



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 262 186**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97937148 .1**
86 Fecha de presentación : **06.08.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0918797**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.1999**

54 Título: **Inmunoglobulina humana reactiva con integrina $\alpha 4\beta 7$.**

30 Prioridad: **15.08.1996 US 700737**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2006

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2006

73 Titular/es: **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, Inc.**
75 Sidney Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Ponath, Paul, D.;**
Ringler, Douglas, J.;
Jones, S., Tarran;
Newman, Walter;
Saldanha, José y
Bendig, Mary, M.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 262 186 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoglobulina humana reactiva con integrina $\alpha 4\beta 7$.

5 Antecedentes

Los receptores de integrina son importantes para regular tanto la recirculación de linfocitos como su reclutamiento en los sitios de inflamación (Carlos, T.M. y Harlan, J.M., *Blood*, 84:2068-2101 (1994)). La integrina $\alpha 4\beta 7$ humana tiene varios ligandos, uno de los cuales es la adhesina vascular de mucosas MAdCAM-1 (Berlin, C. *et al.*, *Cell* 74:185-195 (1993); Erle, D.J. *et al.* *J. Immunol.* 153:517-528 (1994)), expresada en vénulas endoteliales superiores de los ganglios linfáticos mesentéricos y en las placas de Peyer (Streeter, P.R. *et al.*, *Nature* 331:41-46 (1988)). Como tal, la integrina $\alpha 4\beta 7$ actúa como receptor de guía que media en la migración de linfocitos al tejido linfoide de la mucosa intestinal (Schweighoffer, T. *et al.*, *J. Immunol.* 151:717-729 (1993)). Además, la integrina $\alpha 4\beta 7$ interacciona con la fibronectina y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1).

La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD, por sus siglas en inglés), tal como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, por ejemplo, puede ser una enfermedad debilitante y progresiva que implique inflamación del tracto gastrointestinal. Afectando a una cantidad estimada de dos millones de personas tan sólo en los Estados Unidos, los síntomas incluyen dolor abdominal, calambres, diarrea y hemorragia rectal. Los tratamientos para la IBD han incluido fármacos antiinflamatorios (tales como corticosteroides y sulfasalazina), fármacos inmunosupresores (tales como 6-mercaptopurina, ciclosporina y azatioprina) y cirugía (tal como colectomía). Podolsky, *New Engl. J. Med.*, 325:928-937 (1991) y Podolsky, *New Engl. J. Med.*, 325:1008-1016 (1991).

Los anticuerpos frente a la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, tales como el anticuerpo monoclonal murino (Acm Act-1), interfieren con la integrina $\alpha 4\beta 7$ que se une a la molécula de adhesión celular de adhesina mucosal-1 (MAdCAM-1) presente en las vénulas endoteliales superiores situadas en los ganglios linfáticos de las mucosas. Act-1 fue originalmente aislada por Lazarovits, A.I. *et al.*, *J. Immunol.* 133:1857-1862 (1984), de ratones inmunizados con linfocitos T humanos específicos para el toxoide del tétanos y se dijo que era un anticuerpo IgG1/ κ de ratón. Un análisis más reciente del anticuerpo por Schweighoffer, T. *et al.*, *J. Immunol.* 151:717-729 (1993), demostró que puede unirse a un subgrupo de linfocitos T CD4+ de memoria humanos, que expresan selectivamente la integrina $\alpha 4\beta 7$. Sin embargo, un grave problema con la utilización de anticuerpos murinos para aplicaciones terapéuticas en humanos es que son altamente inmunogénicos en humanos e inducen rápidamente una respuesta de anticuerpos humanos anti-murinos (HAMA, por sus siglas en inglés), que reduce la eficacia del anticuerpo de ratón en pacientes y puede impedir una administración continuada. La respuesta HAMA da lugar a un rápido aclaramiento del anticuerpo murino, limitando gravemente cualquier beneficio terapéutico. Por lo tanto, se necesitan mejores aproximaciones terapéuticas a las enfermedades inflamatorias del intestino.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$, inmunoglobulina que comprende una región de unión a antígeno, de origen no humano, (por ejemplo, de roedor), y al menos una porción de una inmunoglobulina de origen humano (por ejemplo, una región de marco humana, una región constante humana del tipo gamma). En una realización, la inmunoglobulina humanizada aquí descrita puede competir con Act-1 murina o LDP-02 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4) por la unión a la integrina $\alpha 4\beta 7$. En una realización preferida, la región de unión al antígeno de la inmunoglobulina humanizada deriva de anticuerpo monoclonal Act-1 (por ejemplo, LDP-02, una inmunoglobulina que comprende las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas mostradas en la Figura 11 (SEC ID No: 19) y en la Figura 12 (SEC ID No: 21), respectivamente).

Por ejemplo, la inmunoglobulina humanizada puede consistir en una región de unión a antígeno que comprende una región determinante de complementariedad (RDC), de origen no humano, y una región de marco (RM) derivada de una región de marco humana. En un aspecto, la inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ comprende una cadena ligera, que comprende una RDC derivada de un anticuerpo, de origen no humano, que se une a $\alpha 4\beta 7$ y una RM derivada de una cadena ligera de origen humano (por ejemplo, GM607'CL), y una cadena pesada, que comprende una RDC derivada de un anticuerpo, de origen no humano, que se une a $\alpha 4\beta 7$ y una RM derivada de una cadena pesada de origen humano (por ejemplo, 21/28'CL). En otro aspecto, la cadena ligera comprende tres RDC derivadas de la cadena ligera del anticuerpo Act-1 y la cadena pesada comprende tres RDC derivadas de la cadena pesada del anticuerpo Act-1.

La presente invención se refiere también a cadenas ligeras de inmunoglobulinas humanizadas (por ejemplo, que comprenden RDC1, RDC2 y RDC3 de la cadena ligera del anticuerpo Act-1 y una RM de cadena ligera humana) y a cadenas pesadas de inmunoglobulinas humanizadas (por ejemplo, que comprenden RDC1, RDC2 y RDC3 de la cadena pesada del anticuerpo Act-1 y una RM de cadena pesada humana). En una realización preferida, la invención se refiere a cadenas pesadas y ligeras humanizadas aquí descritas (por ejemplo, una cadena ligera humanizada que comprende la región variable de la cadena ligera mostrada en la Figura 7 (SEC ID No: 12), una cadena pesada humanizada que comprende la región variable de la cadena pesada mostrada en la Figura 9 (SEC ID No: 15), una cadena ligera humanizada que comprende la región variable de la cadena ligera mostrada en la Figura 12 (SEC ID No: 21), una cadena pesada humanizada que comprende la región variable de la cadena pesada mostrada en la Figura 11 (SEC ID No: 19)). También se incluyen inmunoglobulinas humanizadas que comprenden una o más cadenas ligeras y/o pesadas humanizadas.

La invención se refiere además a ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia que codifica una inmunoglobulina humanizada de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo de una sola cadena), así como a ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia que codifica una cadena ligera (por ejemplo, SEC ID No: 20) a una cadena pesada (por ejemplo, SEC ID No: 18) de una inmunoglobulina humanizada de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención proporciona un gen fusionado codificante de una cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina humanizada, que comprende una primera secuencia de ácido nucleico, codificante de una región de unión a antígeno derivada del anticuerpo monoclonal murino Act-1; y una segunda secuencia de ácido nucleico, codificante de al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina de origen humano.

La presente invención se refiere también a un constructo, que comprende un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ o por una cadena de dicha inmunoglobulina. Por ejemplo, se proporciona un vector de expresión que comprende un gen fusionado codificante de una cadena ligera de una inmunoglobulina humanizada, que comprende una secuencia nucleotídica codificante de una RDC derivada de una cadena ligera de un anticuerpo no humano, que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$, y una región de marco derivada de una cadena ligera de origen humano. Un vector de expresión que comprende un gen fusionado codificante de una cadena pesada de una inmunoglobulina humanizada, que comprende una secuencia nucleotídica codificante de una RDC derivada de una cadena pesada de un anticuerpo no humano, que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$, y una región de marco derivada de una cadena pesada de origen humano, es otro ejemplo de dicho constructo.

