5). Se hacen contribuciones menores al punto de contacto por parte de la cadena lateral de la Lys 105 que se encuentra en las proximidades de los residuos de VEGF Glu 44 y Tyr 45. Las cadenas laterales de los residuos Asn 104b y Glu 104b se alejan del punto de contacto y ninguno de ellos contribuye de forma significativa al punto de contacto entre el fragmento de Fab y el VEGF.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • WO 9845331 A [0014] [0014] [0191] [0194] [0202] [0203]
- US 4816567 A [0019] [0020] [0090] [0099] [0101]
- EP 404097 A [0023]
- 15 • WO 9311161 A [0023]
- US 4675187 A [0042]
- 20 • US 4275149 A [0045] [0167] [0169]
- US 5091178 A [0052]
- WO 9823761 A [0058]
- 25 • WO 8906692 A [0058]
- US 5500362 A [0058]
- 30 • WO 9527062 A [0058]
- EP 239400 B1 [0084]
- WO 9316185 A [0105]
- 35 • WO 9308829 A [0107]
- WO 9404690 A [0109]
- 40 • WO 9627011 A [0110]
- US 4676980 A [0111] [0111]
- WO 9100360 A [0111]
- 45 • WO 92200373 A [0111]
- EP 03089 A [0111]
- 50 • WO 9411026 A [0119]
- US 4485045 A [0121]
- US 4544545 A [0121]
- 55 • US 5013556 A [0121]
- WO 8101145 A [0123]
- 60 • WO 8807378 A [0123]
- US 4975278 A [0123]
- US 5739277 A [0128]
- 65 • US 4640835 A [0131]
- US 4496689 A [0131]

ES 2 301 254 T3

- US 4301144 A [0131]
- US 4670417 A [0131]
- 5 • US 4791192 A [0131]
- US 4179337 A [0131]
- WO 9013646 A [0134]
- 10 • US 4965199 A [0141]
- EP 73657 A [0147]
- 15 • US 4419446 A [0149]
- US 4601978 A [0149]
- WO 941102 A [0151]
- 20 • DD 266710 [0152]
- EP 402226 A [0153]
- 25 • EP 183070 A [0153]
- EP 244234 A [0153]
- US 4767704 A [0157]
- 30 • US 4657866 A [0157]
- US 4927762 A [0157]
- 35 • US 4560655 A [0157]
- US 5122469 A [0157]
- WO 9003430 A [0157]
- 40 • WO 8700195 A [0157]
- US RE30985 E [0157]
- 45 • US 3773919 A [0164]
- US 4737456 A [0167]
- US 4318980 A [0169]
- 50 • US 4376110 A [0174]
- US 60108945 B [0217]

55 Documentos que no son patentes citados en la descripción

- Sequences of Proteins of Immunological Interest,. **KABAT** *et al.* Public Health Service, National Institutes of Health. 1991 [0003]
- 60 • **HAWKINS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0006]
- **BARBAS III** *et al. PNAS (USA)*, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0006]
- **YANG** *et al. J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 254, 392-403 [0006]
- 65 • **SCHIER** *et al. J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 263, 551567 [0006]
- **THOMPSON** *et al. J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 256, 77-88 [0006]

ES 2 301 254 T3

- **BALINT; LARRICK.** *Gene*, 1993, vol. 137, 109-118 [0006]
- **WU et al.** *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 6037-642 [0006]
- 5 • **CHISWELL; MCCAFFERTY.** *TIBTECH*, 1992, vol. 10, 80-84 [0006]
- **RADER; BARBAS III.** *Current Opinion in Biotech.*, 1997, vol. 8, 503-508 [0006]
- **FEENEY et al.** *J. Immunol.*, 1989, vol. 143, 4061-4060 [0007]
- 10 • **WILSON et al.** *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 187 (1), 59-70 [0008]
- **MULLER et al.** *Structure*, 1998, vol. 6 (9), 1153-1167 [0014] [0065] [0080] [0187]
- 15 • Sequences of Proteins of Immunological Interest. **KABAT et al.** Public Health Service, National Institutes of Health. 1991 [0016] [0017]
- **CHOTHIA; LESK.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0016]
- 20 • **KOHLER et al.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0019] [0090]
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0019] [0098]
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0019] [0098]
- 25 • **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0020]
- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0021] [0101]
- 30 • **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0021]
- **PRESTA.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0021]
- The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. *Springer-Verlag*, 1994, vol. 113, 269-315 [0022]
- 35 • **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0023] [0114]
- **ZAPATA et al.** *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0024]
- 40 • **ELLMAN et al.** *Meth. Enzym.*, 1991, vol. 202, 301-336 [0031]
- **NOREN et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 182 [0031]
- **WILMAN.** Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382
- 45 • Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **STELLA et al.** Directed Drug Delivery. *Humana Press*, 1985, 247-267 [0043]
- **AMIT et al.** *Science*, 1986, vol. 233, 747-753 [0065] [0084]
- 50 • **LEVY et al.** *Biochemistry*, 1989, vol. 28, 7168-7175 [0065]
- **BRUCCOLERI et al.** *Nature*, 1998, vol. 335, 564-568 [0065]
- 55 • **CHOTHIA et al.** *Science*, 1986, vol. 233, 755-758 [0065]
- **KUNKEL.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 488 [0081]
- **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0084]
- 60 • **GODING.** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0091] [0095]
- **KOZBOR.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0093]
- 65 • **BRODEUR et al.** Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0093]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0098]