La presente invención se refiere también a una célula hospedante que comprende un ácido nucleico de la presente invención, que incluye uno, o más constructos que comprenden un ácido nucleico de la presente invención. En una realización, la invención se refiere a una célula hospedante que tiene un primer ácido nucleico, recombinante, codificante de una cadena ligera de una inmunoglobulina humanizada, y un segundo ácido nucleico, recombinante, codificante de una cadena pesada de una inmunoglobulina humanizada, cuyo primer ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica codificante de una RDC derivada de la cadena ligera del anticuerpo murino Act-1 y una región de marco derivada de una cadena ligera de origen humano, y cuyo segundo ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica codificante de una RDC derivada de la cadena pesada del anticuerpo murino Act-1 y una región de marco derivada de una cadena pesada de origen humano.

La presente invención proporciona también un método de preparación de una inmunoglobulina humanizada, que comprende mantener una célula hospedante de la presente invención en condiciones apropiadas para la expresión de una inmunoglobulina humanizada, mediante lo cual se expresa una cadena(s) de una inmunoglobulina humanizada y se produce una inmunoglobulina humanizada. El método puede constar también de la etapa de aislamiento de la inmunoglobulina humanizada.

Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención pueden ser menos inmunogénicas que sus contrapartidas murinas u otras no humanas. Por lo tanto, las inmunoglobulinas humanizadas aquí descritas pueden ser usadas como agentes terapéuticos en humanos, por ejemplo para controlar la direccionalización de linfocitos al tejido linfoide de las mucosas, reduciendo así las respuestas inflamatorias en el intestino.

La invención se refiere además a una inmunoglobulina humanizada de la presente invención para uso en diagnóstico o terapia (incluida la profilaxis). En una realización, la invención se refiere a una inmunoglobulina humanizada de la presente invención para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la infiltración leucocitaria en los tejidos, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluidas enfermedades que se asocian a la infiltración leucocitaria del tracto gastrointestinal (incluyendo el endotelio asociado al intestino), de otros tejidos mucosales o de tejidos que expresan la molécula MAdCAM-1. En una realización particularmente preferida, la invención se refiere a una inmunoglobulina humanizada de la presente invención para uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), tal como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una inmunoglobulina humanizada de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a la infiltración leucocitaria de tejidos, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluidas las enfermedades que se asocian a la infiltración leucocitaria del tracto intestinal, de otros tejidos mucosales o de tejidos que expresan la molécula MAdCAM-1. En una realización particularmente preferida, la invención se refiere al uso de una inmunoglobulina humanizada de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), tal como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una ilustración de una secuencia de ADN consenso (SEC ID No: 1) y de la secuencia deducida de aminoácidos (SEC ID No: 2), que comprende la región variable determinada a partir de varios clones independientes de la región variable de la cadena pesada de ratón.

La Figura 2 es una ilustración de una secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 3) y de la secuencia deducida de aminoácidos (SEC ID No: 4), que comprende una porción de la secuencia de la región variable determinada a partir de un clon independiente de la región variable de la cadena pesada de ratón, denominado H2B#34.

ES 2 262 186 T3

La Figura 3 es una ilustración de una secuencia nucleotídica (SEC ID No: 5) y de la secuencia deducida de aminoácidos (SEC ID No: 6), que comprende la región variable de varios clones independientes de la región variable de la cadena ligera de ratón. Se indica la posición de dos mutaciones hechas para introducir un sitio Kasi para clonación.

5 La Figura 4A es un gráfico de fluorescencia que ilustra la capacidad del Acm Act-1 murino y de un anticuerpo control irrelevante de ratón de isotipo parejo (MOPC 21, IgG1, kappa) para teñir células HuT 78 que expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$.

10 La Figura 4B es un gráfico de fluorescencia que ilustra la capacidad de (i) anticuerpo Act-1 quimérico, (ii) un anticuerpo control irrelevante humano de isotipo parejo (IgG1, kappa) y (iii) un sobrenadante de células COS-7, para teñir células HuT 78 que expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$.

15 La Figura 5 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de Act-1 de ratón ("Act-1.vl") (SEC ID No: 7) y de la región variable de la cadena ligera de GM 607'CL humana (SEC ID No: 8). Los aminoácidos idénticos están indicados por una línea vertical y los aminoácidos similares están indicados por cuatro o dos puntos, dependiendo del grado de similitud. Las RDC están entre paréntesis y marcadas y los restos están numerados secuencialmente.

20 La Figura 6 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del Act-1 de ratón ("Act-1.vh") (SEC ID No: 9) y de la región variable de la cadena pesada 21/28'CL humana (SEC ID No: 10). Los aminoácidos idénticos están indicados por una línea vertical y los aminoácidos similares están indicados por cuatro o dos puntos, dependiendo del grado de similitud. Las RDC están entre paréntesis y marcadas y los restos están numerados secuencialmente.

25 La Figura 7 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 11) y de la secuencia deducida de aminoácidos (SEC ID No: 12) de la región variable de la cadena ligera del Act-1 de ratón unida a la secuencia del péptido señal de la cadena ligera del Act-1 de ratón.

30 La Figura 8 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 13) y de la secuencia de aminoácidos (SEC ID No: 8) de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo humano GM607'CL maduro.

35 La Figura 9 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos y de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo Act-1 de ratón. La secuencia de nucleótidos de la región variable se une a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia deducida del péptido señal de la cadena pesada del Act-1 de ratón, para obtener una secuencia compuesta (SEC ID No: 14 y 15). (La identidad del cebador que amplificaba la región de la cadena pesada fue deducida a partir de la secuencia degenerada, y una secuencia de aminoácidos para el péptido señal fue derivada a partir del cebador, secuencia corriente abajo y secuencias de otros péptidos señal. El péptido señal mostrado puede no ser idéntico al del hibridoma Act-1).

40 La Figura 10 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos y de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 21/28'CL humano. La secuencia de nucleótidos codificante de la región variable se une a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de péptido señal derivada de la V_H del anticuerpo humano HG3'CL (Rechavi, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 80:855-859 (1983)), para obtener una secuencia compuesta (SEC ID No: 16 y 17).

45 La Figura 11 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 18) y de la secuencia de aminoácidos (SEC ID No: 19) de una porción de la cadena pesada de un anticuerpo Act-1 humanizado (LDP-02) con un péptido señal de cadena pesada.

50 La Figura 12 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 20) y de la secuencia de aminoácidos (SEC ID No: 21) de una porción de la cadena ligera de un anticuerpo Act-1 humanizado, (LDP-02) con un péptido señal de cadena ligera.

55 La Figura 13 es una ilustración de las secuencias de nucleótidos de oligonucleótidos complementarios solapantes, denominados L1-L6 (SEC ID No: 22-27), que fueron usados para hacer la cadena ligera de una inmunoglobulina Act-1 humanizada (LDP-02), y las secuencias de nucleótidos de oligonucleótidos complementarios solapantes, denominados H1-H10 (SEC ID No: 28-37), que fueron usados para hacer la cadena pesada de la inmunoglobulina Act-1 humanizada.

60 La Figura 14 es un gráfico de fluorescencia que ilustra la tinción de células HuT 78 usando, una inmunoglobulina quimérica Act-1 murina-humana, una inmunoglobulina Act-1 humanizada o un anticuerpo control irrelevante que se corresponde al isotipo humano (IgG1, kappa).