ES 2 301 254 T3

- **MARKS** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0098]
- **WATERHOUSE** *et al. Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0098]
- 5 • **MORRISON** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0099]
- **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0101]
- **VERHOEYEN** *et al. Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0101]
- 10 • **SIMS** *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0102]
- **CHOTHIA** *et al. J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0102]
- 15 • **CARTER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0102]
- **PRESTA** *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0102]
- **JAKOBOVITS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0104]
- 20 • **JAKOBOVITS** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0104]
- **BRUGGERMANN** *et al. Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0104]
- 25 • **DUCHOSAL** *et al. Nature*, 1992, vol. 355, 258 [0104]
- **HOOGENBOOM** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0104]
- **MARKS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 591-597 [0104]
- 30 • **VAUGHAN** *et al. Nature Biotech*, 1996, vol. 14, 309 [0104]
- **MORIMOTO** *et al. Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0105]
- 35 • **BRENNAN** *et al. Science*, 1985, vol. 229, 81 [0105] [0112]
- **CARTER** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0105] [0158]
- **MILLSTEIN** *et al. Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0107]
- 40 • **TRAUNECKER** *et al. EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0107]
- **SURESH** *et al. Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0109]
- 45 • **SHALABY** *et al. J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0113]
- **KOSTELNY** *et al. J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0114]
- **GRUBER** *et al. J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0114]
- 50 • **TUTT** *et al. J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0115]
- **CARON** *et al. J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0116]
- 55 • **SHOPES, B. J.** *Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0116]
- **WOLFF** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0116]
- **STEVENSON** *et al. Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0116]
- 60 • **VITETTA** *et al. Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0119]
- **EPSTEIN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0121]
- 65 • **HWANG** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0121]
- **MARTIN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0122]

ES 2 301 254 T3

- **GABIZON** *et al. J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0122]
- **MASSEY**. *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0125]
- 5 • **NEUBERGER** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0126]
- **HAKIMUDDIN** *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0130]
- **EDGE** *et al. Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0130]
- 10 • **THOTAKURA** *et al. Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0130]
- **STINCHCOMB** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0142]
- 15 • **JONES**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0142]
- **VAN DEN BERG**. *Biol/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0143]
- **FLEER** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0143]
- 20 • **YANIV**. *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18 [0150]
- **GRAHAM** *et al. J.GenViro.*, 1977, vol. 36, 59 [0155]
- 25 • **URLAUB** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0155]
- **MATHER**. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0155]
- **MATHER** *et al. Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0155]
- 30 • **HAM** *et al. Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0157]
- **BARNES** *et al. Anal. Biochem*, 1980, vol. 102, 255 [0157]
- 35 • **LINDMARK** *et al. J. Immunol. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0159]
- **GUSS** *et al. EMBO J.*, 1986, vol. 5, 1567-1575 [0159]
- 40 • Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0162]
- Current Protocols in Immunology. Wiley-Interscience, 1991, vol. 1 and 2 [0167]
- Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay. **O'SULLIVAN**
et al. Methods in Enzym. Academia press, 1981, vol. 73, 147-166 [0167]
- 45 • **ZOLA**. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. *CRC Press, Inc*, 1987, 147-158 [0172]
- **H.GAZZANO-SANTORO** *et al. J Immunol Methods*, 1997, vol. 202, 163-171 [0209]
- 50 • **LESLIE**, A. *MOSFLM Users Guide*, 1994 [0213]
- Collaborative Computing Project No. 4 *Acta Crystallog. sect. D*, 1994, vol. 50, 760-763 [0213]
- 55 • **BRUENGER** *et al. Science*, 1987, vol. 235, 458-460 [0215]
- **MULLER** *et al. structure*, 1998, vol. 6 (9), 1153-1167 [0216]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de una variante de anticuerpo anti factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de un anticuerpo parental, comprendiendo dicho procedimiento la inserción de dos a diez residuos de aminoácido en una Región Determinante de Complementariedad (CDR) H3 de un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo parental, en el que la variante del anticuerpo anti-VEGF tiene una afinidad de unión por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es por lo menos dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo parental, y en el que por lo menos uno de los residuos insertados es arginina o lisina, o la inserción es contigua al residuo número 100 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo parental, utilizando la numeración de residuos del dominio variable según Kabat.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los residuos insertados son VNERK.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la variante del anticuerpo tiene una afinidad de unión por VEGF que es por lo menos aproximadamente cinco veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo parental por VEGF.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo parental es un anticuerpo humanizado.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en el que el anticuerpo parental es un anticuerpo humano.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos uno de los residuos insertados tiene una carga neta positiva o una carga neta negativa.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la inserción consiste en tres residuos de aminoácido insertados.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una sustitución de aminoácido en la región hipervariable.

9. Variante de anticuerpo anti factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de un anticuerpo parental, cuya variante de anticuerpo anti-VEGF comprende una inserción de un aminoácido dentro de una Región de Determinante de Complementariedad (CDR) H3 o contigua a ésta de un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo parental, en el que la variante del anticuerpo anti-VEGF tiene una afinidad de unión por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es por lo menos dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo parental y en el que la CDR H3 del dominio variable de la cadena pesada de la variante del anticuerpo anti-VEGF comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°:85, SEC ID N°:53, SEC ID N°:86, SEC ID N°:78, SEC ID N°:54, y SEC ID N°:89.

10. Variante del anticuerpo anti-VEGF según la reivindicación 9, en la que la CDR H3 del dominio variable de la cadena pesada de la variante de anticuerpo anti-VEGF comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:85.

11. Variante del anticuerpo anti-VEGF según la reivindicación 9, que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:98 o la SEC ID N°:99.

12. Variante del anticuerpo anti-VEGF según la reivindicación 11, que comprende los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo Y0239-19 que tiene las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 98 y 95, respectivamente.

13. Variante del anticuerpo anti-VEGF según la reivindicación 11, que comprende los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo Y0313-2 que tiene las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 99 y 95, respectivamente.

14. Variante del anticuerpo anti-VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 para su uso en terapia.

15. Composición que comprende una variante del anticuerpo anti-VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 y un portador farmacéuticamente aceptable.

16. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica la variante del anticuerpo anti-VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13.

17. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 16.