65 La Figura 15 es un gráfico que ilustra los resultados de una titulación de Act-1 murino y Act-1 humanizado (LDP-02/3A9/LOTE#1, Ejemplo 4) biotinilados, llevada a cabo por citometría de flujo en células Hut-78.

La Figura 16 es un gráfico que ilustra la inhibición competitiva de la unión de Act-1 murino biotinilado por Act-1 murino a una inmunoglobulina Act-1 humanizada (LDP-02/3A9/LOTE#1, Ejemplo 4), en comparación con IgG1 humana o IgG1 murina control.

La Figura 17 es un gráfico que ilustra los resultados de un ensayo de liberación de ⁵¹Cr para la lisis celular mediada por complemento de células mononucleares de sangre periférica humana en presencia de (a) CAMPATH-1H, (b) CAMPATH-1G, (c) IgG1 humana, (d) LDP-02/3A9/Lote#1 (Ejemplo 4) a (e) LDP-01 (anti-CD18 humanizado, mutado en Fc) a concentraciones de 50, 25, 5, 2,5 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Las Figuras 18A-18B son gráficos que ilustran los resultados de un ensayo de adhesión que monitoriza la inhibición de la adhesión por Act-1 murino (Figura 18A), IgG1 murina (Figura 18A), LDP-02/3A9/Lote#1 (Figura 18B) o IgG1 humana (Figura 18B) de células portadoras de $\alpha 4\beta 7$ (RPMI 8866) y una quimera MAdCAM-1-Ig humana (inmunoadhesina).

La Figura 19 es un gráfico que muestra la tinción de células HuT 78 usando (a) LDP-02 (mutado en Fc), (b) un derivado de LDP-02 (mutado en Fc) que tiene una mutación en la cadena ligera (MV4) más una doble mutación en la cadena pesada (R38K, A4OR), o (c) un anticuerpo control irrelevante que se corresponde al isotipo humano (IgG1, kappa).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$, que comprende una región de unión a antígeno, de origen no humano, y al menos una porción de una inmunoglobulina de origen humano. Preferiblemente, las inmunoglobulinas humanizadas pueden unirse a la integrina $\alpha 4\beta 7$ con una afinidad de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , preferiblemente de al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} y, más preferiblemente, de al menos aproximadamente 10^9 M^{-1} . En una realización, la inmunoglobulina humanizada incluye una región de unión a antígeno, de origen no humano, que se une a la integrina $\alpha 4\beta 7$ y una región constante derivada de una región constante humana. En otra realización, la inmunoglobulina humanizada que se une a $\alpha 4\beta 7$ comprende una región determinante de la complementariedad, de origen no humano, y una región de marco variable de origen humano y, eventualmente, una región constante de origen humano. Por ejemplo, la inmunoglobulina humanizada puede consistir en una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena ligera incluye una región determinante de la complementariedad derivada de un anticuerpo de origen no humano, que se une a la integrina $\alpha 4\beta 7$, y una región de marco derivada de una cadena ligera de origen humano, y la cadena pesada incluye una región determinante de la complementariedad derivada de un anticuerpo, de origen no humano, que se une a la integrina $\alpha 4\beta 7$ y una región de marco derivada de una cadena pesada de origen humano.

La presente invención se refiere también a una cadena ligera de una inmunoglobulina humanizada o una cadena pesada de una inmunoglobulina humanizada. En una realización, la invención se refiere a una cadena ligera humanizada que incluye una RDC de cadena ligera (es decir, una o más RDC), de origen no humano, y una región de marco de cadena ligera humana. En otra realización, la presente invención se refiere a una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye una RDC de cadena pesada (es decir, una o más RDC), de origen no humano, y una región de marco de cadena pesada humana. Las RDC pueden derivar de una inmunoglobulina no humana.

Las inmunoglobulinas de origen natural tienen una estructura nuclear común en la que dos cadenas ligeras idénticas (aproximadamente 24 kD) y dos cadenas pesadas idénticas (aproximadamente 55 o 70 kD) forman un tetrámero. La porción amino-terminal de cada cadena es conocida como la región variable (V) y puede ser distinguida de las regiones constantes (C) más conservadas del resto de cada cadena. En la región variable de la cadena ligera hay una porción C-terminal conocida como la región J. Dentro de la región variable de la cadena pesada, hay una región D, además de la región J. La mayor parte de la variación de la secuencia de aminoácidos en las inmunoglobulinas está confinada a tres localizaciones separadas en las regiones V, conocidas como regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (RDC), que están directamente implicadas en la unión a antígeno. Procediendo desde el extremo amino, estas regiones son denominadas RDC1, RDC2 y RDC3, respectivamente. Las RDC son mantenidas en su sitio por regiones de marco (RM) más conservadas. Procediendo desde el extremo amino, estas regiones son denominadas RM1, RM2, RM3 y RM4, respectivamente. Kabat *et al.* han definido las localizaciones de las regiones RDC y RM y un sistema de numeración (Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU. (1991); véanse también las Tablas 3 y 4).

Se puede dividir a las inmunoglobulinas humanas en clases y subclases, dependiendo del isotipo de la cadena pesada. Las clases incluyen IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, en donde las cadenas pesadas son del tipo gamma (γ), mu (μ) alfa (α), delta (δ) o épsilon (ϵ), respectivamente. Las subclases incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, en donde las cadenas pesadas son del tipo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\alpha 1$ y $\alpha 2$, respectivamente. Las moléculas de inmunoglobulina humano de una clase o subclase seleccionadas pueden contener una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ). Véanse, por ejemplo, *Cellular and Molecular Immunology*, Wonsiewicz, M. J., Ed., Capítulo 45, pp. 41-50, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA (1991); Nisonoff, A., *Introduction to Molecular Immunology*, 28 Ed., Capítulo 4, pp. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984).

El término "inmunoglobulina", tal como se utiliza aquí, incluye anticuerpos completos y fragmentos biológicamente funcionales de los mismos. Dichos fragmentos biológicamente funcionales retienen al menos una función de unión a antígeno de un correspondiente anticuerpo de longitud total (por ejemplo, especificidad para $\alpha 4\beta 7$ del anticuerpo Act-1) y, preferiblemente, retienen la capacidad de inhibir la interacción de $\alpha 4\beta 7$ con uno o más de sus ligandos (por ejemplo, MAdCAM-1, fibronectina). En una realización particularmente preferida, los fragmentos bio-

lógicamente funcionales pueden inhibir la unión de $\alpha 4\beta 7$ a la adhesina de mucosas (MAdCAM-1). Como ejemplos de fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales que pueden ser utilizados se incluyen fragmentos capaces de unirse a una integrina $\alpha 4\beta 7$, tales como anticuerpos de una sola cadena, fragmentos Fv, Fab, Fab', y F(ab'). Dichos fragmentos pueden ser producidos por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, se puede usar la escisión con papaína o pepsina para generar fragmentos Fab o F(ab')₂, respectivamente. También se pueden producir anticuerpos en una variedad de formas truncadas, utilizando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de parada corriente arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, se puede diseñar un gen quimérico codificante de la cadena pesada de un fragmento F(ab')₂ de forma que incluya secuencias de ADN codificantes del dominio CH₁ y de la región bisagra de la cadena pesada.