18. Célula huésped transformada con el vector según la reivindicación 17.

ES 2 301 254 T3

19. Procedimiento de producción de una variante del anticuerpo anti-VEGF que comprende el cultivo de la célula huésped según la reivindicación 18, de manera que se expresa el ácido nucleico.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, que comprende además la recuperación de la variante del anticuerpo anti-VEGF del cultivo de la célula huésped.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que la variante del anticuerpo se recupera del medio de cultivo de la célula huésped.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A

□ diferencias de F(ab)-12

	10	20	30	
F(ab)-12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQ			
Y0192	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA NEOL SNYLNWYQQ			
Y0238-3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA NEOL SNYLNWYQQ			
Y0239-19	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA NEOL SNYLNWYQQ			
Y0313-2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA NEOL SNYLNWYQQ			
				CDR-L1
	40	50	60	70
F(ab)-12	KPGKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS			
Y0192	KPGKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS			
Y0238-3	KPGKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS			
Y0239-19	KPGKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS			
Y0313-2	KPGKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTIS			
				CDR-L2
	80	90	100	
F(ab)-12	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV			(SEQ ID NO:94)
Y0192	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV			(SEQ ID NO:95)
Y0238-3	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV			(SEQ ID NO:95)
Y0239-19	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV			(SEQ ID NO:95)
Y0313-2	SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV			(SEQ ID NO:95)
				CDR-L3

FIGURA 1B

—	□ diferencias de F(ab)-12	
F(ab)-12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFT NYGMNWVR	30
Y0192	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFT NYGMNWVR	20
Y0238-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYDFT HYGMNWVR	10
Y0239-19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFT NYGMNWVR	
Y0313-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYDFT HYGMNWVR	
	CDR-H1	
F(ab)-12	QAPGKGLEWVGWINTYTG PTYAADF KRRFTFSLDTSKSTA	40 50 60 70
Y0192	QAPGKGLEWVGWINTYTG PTYAADF KRRFTFSLDTSKSTA	
Y0238-3	QAPGKGLEWVGWINTYTG PTYAADF KRRFTFSLDTSKSTA	
Y0239-19	QAPGKGLEWVGWINTYTG PTYAADF KRRFTFSLDTSKSTA	
Y0313-2	QAPGKGLEWVGWINTYTG PTYAADF KRRFTFSLDTSKSTA	
	CDR-7	
F(ab)-12	YMQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYG---SSHWFYFDVWGQGTL	80 90 100
Y0192	YMQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYG---SSHWFYFDVWGQGTL	
Y0238-3	YMQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYG---SSHWFYFDVWGQGTL	
Y0239-19	YMQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY VNERK SHWFYFDVWGQGTL	
Y0313-2	YMQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY VNERK SHWFYFDVWGQGTL	
	CDR-H3	