El término "inmunoglobulina humanizada", tal como se utiliza aquí, se refiere a una inmunoglobulina que comprende porciones de inmunoglobulinas de diferente origen, donde al menos una porción es de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones derivadas de una inmunoglobulina de origen no humano, con la necesaria especificidad, tal como un ratón, y de secuencias de inmunoglobulina de origen humano (por ejemplo, inmunoglobulina quimérica), unidas entre sí químicamente por técnicas convencionales (por ejemplo, sintéticas) o preparadas como un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, se puede expresar ADN codificante de las porciones proteicas del anticuerpo quimérico para producir una cadena de polipéptido contigua). Otro ejemplo de inmunoglobulina humanizada de la presente invención es una inmunoglobulina que contiene una o más cadenas de inmunoglobulina que incluyen una RDC derivada de un anticuerpo, de origen no humano, y una región de marco derivada de una cadena ligera y/o pesada de origen humano (por ejemplo, anticuerpos con injertos de RDC, con o sin cambios de marco). Los anticuerpos de una sola cadena quiméricas o con injertos de RDC están también incluidos en el término inmunoglobulina humanizada. Véanse, por ejemplo, Cabilly *et al.*, Patente EE.UU. No 4,816,567; Cabilly *et al.*, Patente Europea No 0,125,023 B1; Bass *et al.*, Patente EE.UU. No 4,816,397; Boss *et al.*, Patente Europea NO 0,120,694 B1; Neuberger, M.S. *et al.*, WO 86/01533; Neuberger, M.S. *et al.*, Patente Europea No 0,194,276 B1; Winter, Patente EE.UU. No 5,225,539; Winter, Patente Europea No 0,239,400 B1; Padlan, E.A. *et al.*, Solicitud de Patente Europea No 0,519,596 A1. Véanse también Ladner *et al.*, Patente EE.UU. No 4,946,778; Huston, Patente EE.UU. No 5,476,786, y Bird, R.E. *et al.*, *Science*, 242:423-426 (1988), en cuanto a anticuerpos de una sola cadena.

La región de unión a antígeno de la inmunoglobulina humanizada (la porción no humana) puede derivar de una inmunoglobulina, de origen no humano, (a la que se hace referencia como inmunoglobulina donante) que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$. Por ejemplo, una región adecuada de unión a antígeno puede derivar del anticuerpo monoclonal murino Act-1 (Lazarovits, A.I. *et al.*, *J. Immunol.*, 133(4):1857-1862 (1984); véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1-3). Otras fuentes incluyen anticuerpos específicos para la integrina $\alpha 4\beta 7$ obtenidos de fuentes no humanas, tales como roedor (por ejemplo, ratón, rata), conejo, cerdo, cabra o primate no humano. Se pueden preparar otros anticuerpos policlonales o monoclonales, tales como anticuerpos que se unen al mismo epitopo o similar que el anticuerpo Act-1 (por ejemplo, Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495-497 (1975); Harlow *et al.*, 1988; *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY), y *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2 (Suplemento 27, Verano de 1994), Ausubel *et al.*, Eds. (John Wiley & Sons: New York, NY), Capítulo 11 (1991)).

Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos frente a un inmunógeno apropiado en un mamífero adecuado (por ejemplo, un ratón, rata, conejo u oveja). Células portadoras de $\alpha 4\beta 7$, fracciones de membrana que contienen $\alpha 4\beta 7$, fragmentos inmunogénicos $\alpha 4\beta 7$, un péptido $\beta 7$ conjugado a un vehículo adecuado, son ejemplos de inmunógenos adecuados. Se pueden aislar células productoras de anticuerpo (por ejemplo, un linfocito) de, por ejemplo, los ganglios linfáticos o el bazo de un animal inmunizado. Las células pueden ser entonces fusionadas a una célula inmortalizada adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma), formando así un hibridoma. Las células fusionadas pueden ser aisladas empleando técnicas de cultivo selectivo. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden ser seleccionadas por medio de un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA). Las inmunoglobulinas de origen no humano que tienen especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ pueden ser también obtenidas a partir de colecciones de anticuerpos (por ejemplo, una colección de fagos que contiene moléculas de Fab no humano).

En una realización, la región de unión a antígeno de la inmunoglobulina humanizada comprende una RDC de origen no humano. En esta realización, la inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ contiene al menos una RDC de origen no humano. Por ejemplo, las RDC pueden derivar de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas de origen no humano, de tal manera que una inmunoglobulina humanizada incluye sustancialmente RDC1, RDC2 y/o RDC3 de cadena pesada y RDC1, RDC2 y/o RDC3 de cadena ligera, de una o más inmunoglobulinas, de origen no humano, y la inmunoglobulina humanizada resultante tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$. Preferiblemente, las tres RDC de una cadena seleccionada son sustancialmente las mismas que las RDC de la cadena correspondiente de un donante y, más preferiblemente, las tres RDC de las cadenas ligeras y pesadas son sustancialmente las mismas que las RDC de la cadena donante correspondiente.

La porción de la inmunoglobulina humanizada o la cadena de inmunoglobulina que tiene origen humano (la porción humana) puede derivar de cualquier inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina humana adecuada. Por ejemplo, una región constante humana o porción de la misma, si está presente, puede derivar de las cadenas ligeras κ o λ , y/o las cadenas pesadas γ (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ , α (por ejemplo, $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ o ϵ de anticuerpos humanos, incluyendo las variantes alélicas. Se puede seleccionar una región constante particular (por ejemplo, IgG1), variante o porciones de la misma con objeto de adaptar la función efectora. Por ejemplo, se puede incorporar una región constante mutada (variante) a una proteína de fusión para minimizar la unión a los receptores Fc y/o la capacidad para fijar el

complemento (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3; véanse también Winter *et al.*, GB 2,209,757 B; Morrison *et al.*, WO 89/07142; Morgan *et al.*, WO 94/29351, 22 de Diciembre de 1994).

Si están presentes, las regiones de marco humanas (por ejemplo, de la región variable de la cadena ligera) derivan preferiblemente de una región variable de anticuerpo humano que tiene similitud de secuencia con la región análoga o equivalente (por ejemplo, región variable de cadena ligera) del donante de la región de unión a antígeno. Otras fuentes de regiones de marco para porciones de origen humano de una inmunoglobulina humanizada incluyen las secuencias consenso variables humanas (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2; véanse también Kettleborough, C.A. *et al.*, *Protein Engineering* 4:773-783 (1991); Carter *et al.*, WO 94/04679, publicada el 3 de Marzo de 1994). Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo o región variable usada para obtener la porción no humana puede ser comparada con secuencias humanas, según se describe en Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de las EE.UU. (1991). En una realización particularmente preferida, las regiones de marco de una cadena de inmunoglobulina humanizada derivan de una región variable humana que tiene al menos aproximadamente un 65% de identidad global de secuencia y, preferiblemente, al menos aproximadamente un 70% de identidad global de secuencia, con la región variable del donante no humano (por ejemplo, anticuerpo Act-1 de ratón). Una porción humana puede también derivar de un anticuerpo humano que tiene al menos aproximadamente un 65% de identidad de secuencia y, preferiblemente, al menos aproximadamente un 70% de identidad de secuencia, dentro de la porción particular (por ejemplo, RM) que se está utilizando, cuando se compara con la porción equivalente (por ejemplo, RM) del donante no humano. Por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 2, la identidad global de secuencia entre las regiones variables de las cadenas ligeras de Act-1 de ratón y GM607'CL humano era de un 71,4%, y la identidad global de secuencia entre las regiones variables de las cadenas pesadas de Act-1 de ratón y 21/28'CL humano era de un 68,1%.

En una realización, la inmunoglobulina humanizada comprende al menos una de las regiones de marco (RM) derivadas de una o más cadenas de un anticuerpo de origen humano. Por lo tanto, la RM puede incluir una RM1 y/o RM2 y/o RM3 y/o RM4 derivadas de uno o más anticuerpos de origen humano. Preferiblemente, la porción humana de una cadena humanizada seleccionada incluye RM1, RM2, RM3 y RM4 derivadas de una región variable de origen humano (por ejemplo, de una cadena de inmunoglobulina humana, de una secuencia consenso humana).