FIGURA 2

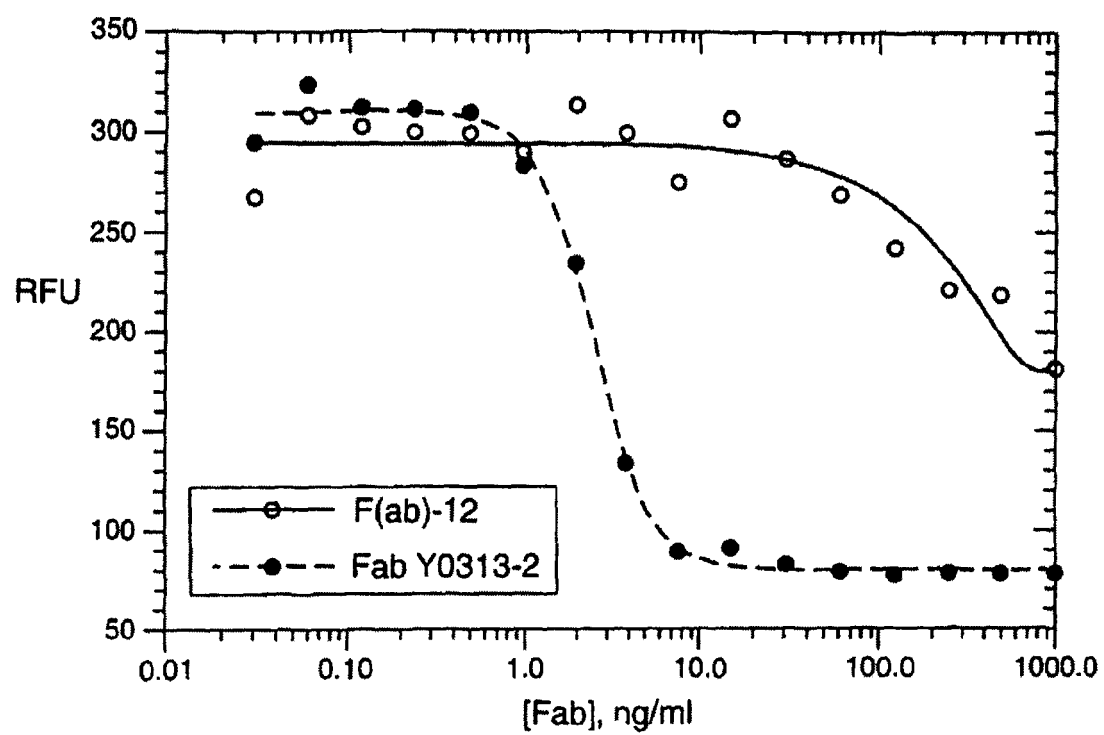


FIGURA 3

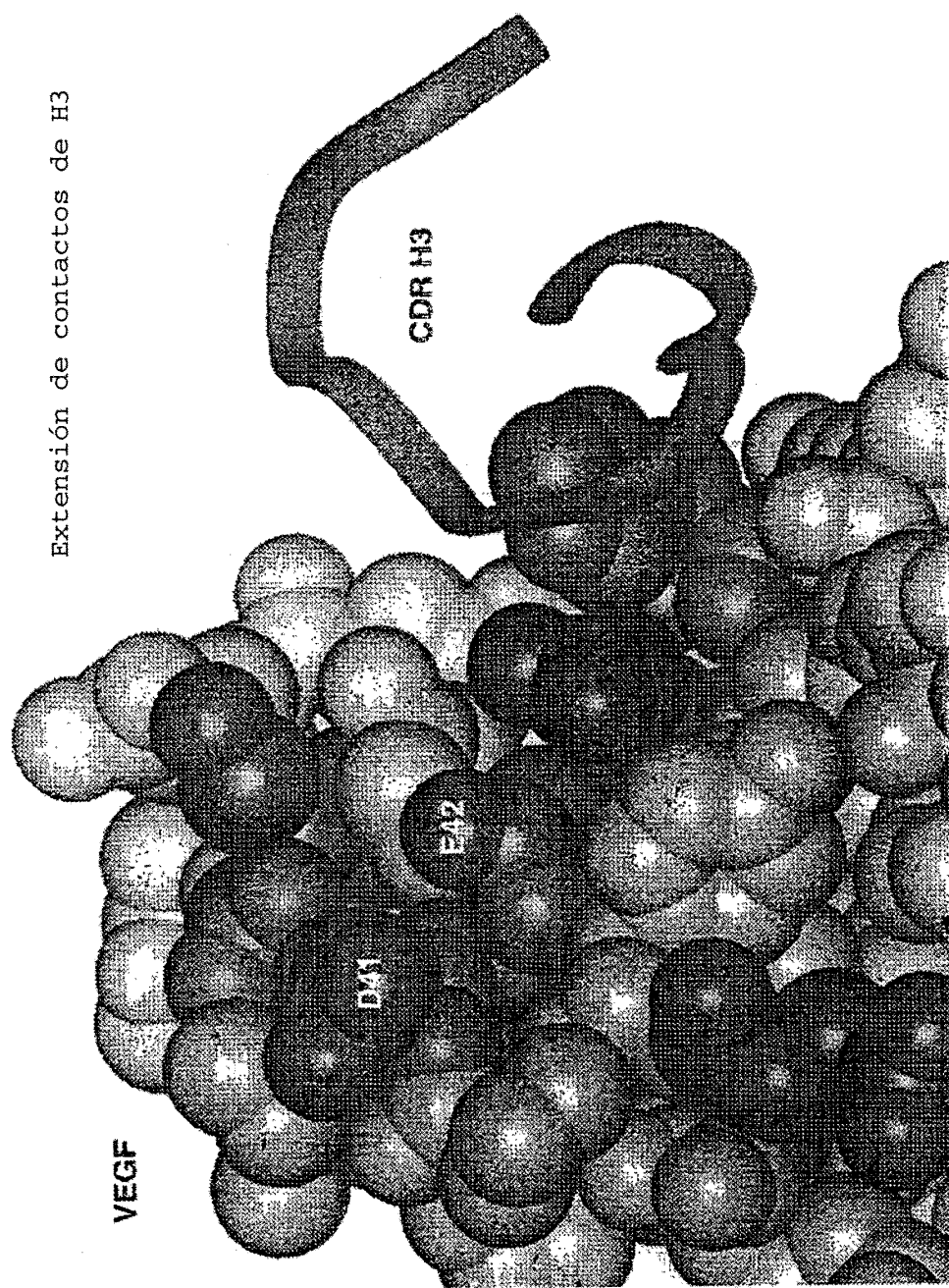


FIGURA 4

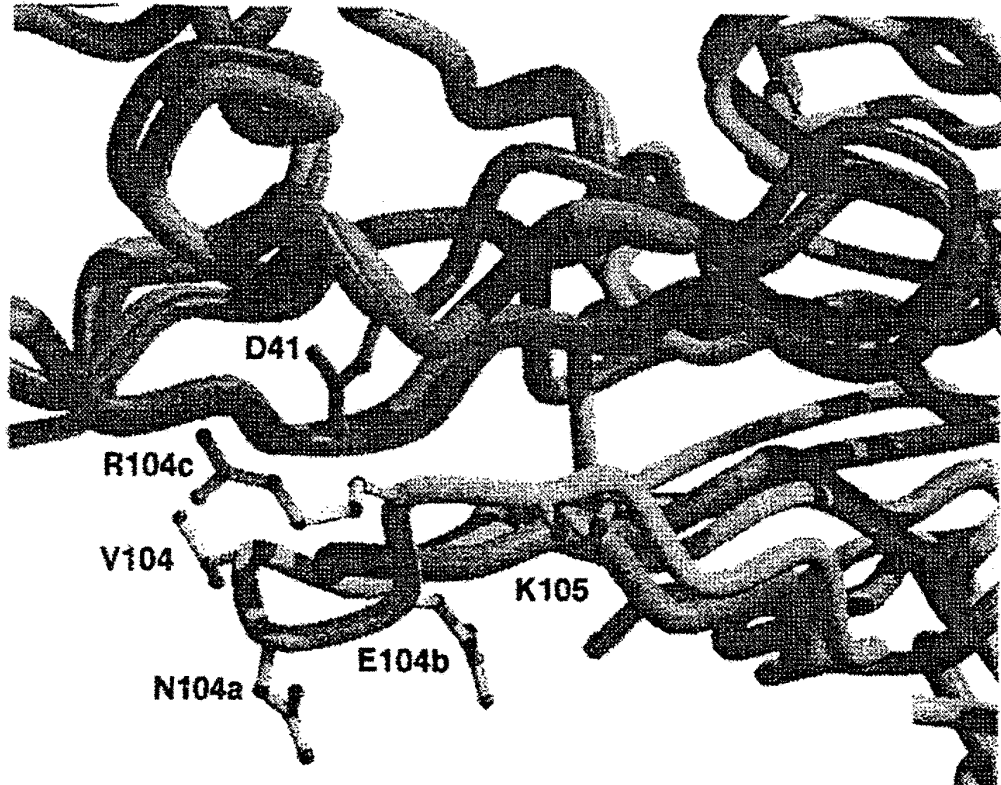
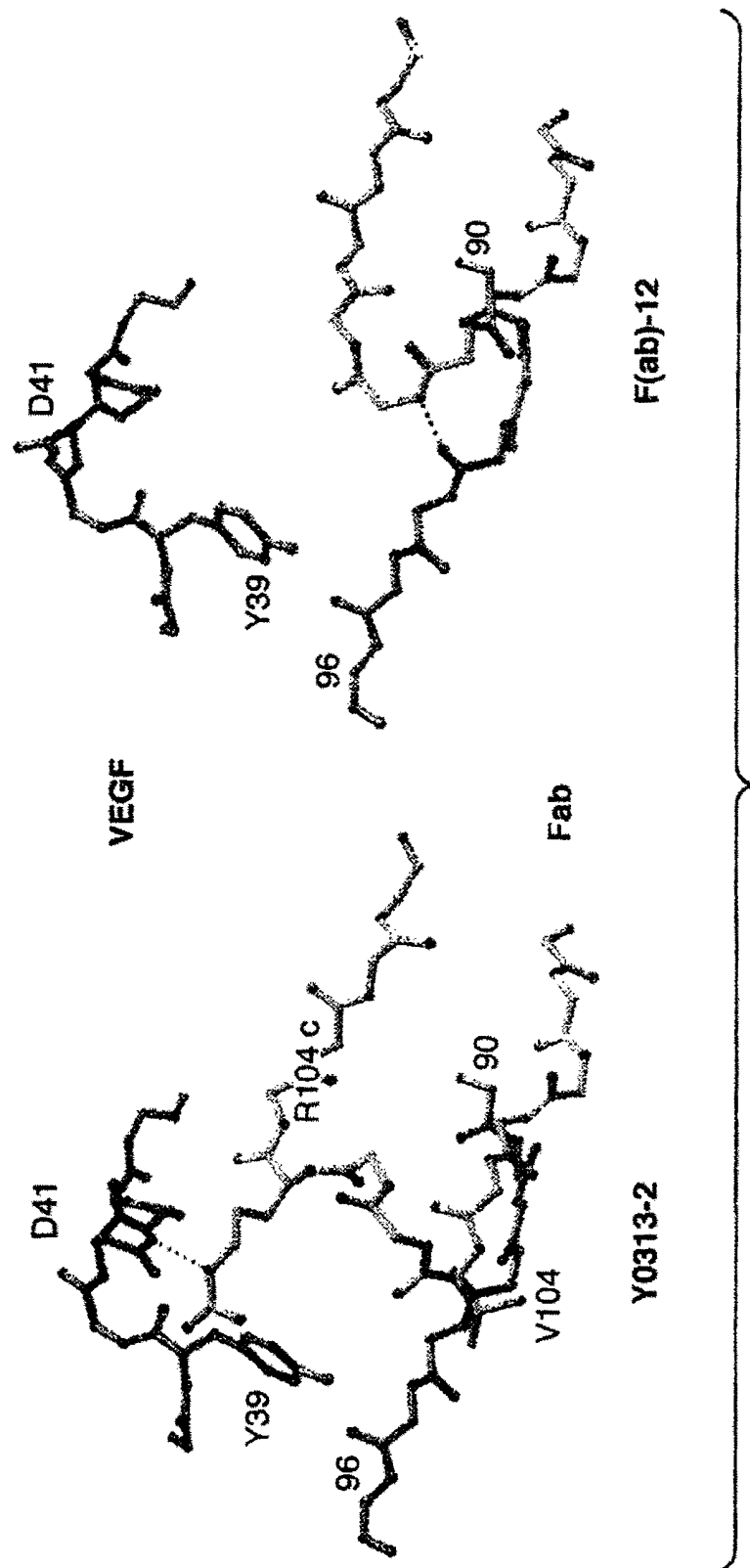


FIGURA 5



ES 2 301 254 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

5 <120> VARIANTES DE ANTICUERPOS

<130> P146R1PCT

10 <141> 1999-11-16

<150> US 60/108.945

<151> 1998-11-18

15 <160> 99

<210> 1

20 <211> 32

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25 <220>

<221> Artificial

<222> 1-32

30 <223> oligo del desplazamiento del marco de lectura

<400> 1

35 ctgtcaacag tatagctacc gtgccgtgga cg 32

<210> 2

<211> 32

40 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

45 <221> Artificial

<222> 1-32

<223> oligo del desplazamiento del marco de lectura

50 <400> 2

gcagcttctg gctatgacct tcaccaacta tg 32

55 <210> 3

<211> 33

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Artificial

65 <222> 1-33

<223> oligo del desplazamiento del marco de lectura

ES 2 301 254 T3

<400> 3
gatggattaa cacctatgac cggatgaaccg acc 33

5 <210> 4
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> Artificial
<222> 1-34
15 <223> oligo del desplazamiento del marco de lectura

<400> 4

20 gatggattaa cacctattga accgacctat gctg 34

<210> 5
25 <211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> Artificial
<222> 1-35
35 <223> oligo del desplazamiento del marco de lectura

<400> 5
gtacccgcac tattatgagc agccactggt attc 35

40 <210> 6
<211> 32
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Artificial
50 <222> 1-32
<223> oligo del desplazamiento del marco de lectura

<400> 6
55 gtacccgcac tattatgagc cactggatt tc 32

<210> 7
60 <211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<221> Artificial

ES 2 301 254 T3

<222> 1-43
 <223> oligo aleatorio
 5 <220>
 <221> desconocido
 <222> 17-18, 20-21, 23-24, 26-27
 <223> base desconocida
 10 <400> 7
 ctgtcaacag tatagcnnsn nsnnnsnsac cgtgccgtgg acg 43
 15 <210> 8
 <211> 49
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> Artificial
 25 <222> 1-49
 <223> oligo aleatorio
 <220>
 30 <221> desconocido
 <222> 17-18, 20-21, 23-24, 26-27, 29-30, 32-33
 <223> base desconocida
 35 <400> 8
 ctgtcaacag tatagcnnsn nsnnnsnnsn snnsaccgtg ccgtggacg 49
 40 <210> 9
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-43
 50 <223> oligo aleatorio
 <220>
 <221> desconocido
 55 <222> 16-17, 19-20, 22-23, 25-26
 <223> base desconocida
 60 <400> 9
 gcagcttctg gctatnnsn snnsnsacc ttcaccaact atg 43
 65 <210> 10
 <211> 46
 <212> ADN