Las porciones de inmunoglobulina de origen no humano y humano para uso en la presente invención tienen secuencias idénticas a las inmunoglobulinas o porciones de inmunoglobulinas de las que se derivan o a variantes de las mismas. Dichas variantes incluyen mutantes que difieren por la adición, supresión o sustitución de uno o más restos. Tal como se ha indicado antes, las RDC, de origen no humano, son sustancialmente las mismas que en el donante no humano y, preferiblemente, son idénticas a las RDC del donante no humano. Tal como se describe en el Ejemplo 2, se pueden hacer cambios en la región de marco, tales como los que sustituyen a un resto de la región de marco de origen humano con un resto de la posición correspondiente del donante. Se pueden hacer una a más mutaciones en la región de marco, incluyendo supresiones, inserciones y sustituciones de uno o más aminoácidos. Se describen varias de tales sustituciones en el diseño de un anticuerpo Act-1 humanizado en el Ejemplo 2. Para un anticuerpo o cadena humanizados seleccionados, se pueden diseñar mutaciones de marco como se describe aquí. Preferiblemente, las inmunoglobulinas humanizadas pueden unirse a la integrina $\alpha 4\beta 7$ con una afinidad similar a, o mejor que, la del donante no humano. Se pueden producir variantes por una variedad de métodos adecuados, incluyendo la mutagénesis de cadenas donantes no humanos o humanos aceptoras.

Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención tienen especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ e incluyen inmunoglobulinas humanizadas (incluidos fragmentos) que pueden unirse a determinantes de las cadenas $\alpha 4$ y/o $\beta 7$ del heterodímero. En una realización preferida, la inmunoglobulina humanizada de la presente invención tiene al menos una función característica del anticuerpo Act-1 murino, tal como la función de unión (por ejemplo, con especificidad por la integrina $\alpha 4\beta 7$, con la misma o similar especificidad epitópica), y/o la función inhibitoria (por ejemplo, la capacidad de inhibir la adhesión dependiente de $\alpha 4\beta 7$ *in vitro* y/o *in vivo*, tal como la capacidad de inhibir la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM-1 *in vitro* y/o *in vivo*, o la capacidad de inhibir la unión de una célula portadora de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a un ligando de la misma (por ejemplo, una célula portadora de MAdCAM-1)). Así, las inmunoglobulinas humanizadas preferidas pueden tener la especificidad de unión del anticuerpo Act-1 murino, la especificidad epitópica del anticuerpo Act-1 murino (por ejemplo, puede competir con el Act-1 murino, un anticuerpo Act-1 quimérico (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1) o un Act-1 humanizado (por ejemplo, LDP-02) por la unión a $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, sobre una célula portadora de la integrina $\alpha 4\beta 7$)) y/o función inhibitoria.

La función de unión de una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ puede ser detectada por métodos inmunológicos estándar, por ejemplo utilizando ensayos que monitorizan la formación de un complejo entre la inmunoglobulina humanizada y la integrina $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, una fracción de membrana que contiene la integrina $\alpha 4\beta 7$, sobre una célula portadora de la integrina $\alpha 4\beta 7$, tal como un linfocito humano (por ejemplo, un linfocito del subgrupo CD4+ $\alpha 4^{\text{hi}}$, $\beta 1^{10}$), una línea celular de linfocitos humanos o una célula hospedante recombinante que comprende ácido nucleico codificante de $\alpha 4$ y/o $\beta 7$, que expresa la integrina $\alpha 4\beta 7$).

Se pueden emplear ensayos de unión y/o adhesión u otros métodos adecuados en los procedimientos para la identificación y/o aislamiento de inmunoglobulinas humanizadas (por ejemplo, a partir de una colección) con la especificidad requerida (por ejemplo, un ensayo que monitorice la adhesión entre una célula portadora de una integrina $\alpha 4\beta 7$ y un ligando de la misma (por ejemplo, una segunda célula que expresa MAdCAM, una quimera MAdCAM-Ig (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4) u otros métodos adecuados).

Las porciones de inmunoglobulinas de origen no humano y humano para uso en la presente invención incluyen cadenas ligeras, cadenas pesadas y porciones de cadenas ligeras y pesadas. Estas porciones de inmunoglobulinas pueden ser obtenidas o derivar de inmunoglobulinas (por ejemplo, por síntesis de novo de una porción), o se pueden producir y expresar ácidos nucleicos codificantes de una inmunoglobulina o cadena de la misma que tiene la propiedad deseada (por ejemplo, que se une a la integrina $\alpha 4\beta 7$, que tiene similitud de secuencia). Se pueden producir inmunoglobulinas humanizadas que contienen las porciones deseadas (por ejemplo, región de unión a antígeno, RDC, RM, región C) de origen humano y no humano usando ácidos nucleicos sintéticos y/o recombinantes para preparar genes (por ejemplo, ADNc) codificantes de la cadena humanizada deseada. Para preparar una porción de una cadena, se pueden introducir uno o más codones de parada en la posición deseada. Por ejemplo, se pueden construir secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) codificantes de regiones variables humanizadas de nuevo diseño, usando métodos de mutagénesis por PCR para alterar las secuencias existentes de ADN (véase, por ejemplo, Kamman, M. *et al.*, Nucl. Acids Res. 17:5404 (1989)). Se pueden hibridar cebadores de RCP codificantes de las nuevas RDC a un molde de ADN de una región variable previamente humanizada que se basa en la misma región variable humana, o muy similar (Sata, K. *et al.*, Cancer Research 53:851-856 (1993)). Si no se dispone de una secuencia de ADN similar para uso como molde, se puede construir un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante de una secuencia de región variable a partir de oligonucleótidos sintéticos (véase, por ejemplo, Kalbinger, F., Protein Engineering 8:971-980 (1993)). También se puede incorporar una secuencia codificante de un péptido señal en el ácido nucleico (por ejemplo, en la síntesis, en la inserción en un vector). Si no se dispone de la secuencia del péptido señal natural, se puede usar una secuencia de péptido señal de otro anticuerpo (véase, por ejemplo, Kettleborough, C.A., *Protein Engineering* 4:773-783 (1991)). Utilizando estos métodos, los métodos aquí descritos u otros métodos adecuados, se pueden producir fácilmente variantes (véase, por ejemplo, el Ejemplo 5). En una realización, se pueden mutagenizar regiones variables clonadas (por ejemplo, de LDP-02) y se pueden seleccionar secuencias codificantes de variantes con la especificidad deseada (por ejemplo, a partir de una colección de fagos; véase, por ejemplo, Krebber y col, EE.UU. 5,514,548; Haagenbaam *et al.*, WO 93/06213, publicada el 1 de Abril de 1993)).

Ácidos nucleicos y constructos que los contienen

La presente invención se refiere también a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes (incluyendo, por ejemplo, esencialmente puros) que contienen secuencias que codifican una globulina humanizada o una cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina humanizada de la presente invención.

Los ácidos nucleicos a los que se hace aquí referencia como “aislados” son ácidos nucleicos que han sido separados de los ácidos nucleicos del ADN genómico o del ARN celular de su fuente de origen (por ejemplo, tal como existe en las células o en una mezcla de ácidos nucleicos, tal como una colección) e incluyen ácidos nucleicos obtenidos por los métodos aquí descritos o por otros métodos adecuados, incluyendo ácidos nucleicos esencialmente puros, ácidos nucleicos producidos por síntesis química, por combinaciones de métodos biológicos y químicos y ácidos nucleicos recombinantes aislados (véase por ejemplo, Daugherty, B.L. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A.P. y J.S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)).

Los ácidos nucleicos a los que se hace aquí referencia como “recombinantes” son ácidos nucleicos que han sido producidos por metodología de ADN recombinante, incluyendo aquellos ácidos nucleicos que son generados por procedimientos que se basan en un método de recombinación artificial, tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y/o clonación en un vector usando enzimas de restricción. Los ácidos nucleicos “recombinantes” son también aquellos que resultan de sucesos de recombinación que se producen a través de los mecanismos naturales de las células, pero que son seleccionados después de la introducción en las células de ácidos nucleicos diseñados para permitir y hacer probable un suceso recombinatorio deseado.