ES 2 301 254 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <221> Artificial
 <222> 1-46
 <223> oligo aleatorio
 10 <220>
 <221> desconocido
 <222> 16-17, 19-20, 22-23, 25-26, 28-29
 <223> base desconocida
 15 <400> 10
 20 gcagcttctg gctatnnsnn snnsnnsnns acctcacca actatg 46
 <210> 11
 <211> 49
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <221> Artificial
 <222> 1-49
 <223> oligo aleatorio
 35 <220>
 <221> desconocido
 <222> 16-17, 19-20, 22-23, 25-26, 28-29, 31-32
 40 <223> base desconocida
 <400> 11
 45 gcagcttctg gctatnnsnn snnsnnsnns nnsaccttca ccaactatg 49
 <210> 12
 <211> 41
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <221> Artificial
 <222> 1-41
 <223> oligo aleatorio
 60 <220>
 <221> desconocido
 <222> 18-19, 21-22, 24-25
 65 <223> base desconocida

ES 2 301 254 T3

<400> 12

gatggattaa cacctatnns nnsnnsaccg gtgaaccgac c 41

5

<210> 13

<211> 44

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Artificial

15

<222> 1-44

<223> oligo aleatorio

<220>

20

<221> desconocido

<222> 18-19, 21-22, 24-25, 27-28

<223> base desconocida

25

<400> 13

gatggattaa cacctatnns nnsnnsnnsa ccggtgaacc gacc 44

30

<210> 14

<211> 51

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Secuencia Artificial

40

<222> 1-51

<223> oligo aleatorio

<220>

45

<221> desconocido

<222> 18-19, 21-22, 24-25, 27-28, 30-31, 33-34

<223> base desconocida

50

<400> 14

gatggattaa cacctatnns nnsnnsnnsn nsnnsaacc gacctatgct 50

g 51

55

<210> 15

<211> 46

<212> ADN

60

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Artificial

65

<222> 1-46

<223> oligo aleatorio

ES 2 301 254 T3

<220>
<221> desconocido
<222> 17-18, 20-21, 23-24, 26-27
5 <223> base desconocida

<400> 15

10 gtacccgcac tattatnnsn nsnnnsnsag cagccactgg tatttc 46

<210> 16
<211> 46
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <221> Artificial
<222> 1-46
<223> oligo aleatorio

25 <220>
<221> desconocido
<222> 17-18, 20-21, 23-24, 26-27
30 <223> base desconocida

<400> 16

35 gtacccgcac tattatnnsn nsnnnsnsag cagccactgg tatttc 46

<210> 17
<211> 46
40 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
45 <221> Artificial
<222> 1-46
<223> oligo aleatorio

50 <220>
<221> desconocido
<222> 17-18, 20-21, 23-24, 26-27, 29-30
55 <223> base desconocida

<400> 17

60 gtacccgcac tattatnnsn nsnnnsnsnn sagccactgg tatttc 46

<210> 18
<211> 49
65 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

<220>

<221> Artificial

<222> 1-49

5 <223> oligo aleatorio

<220>

<221> desconocido

10 <222> 17-18, 20-21, 23-24, 26-27, 29-30, 32-33

<223> base desconocida

<400> 18

15

gtaccgcac tattatnnsn nsnnnsnnsnn snnsagccac tggatttc 49

20 <210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<221> Artificial

<222> 1-10

30

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 19

35

Gly	Tyr	Asp	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Ile	Asn
1				5					10

40 <210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<221> Artificial

<222> 1-10

50

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 20

55

Gly	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Gly	Ile	Asn
1				5					10

60 <210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

<221> Artificial

ES 2 301 254 T3

<222> 1-10

<223> Secuencia de CDR variante

5 <400> 21

Gly Tyr Asp Trp Thr Asn Tyr Gly Ile Asn
1 5 10

10 <210> 22

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

20 $\langle 222 \rangle$ 1-13

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 22

25

Trp Ile Asn Thr Trp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala
1 5 10 13

30 $\langle 210 \rangle$ 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<221> Artificial

<222> 1-9

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 23

45 Gln Gln Tyr Ser Ala Thr Pro Trp Thr
 1 5 9

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55
<220>

<221> Artificial

<222> 1-9

60 <223> Secuencia de CDR variante

<400> 24

65 Gln Gln Tyr Ser Asn Val Pro.Trp Thr
 1 5 9

ES 2 301 254 T3

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 10 <222> 1-9
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 25
 15
 Gln Gln Tyr Ser Ala Val Pro Trp Thr
 1 5 9

 20 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 30 <222> 1-9
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 26
 35
 Gln Gln Tyr Ser Ser Val Pro Trp Thr
 1 5 9

 40 <210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 50 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 27

 55 **Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Lys Glu Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 17
 60

 <210> 28
 <211> 17
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

<220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 5 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 28

 10 **Tyr Pro His Tyr Tyr Val Gly Glu Thr Ser Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 15 17

 <210> 29
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <221> Artificial
 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 30 <400> 29
 Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Arg Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

 35 **Asp Val**
 17

 <210> 30
 40 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-18
 50 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 30

 55 **Tyr Pro His Tyr Tyr Glu Arg Asp Gly Lys Ser Ser His Trp Tyr**
 1 5 10 15

 Phe Asp Val
 60 18

 <210> 31
 <211> 17
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

<220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 5 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 31

 10 **Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Asn Glu Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 15 17

 <210> 32
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <221> Artificial
 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 30 <400> 32

 Tyr Pro His Tyr Tyr Val Gly Glu Gln Ser Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 35
 Asp Val
 17

 40 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 50 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 33

 55 **Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Arg Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 60 17

 <210> 34
 <211> 18
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

<220>
 <221> Artificial
 <222> 1-18
 5 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 34

 10 **Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Lys Gln Ser Lys Ser Ser His Trp Tyr**
 1 5 10 15