La presente invención también se refiere más específicamente a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una inmunoglobulina Act-1 humanizada (es decir, una inmunoglobulina humanizada de la presente invención en la que la porción no humana deriva del anticuerpo monoclonal murino Act-1) o cadena del mismo. En una realización, la cadena ligera comprende regiones derivadas de la cadena ligera del anticuerpo Act-1, y la cadena pesada comprende tres regiones determinantes de complementariedad derivadas de la cadena ligera del anticuerpo Act-1. Dichos ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina Act-1 humanizada (por ejemplo, la región variable de la cadena pesada de la Figura 11 (SEC ID NO:19), la región variable de la cadena pesada de la Figura 9 (SEC ID NO:15)), (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la región variable de una inmunoglobulina Act-1 humanizada (por ejemplo, la región variable de la cadena ligera de la Figura 12 (SEC ID NO:21), la región variable de la cadena ligera de la Figura 7 (SEC ID NO:12)), (c) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica al menos una porción funcional de la región variable de la cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina Act-1 humanizada (por ejemplo, una porción suficiente para la unión a antígeno de una inmunoglobulina humanizada que contiene dicha cadena). Debido a la degeneración del código genético se puede hacer una gama de ácidos nucleicos que codifiquen un polipéptido seleccionado. En una realización el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la región variable que se indica o sustancialmente como se indica, en la Figura 11 (SEC ID NO:18), o que se indica, o sustancialmente como se indica en la Figura 12 (SEC ID NO:20), incluyendo polinucleótidos de cadena doble o sencilla. (Aunque varias figuras pueden ilustrar polipéptidos que son mayores que la región variable (es decir, que incluyen una secuencia codificante de péptido se-

ñal o una porción de una secuencia codificante de región constante), la referencia a la región variable de una figura particular pretende incluir la porción de región variable de la secuencia mostrada). Los ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que cumplen estos criterios pueden incluir ácidos nucleicos codificantes de secuencias idénticas a las secuencias del anticuerpo Act-1 humanizado o variantes de las mismas según se ha discutido anteriormente.

5

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser usados en la producción de inmunoglobulinas humanizadas que tengan especificidad por la integrina $\alpha 4\beta 7$. Por ejemplo, se puede incorporar un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) codificante de una inmunoglobulina humanizada de la presente invención en un constructo adecuado (por ejemplo, un vector) para posterior manipulación de secuencias o para la producción del polipéptido codificado en células hospedantes adecuadas.

10

Método de producción de inmunoglobulinas humanizadas que tienen especificidad por la integrina $\alpha 4\beta 7$

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de preparación de una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$. La inmunoglobulina humanizada puede ser obtenida, por ejemplo, por expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes codificantes de una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ en una célula hospedante adecuada, por ejemplo.

15

También se proporcionan constructos o vectores de expresión adecuados para la expresión de una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$. Los constructos pueden ser introducidos en una célula hospedante adecuada y se pueden producir y mantener en cultivo células que expresan una inmunoglobulina humanizada de la presente invención. Las células hospedantes adecuadas pueden ser procarióticas, incluyendo células bacterianas tales como *E. coli*, *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas, o eucarióticas, tales como células fúngicas o de levaduras, por ejemplo, *Pichia pastoris*, especies de *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*, u otras células eucarióticas inferiores, y células de eucariotas superiores tales como las de insectos (por ejemplo, células Sf9 de insectos (WO 94/26087, O'Connor, publicada el 24 de Noviembre de 1994)) o de mamíferos (por ejemplo, células COS, células NSO, SP2/0, células de ovario de hámster chino (CHO), células HuT 78, células 293). (Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons Inc., (1993)).

20

Se pueden producir células hospedantes que producen una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ como sigue. Por ejemplo, se puede insertar un ácido nucleico codificante de toda o de una parte de la secuencia codificante de la inmunoglobulina humanizada deseada en un vector de ácido nucleico, por ejemplo un vector de ADN, tal como un plásmido, virus u otro replicón adecuado para expresión. Se dispone de una gama de vectores, incluyendo vectores que se mantienen en copia simple o copia múltiple, o que se integran en el cromosoma de la célula hospedante.

25

Los vectores adecuados de expresión pueden contener una serie de componentes, incluyendo aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: un origen de replicación; un gen marcador seleccionable; uno o más elementos de control de la expresión, tales como un elemento de control transcripcional (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un finalizador) y/o una o más señales de traducción; una secuencia de señal o secuencia líder para la direccionalización a membrana o la secreción. En un constructo se puede disponer de una secuencia de señal por el vector u otra fuente. Por ejemplo, se pueden usar las señales de transcripción y/o traducción de una inmunoglobulina para dirigir la expresión.

30

Se puede facilitar un promotor para expresión en una célula hospedante adecuada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, se puede unir de forma operable a un promotor a un ácido nucleico codificante de una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina humanizada, de tal modo que dirija la expresión del polipéptido codificado. Se dispone de una gama de promotores adecuados para hospedadores procarióticos (por ejemplo, promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*) y eucarióticos (por ejemplo, alcohol deshidrogenasa de levadura (ADH1), SV40, CMV).

35

Además, los vectores de expresión contienen típicamente un marcador seleccionable para selección de células hospedantes portadoras del vector y, en el caso de un vector de expresión replicable, un origen de replicación. Los genes codificantes de productos que confieren resistencia a antibióticos o a fármacos son marcadores seleccionables comunes y pueden ser usados en células procarióticas (por ejemplo, gen β -lactamasa (resistencia a ampicilina), gen *Tet* para resistencia a tetraciclina) y eucarióticas (por ejemplo, genes de resistencia a neomicina (G418 o genética), gpt (ácido micofenólico, ampicilina, o higromicina). Los genes marcadores de la dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una gama de hospedadores. Los genes codificantes del producto génico de marcadores auxotróficos del hospedador (por ejemplo, *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) son frecuentemente empleados como marcadores seleccionables en levaduras. Se contempla también el uso de vectores víricos (por ejemplo, baculovirus) o de fago y los vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula hospedante, tales como los vectores retrovíricos. La presente invención se refiere también a células portadoras de estos vectores de expresión.

40

Por ejemplo, se puede introducir un ácido nucleico (es decir, uno o más ácidos nucleicos) codificante de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina humanizada que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$, o un constructo (es decir, uno o más constructos) que comprendan dicho(s) ácido(s) nucleico(s) en una célula hospedante adecuada mediante un método apropiado para la célula hospedante seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), de tal forma que el(los) ácido(s) nucleico(s) se una(n) operablemente a uno

45

o más elementos de control de la expresión (por ejemplo, en un vector, en un constructo creado por los procesos celulares, integrado en el genoma de la célula hospedante). Las células hospedantes pueden ser mantenidas en condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de inductor, medios adecuados enriquecidos con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibiótico, suplementos nutricionales, etc.), mediante las cuales se produce(n) el(los) polipéptido(s) codificado(s). Si se desea, se puede aislar la proteína codificada (por ejemplo, anticuerpo Act-1 humanizado) (por ejemplo, de las células hospedantes, del medio, de la leche). Este procedimiento incluye la expresión en una célula hospedante de un animal transgénico (véase, por ejemplo, WO 92/03918, GenPharm International, publicada el 19 de Marzo de 1992).

Se pueden producir proteínas de fusión en las que una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina humanizada se une a un resto no inmunoglobulina (es decir, un resto que no aparece en las inmunoglobulinas tal como se encuentran en la naturaleza) en una localización N-terminal, en una localización C-terminal o interna a la proteína de fusión. Por ejemplo se pueden producir algunas realizaciones por inserción de un ácido nucleico codificante de secuencias de inmunoglobulinas en un vector de expresión adecuado, tal como un vector pET (por ejemplo, pET-15b, Novagen), un vector de fago (por ejemplo, pCANTAB 5 E, Pharmacia), u otro vector (por ejemplo, el vector de fusión pRIT2T Proteína A, Pharmacia). El constructo resultante puede ser introducido en una célula hospedante adecuada para expresión. Después de la expresión se pueden aislar o purificar algunas proteínas de fusión de un lisado celular por medio de una matriz de afinidad adecuada (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. *et al.*, eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16,4,1-16,7,8 (1991)).

Métodos y composiciones terapéuticos

La presente invención proporciona inmunoglobulinas humanizadas que (1) se pueden unir a la integrina $\alpha 4\beta 7$ *in vitro* y/o *in vivo*; y/o (2) pueden modular una actividad y/o función de la integrina $\alpha 4\beta 7$, tal como (a) la función de unión (por ejemplo, la capacidad de la integrina $\alpha 4\beta 7$ para unirse a MAdCAM-1, fibronectina y/o VCAM-1) y/o (b) la función de infiltración leucocitaria, incluyendo el reclutamiento y/o la acumulación de leucocitos en los tejidos (por ejemplo, la capacidad de inhibir la migración linfocitaria al tejido de la mucosa intestinal). Preferiblemente, las inmunoglobulinas humanizadas son capaces de unirse selectivamente a $\alpha 4\beta 7$ *in vitro* y/o *in vivo*, y de inhibir las interacciones mediadas por $\alpha 4\beta 7$. En una realización, una inmunoglobulina humanizada puede unirse a una integrina $\alpha 4\beta 7$, y puede inhibir la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a uno o más de sus ligandos (por ejemplo, MAdCAM-1, VCAM-1, fibronectina), inhibiendo así la infiltración leucocitaria de los tejidos (incluyendo el reclutamiento y/o la acumulación de leucocitos en los tejidos), preferiblemente de forma selectiva. Dichas inmunoglobulinas pueden inhibir la adhesión celular de las células portadoras de una integrina $\alpha 4\beta 7$ a las células endoteliales vasculares en los tejidos mucosales, incluyendo los tejidos asociados al intestino, los órganos linfoides o los leucocitos (especialmente linfocitos tales como las células T o B) *in vitro* y/o *in vivo*. En una realización particularmente preferida, una inmunoglobulina humanizada (por ejemplo, Act-1) puede inhibir la interacción de $\alpha 4\beta 7$ con MAdCAM-1 y/o fibronectina.

Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención son útiles en una gama de procedimientos con aplicaciones en investigación, diagnóstico y terapia. Por ejemplo, pueden ser usadas para detectar, aislar y/o purificar la integrina $\alpha 4\beta 7$ o sus variantes (por ejemplo, por purificación por afinidad u otros métodos adecuados) y para estudiar la estructura (por ejemplo, la conformación) y la función de la integrina $\alpha 4\beta 7$.

Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención también pueden ser usadas en aplicaciones diagnósticas (por ejemplo, *in vitro*, *ex vivo*) o para modular la función de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en aplicaciones terapéuticas (incluyendo las profilácticas).

Por ejemplo, las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención pueden ser usadas para detectar y/o medir el nivel de integrina $\alpha 4\beta 7$ en una muestra (por ejemplo, tejidos o fluidos corporales, tales como un exudado inflamatorio, sangre, suero, fluidos intestinal, sobre células portadoras de una integrina $\alpha 4\beta 7$). Por ejemplo, se puede obtener una muestra (por ejemplo, tejido y/o fluido corporal) de un individuo y se puede utilizar un método inmunológico adecuado para detectar y/o medir la expresión de integrina $\alpha 4\beta 7$, incluyendo métodos tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), incluyendo ensayos de quimioluminiscencia, radioinmunoensayo e inmunohistoquímica. En una realización, se proporciona un método de detección de una integrina $\alpha 4\beta 7$ seleccionada en una muestra, que comprende poner en contacto una muestra con una inmunoglobulina humanizada de la presente invención en condiciones adecuadas para la unión específica de la inmunoglobulina humanizada a la integrina $\alpha 4\beta 7$ y la detección de los complejos anticuerpo-integrina $\alpha 4\beta 7$ formados. En una aplicación del método, se pueden usar inmunoglobulinas humanizadas para analizar tejidos normales frente a tejidos inflamados (por ejemplo, de un humano) en cuanto a la reactividad y/o la expresión de integrinas $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, inmunohistológicamente), para detectar asociaciones entre EII u otras condiciones y una mayor expresión de $\alpha 4\beta 7$ (por ejemplo, en tejidos afectados). Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención permiten métodos inmunológicos de valoración de la presencia de integrina $\alpha 4\beta 7$ en tejidos normales frente a tejidos inflamados, a través de los cuales se puede valorar la presencia de la enfermedad, el progreso de la enfermedad y/o la eficacia de la terapia anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ en la enfermedad inflamatoria.

Las inmunoglobulinas humanizadas de la presente invención pueden ser también usadas para modular (por ejemplo, inhibir (reducir o prevenir)) la función de unión y/o la función de infiltración leucocitaria (por ejemplo, linfocitaria, monocitaria) de la integrina $\alpha 4\beta 7$. Por ejemplo, se pueden administrar inmunoglobulinas humanizadas que inhiben la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a un ligando (es decir, uno o más ligandos) según el método en el tratamiento de enfermedades asociadas a la infiltración leucocitaria (por ejemplo, linfocitaria, monocitaria) de tejidos (incluyendo

el reclutamiento /o la acumulación de leucocitos en los tejidos), particularmente de tejidos que expresan la molécula MAdCAM. Se administra una cantidad efectiva de una inmunoglobulina humanizada de la presente invención (es decir, una o más) a un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano u otro primate) con objeto de tratar dicha enfermedad. Por ejemplo, se pueden tratar enfermedades inflamatorias, incluidas las enfermedades que se asocian a la infiltración leucocitaria del tracto gastrointestinal (incluyendo el endotelio asociado al intestino), otros tejidos mucosales o tejidos que expresan la molécula MAdCAM (por ejemplo, tejidos asociados al intestino, tales como vénulas de la lámina propia del intestino delgado y grueso, y glándula mamaria (por ejemplo, glándula mamaria en lactancia), según el presente método. De forma similar, un individuo que tiene una enfermedad asociada a la infiltración leucocitaria de tejidos como resultado de la unión a células (por ejemplo, células endoteliales) que expresan MAdCAM-1, puede ser tratado de acuerdo con la presente invención.

En una realización particularmente preferida, como enfermedades que pueden ser tratadas de acuerdo con esto se incluyen la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), tal como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, ileítis, enfermedad celíaca, esprúe no tropical, enteropatía asociada a artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagínosa, gastroenteritis eosinofílica o saculitis producida tras proctocolectomía y anastomosis ileoanal.

La pancreatitis y la diabetes mellitus insulino-dependiente y otras enfermedades pueden ser tratadas usando el presente método. Se ha descrito que la MAdCAM-1 es expresada por algunos vasos en el páncreas exocrino de ratones NOD (diabéticos no obesos), así como de ratones BALB/c y SJL. Se ha descrito que la expresión de MAdCAM-1 era inducida en el endotelio de los islotes inflamados del páncreas del ratón NOD, y MAdCAM-1 era la adhesina predominante expresada por el endotelio de islotes NOD en las etapas tempranas de la insulinitis (Hanninen, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)). Además, se observó la acumulación de linfocitos que expresan $\alpha 4\beta 7$ en los islotes, y se implicó a la MAdCAM-1 en la unión de células de linfoma a través de $\alpha 4\beta 7$ a los vasos de islotes inflamados (Hanninen, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)).