 Phe Asp Val
 15 18

 <210> 35
 <211> 18
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <221> Artificial
 <222> 1-18
 <223> Secuencia de CDR variante

 30 <400> 35

 Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Asn Glu Gly Pro Ser Ser His Trp Tyr
 1 5 10 15
 35 **Phe Asp Val**
 18

 40 <210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 50 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 36

 55 **Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Asn His Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 60 **Asp Val**
 17

 65 <210> 37
 <211> 17

ES 2 301 254 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

10

<400> 37

15 Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Thr Glu Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

Asp Val

20 17

<210> 38

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

30 <221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

35 <400> 38

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

17

45 $\langle 210 \rangle$ 39

<211> 17

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

55 $\langle 222 \rangle$ 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 39

60

Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Asp Glu Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

17

ES 2 301 254 T3

<210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 10 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 15 <400> 40

 Tyr Pro His Tyr Tyr Val Gly Glu Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 Asp Val
 17
 25 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 35 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 40 <400> 41

 Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Asp Glu Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 Asp Val
 17
 45 <210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 60 <223> Secuencia de CDR variante

 65

ES 2 301 254 T3

<400> 42

5 Tyr Pro His Tyr Tyr Thr Tyr Asp Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val
17

10

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

20 $\langle 222 \rangle$ 1-18

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 43

25

Tyr Pro His Tyr Tyr His Thr Arg Gly Gly Ser Ser His Trp Tyr
1 5 10 15

30

Phe Asp Val
18

35

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

45 $\langle 222 \rangle$ 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 44

50

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Asn Asp Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

55

Asp Val
17

<210> 45

60 $\langle 211 \rangle$ 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

ES 2 301 254 T3

<222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante
 5 <400> 45
 Tyr Pro His Tyr Tyr Tyr Arg Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 10 **Asp Val**
 17
 <210> 46
 15 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 25 <223> Secuencia de CDR variante
 <400> 46
 30 **Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Asn Glu Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15
 Asp Val
 35 17
 <210> 47
 <211> 17
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <221> Artificial
 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante
 50 <400> 47
 Tyr Pro His Tyr Tyr Lys Asn Asp Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
 55 1 5 10 15
 Asp Val
 17
 60 <210> 48
 <211> 17
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

<220>

<221> Artificial

<222> 1-17

5 <223> Secuencia de CDR variante

<400> 48

10 **Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Ala Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

15 **Asp Val**
 17

<210> 49

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

30 <400> 49

35 **Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn Glu Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

40 **Asp Val**
 17

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Artificial

50 <222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 50

55 **Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe**

60 1 5 10 15

65 **Asp Val**
 17

ES 2 301 254 T3

<210> 51
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 10 <222> 1-18
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 51
 15
 Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Gly Arg Ser Ser His Trp Tyr
 1 5 10 15
 20
 Phe Asp Val
 18

 <210> 52
 25 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-18
 <223> Secuencia de CDR variante
 35
 <400> 52
 40
 Tyr Pro His Tyr Tyr Glu Arg Asp Gly Arg Ser Ser His Trp Tyr
 1 5 10 15

 Phe Asp Val
 18
 45 <210> 53
 <211> 18
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 55 <222> 1-18
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 53
 60
 Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Arg Asp Gly Arg Ser Ser His Trp Tyr
 1 5 10 15
 65
 Phe Asp Val
 18
 <210> 54

ES 2 301 254 T3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<221> Artificial

<222> 1-16

10

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 54

15

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Gly Glu Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

20

Val
16

<210> 55

<211> 17

25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

35

<400> 55

40

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Gly Glu Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val
17

45

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Artificial

55

<222> 1-18

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 56

60

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Arg Arg Ser Ser His Trp Tyr
1 5 10 15

65

Phe Asp Val
18

ES 2 301 254 T3

<210> 57
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 10 <222> 1-18
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 57
 15 **Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Gly Met Ser Ser His Trp Tyr**
 1 5 10 15

 20 **Phe Asp Val**
 18

 <210> 58
 25 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 35 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 58
 40 **Tyr Pro His Tyr Tyr Glu Lys Gln Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 17
 45
 <210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 55 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 59
 60
 Tyr Pro His Tyr Tyr Lys Glu Asp Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

 65 **Asp Val**
 17

ES 2 301 254 T3

<210> 60
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 10 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 60
 15
 Tyr Pro His Tyr Tyr Ser His Gln Lys Arg Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

 20 **Asp Val**
 17

 <210> 61
 25 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 35 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 61
 40 **Tyr Pro His Tyr Tyr Ser Gly Glu Arg Glu Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 17
 45
 <210> 62
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 55 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 62
 60
 Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Ser Glu Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

 65 **Asp Val**
 17

ES 2 301 254 T3

<210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 10 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 63
 15 **Tyr Pro His Tyr Tyr Ser Val Glu Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 20 **Asp Val**
 17

 <210> 64
 25 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <221> Artificial
 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante
 35 <400> 64
 Tyr Pro His Tyr Tyr Pro Ser Pro Arg Gly Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 40 **Asp Val**
 17

 <210> 65
 45 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 55 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 65
 60 **Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Arg Asn Gly Lys Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 65 17

 <210> 66
 <211> 17

ES 2 301 254 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

10

<400> 66

Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Arg Glu Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe
15 1 5 10 15

Asp Val
17

20

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

30 <221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

35 <400> 67

Tyr Pro His Tyr Tyr Ser Asn Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

40

Asp Val
17

45 $\langle 210 \rangle$ 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

.. <222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 68

60 Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Gly Asp Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

65 Asp Val
 17

ES 2 301 254 T3

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 10 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 69
 15

 Tyr Pro His Tyr Tyr Ser Asp Glu Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 20
 Asp Val
 17

 25 <210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 35 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 70
 40

 Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Ser Gln Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 45
 Asp Val
 17

 50 <210> 71
 <211> 18
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 60 <222> 1-18
 <223> Secuencia de CDR variante

 65

ES 2 301 254 T3

<400> 71

5 Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Trp Arg Asp Arg Arg Ser His Trp Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Val
18

10

<210> 72

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Artificial

20 <222> 1-18

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 72

25

Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Asn Arg Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr
1 5 10 15

30

Phe Asp Val
18

<210> 73

35

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<221> Artificial

<222> 1-17

45 <223> Secuencia de CDR variante

<400> 73

50 Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn Asp Lys Thr Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val
17

55

<210> 74

<211> 17

60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

ES 2 301 254 T3

<400> 74

5 **Tyr Pro His Tyr Tyr Val Glu Glu Thr Glu Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

Asp Val
 17

10

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Artificial

20

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

25

<400> 75

30 **Tyr Pro His Tyr Tyr Glu Lys Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

Asp Val
 17

35

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

40

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Artificial

45

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 76

50

Tyr Pro His Tyr Tyr Ser His Glu Arg Val Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

55

Asp Val
 17

<210> 77

60

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

<221> Artificial

ES 2 301 254 T3

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

5 <400> 77

Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Asp Glu Arg Glu Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

10

Asp Val
17

15 <210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<221> Artificial

<222> 1-17

25 <223> Secuencia de CDR variante

<400> 78

30

Tyr Pro His Tyr Tyr Ala His Glu Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

35

Asp Val
17

<210> 79

<211> 17

40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

50

<400> 79

55

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

60

Asp Val
17

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

65

<213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

<220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 5 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 80

 10 **Tyr Pro His Tyr Tyr Gln His Asp Arg Thr Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 15 17

 <210> 81
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <221> Artificial
 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 30 <400> 81

 Tyr Pro His Tyr Tyr Val Thr Asp Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 35
 Asp Val
 17

 40 <210> 82
 <211> 17
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 50 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 82
 55
 Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Arg Asp Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

 60 **Asp Val**
 17

 <210> 83
 65 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

<222> 1-17

5 <223> Secuencia de CDR variante

<400> 83

10 Tyr Pro His Tyr Tyr Ser His Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

```

15      Asp Val
          17

```

<210> 84

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

25 <221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

30 <400> 84

25 Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Asn Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val
17

40 $\langle 210 \rangle$ 85

<211> 17

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

50 $\langle 222 \rangle$ 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 85

55 Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

60 Asp Val
 17

<210> 86

65 $\langle 211 \rangle$ 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

<220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 5 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 86

 10 **Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Thr Asp His Lys Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

 Asp Val
 15 17

 <210> 87
 <211> 18
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-18
 <223> Secuencia de CDR variante
 25
 30 <400> 87

 Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Gly Lys Lys Ser His Trp Tyr
 35 1 5 10 15

 Phe Asp Val
 18
 40
 <210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> Artificial
 50 <222> 1-17
 <223> Secuencia de CDR variante

 <400> 88
 55
 Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Arg Asp Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

 60 **Asp Val**
 17

 <210> 89
 65 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

<222> 1-17

5 <223> Secuencia de CDR variante

<400> 89

10 Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe
 1 5 10 15

```

15      Asp Val
          17

```

 $\langle 210 \rangle$ 90

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

25 <221> Artificial

<222> 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

30 $\langle 400 \rangle$ 90

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu His Asp Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val
17

40 $\langle 210 \rangle$ 91

<211> 17

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> Artificial

50 $\langle 222 \rangle$ 1-17

<223> Secuencia de CDR variante

<400> 91

55
Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Ser Asp Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

60 Asp Val
 17

<210> 92

65 $\langle 211 \rangle$ 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 301 254 T3

<220>
 <221> Artificial
 <222> 1-17
 5 <223> Secuencia de CDR variante

<400> 92

10 **Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe**
 1 5 10 15

15 **Asp Val**
 17

<210> 93
 20 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-45
 30 <223> oligo de mutagénesis

<400> 93

35 taccgcact attatgtgaa cgagcggaag agccactggc atttc 45

<210> 94
 40 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> Artificial
 <222> 1-110
 50 <223> dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado

55

60

65

ES 2 301 254 T3

<400> 94

```

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

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

15     Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
      35              40              45

20     Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
      50              55              60

25     Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
      65              70              75

30     Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
      80              85              90

35     Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
      95              100             105

      Ile Lys Arg Thr Val
      110

```

<210> 95

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Artificial

<222> 1-110

<223> dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado

ES 2 301 254 T3

<400> 95

```

5      Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
      1              5              10              15

10     Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser
              20              25              30

15     Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
              35              40              45

20     Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
              50              55              60

25     Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
              65              70              75

30     Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
              80              85              90

35     Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
              95              100             105

40     Ile Lys Arg Thr Val
              110

```

```

35     <210> 96
      <211> 118
      <212> PRT
40     <213> Secuencia Artificial

      <220>
      <221> Artificial
45     <222> 1-118
      <223> dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado

```

```

50     <400> 96

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

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

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

60     Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
              50              55              60

65     Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser

```

ES 2 301 254 T3

		65		70		75	
5	Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80		85		90	
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser	95		100		105	
10	Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu	110		115		118	
15	<210> 97						
	<211> 118						
	<212> PRT						
20	<213> Secuencia Artificial						
	<220>						
	<221> Artificial						
25	<222> 1-118						
	<223> dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado						
30	<400> 97						
35	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	1	5	10		15	
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr	20		25		30	
40	His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	35		40		45	
45	Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr	50		55		60	
50	Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser	65		70		75	
55	Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80		85		90	
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser	95		100		105	
60	Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu	110		115		118	
65	<210> 98						
	<211> 121						
	<212> PRT						

ES 2 301 254 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> Artificial

<222> 1-121

<223> dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado

10 <400> 98

15	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
	1 5 10 15
20	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
	20 25 30
25	Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
	35 40 45
30	Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
	50 55 60
35	Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
	65 70 75
40	Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
	80 85 90
45	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn
	95 100 105
50	Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
	110 115 120
55	Leu
	121

<210> 99

<211> 121

50 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <221> Artificial

<222> 1-121

<223> dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado

60

65

ES 2 301 254 T3

<400> 99

5	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	1 5 10 15
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr	20 25 30
10	His Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	35 40 45
15	Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr	50 55 60
20	Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser	65 70 75
	Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80 85 90
25	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn	95 100 105
30	Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr	110 115 120
35	Leu	121