Como ejemplos de enfermedades inflamatorias asociadas a tejidos mucosales que pueden ser tratadas según el presente método se incluyen mastitis (glándula mamaria), colecistitis, colangitis o pericolangitis (conducto biliar y tejido circundante del hígado), bronquitis crónica, sinusitis crónica, asma y rechazo del hospedante por el injerto (por ejemplo, en el tracto gastrointestinal). Como se observa en la enfermedad de Crohn, la inflamación se extiende frecuentemente más allá de la superficie de la mucosa, por lo que se pueden tratar las enfermedades inflamatorias crónicas del pulmón que dan lugar a fibrosis intersticial, tales como la pneumonitis por hipersensibilidad, las enfermedades del colágeno, la sarcoidosis y otras condiciones idiopáticas.

La inmunoglobulina humanizada es administrada en una cantidad eficaz que inhibe la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a un ligando de la misma. Para la terapia, una cantidad efectiva será suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado (incluido el profiláctico) (tal como una cantidad suficiente para reducir o evitar la unión y/o la señalización mediadas por la integrina $\alpha 4\beta 7$, inhibiendo así la adhesión e infiltración leucocitaria y/o las respuestas celulares asociadas). La inmunoglobulina humanizada puede ser administrada en una sola dosis o en dosis múltiples. La dosificación puede ser determinada por métodos conocidos en la técnica y puede depender, por ejemplo, de la edad del individuo, la sensibilidad, la tolerancia y el estado general. Las dosificaciones adecuadas para los anticuerpos pueden ser de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10,0 mg/kg de peso corporal por tratamiento.

Según el método, se puede administrar la inmunoglobulina humanizada a un individuo (por ejemplo, un humano) sola o junto con otro agente. Se puede administrar una inmunoglobulina humanizada antes, junto con o a continuación de la administración del agente adicional. En una realización, se administra más de una inmunoglobulina humanizada que inhibe la unión de integrina $\alpha 4\beta 7$ a sus ligandos. En otra realización, se administra un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo anti-MAdCAM-1, anti-VCAM-1 o anti-ICAM-1, que inhibe la unión de leucocitos a un ligando endotelial, además de una inmunoglobulina humanizada de la presente invención. En aún otra realización, se puede administrar un componente adicional farmacológicamente activo (por ejemplo, un compuesto antiinflamatorio, tal como sulfasalazina, otro compuesto antiinflamatorio no esteroideo o un compuesto antiinflamatorio esteroideo) junto con una inmunoglobulina humanizada de la presente invención.

Son posibles diversas vías de administración, incluyendo, aunque sin limitarse necesariamente a ellas, la parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea), oral (por ejemplo, dietética), tópica, inhalatoria (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, gotas intranasales), o rectal, dependiendo de la enfermedad o de la condición que haya que tratar. La administración parenteral es un modo preferido de administración.

La formulación variará según la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión). Se puede preparar una composición apropiada, que contiene el anticuerpo humanizado que ha de ser administrado en un vehículo o portador fisiológicamente aceptable. Para soluciones o emulsiones, como vehículos adecuados se incluyen, por ejemplo, soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluida la solución salina y los medios tamponados. Como vehículos parenterales se pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato Ringer o aceites fijos. Como vehículos intravenosos se pueden incluir varios aditivos, conservantes o reponedores de fluidos, nutrientes o electrólitos (véase, en general, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª edición, Mack Publishing Co., PA, 1985). Para inhalación, el compuesto puede ser solubilizado y cargado en un dispensador adecuado para administración (por ejemplo, un atomizador, nebulizador o dispensador de aerosol presurizado).

Ejemplificación

La presente invención será ahora ilustrada mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes en modo alguno.

5 Como se describe en el Ejemplo 1, se purificó el anticuerpo murino Act-1 y se realizó el análisis de la secuencia del anticuerpo. Se clonaron por PCR y secuenciaron los ADNc codificantes de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa (V_L) del Act-1 fue también determinada por secuenciación de proteínas y se vio que se correspondía exactamente con la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de ADN del gen V_L . La mayor parte de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) ha sido determinada por la secuencia proteica y esta secuencia se corresponde también con la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de ADN del gen V_H . Estos resultados indican que las regiones variables correctas del Act-1 de ratón eran clonadas a partir de la línea celular de hibridoma. Se produjeron anticuerpos Act-1 quiméricos funcionales que confirmaron que se habían clonado las secuencias correctas. Concretamente, se unieron los ADN codificantes de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del Act-1 de ratón a ADN codificantes de las regiones constantes de la cadena ligera kappa humana y de las cadenas pesadas gamma-1 o gamma-4 humanas, respectivamente. También se utilizó el anticuerpo quimérico en un análisis comparativo con un Acm Act-1 humanizado (Acm Act-1 LDP-02 reformado).

20 Para crear un anticuerpo Act-1 humanizado que se une bien a la integrina $\alpha 4\beta 7$, se diseñaron regiones variables humanas reformadas (Ejemplo 2). Con objeto de ayudar en el procedimiento de diseño, se construyó un modelo molecular de las regiones variables del Act-1 de ratón. Las regiones del anticuerpo Act-1 murino directamente implicadas en la unión al antígeno, las regiones determinantes de complementariedad o RDC, fueron injertadas en regiones variables humanas seleccionadas. Se hicieron unos pocos cambios dentro de las regiones de marco (RM) de las regiones variables humanas. Las regiones variables reformadas del Act-1 humano incluían un único cambio de aminoácido en las RM de la región variable de la cadena ligera humana seleccionada y cinco cambios de aminoácidos en las RM de la región variable de la cadena pesada humana seleccionada, cada uno de los cuales cambiaba el resto humano original al correspondiente resto murino.

30 Tal como se describe en el Ejemplo 3, se construyeron secuencias de ADN codificantes de estas regiones variables del Act-1 humano reformadas y se unieron a secuencias de ADN codificantes de regiones constantes humanas, y se utilizaron los ácidos nucleicos resultantes para producir inmunoglobulina Act-1 humanizada. El anticuerpo Act-1 humanizado fue expresado en células de mamífero (Ejemplo 3), y estudiado en cuanto a la unión a la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana y en comparación con el anticuerpo Act-1 de ratón (Ejemplo 4). Tal como se muestra en la Tabla 5, el anticuerpo Act-1 humanizado retenía especificidad por el epitopo reconocido por el Act-1 murino y mostraba afinidad de unión inesperadamente mejor en comparación con el anticuerpo murino nativo.

35 Se identificaron varias variantes del anticuerpo Act-1 humanizado en el procedimiento de diseño (Ejemplos 2 y 5). Por ejemplo, se hicieron cambios adicionales en una o más de las siguientes posiciones: mutante de cadena ligera M4V (mutación Met \rightarrow Val en la posición 4), mutante de cadena pesada R38K (mutación Arg \rightarrow Lys en la posición 38), mutante de cadena pesada A40R (mutación Ala \rightarrow Arg en la posición 40). Además, se encontró un mutante de cadena pesada I73T (retromutación Ile \rightarrow Th en la posición 73), que restauraba la posición 73 al resto de treonina humana, en esta posición en la región de marco humana. Se puede llevar a cabo la introducción de uno o más de estos cambios en una sola cadena o varias combinaciones de estos cambios en más de una cadena.

Ejemplo 1

Clonación de las regiones V_H y V_L de Act-1, y construcción y expresión de una inmunoglobulina quimérica Act-1 murina-humana

50 *Clonación de las regiones V_H y V_L de Act-1*

Se obtuvo ARN de células de hibridoma productoras de anticuerpo monoclonal Act-1 (Lazarovits, A.I. *et al.*, *J. Immunol.*, 133(4): 1857-1862 (1984); suministradas por A.I. Lazarovits y R.B. Colvin)) usando Reactivo TRIzol (Gibco/BRL) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Se amplificaron las regiones variables de cadena pesada y ligera transcritas por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando un estuche Ig-Prime (Novagen) según el protocolo sugerido por el fabricante. Para explicarlo brevemente, se hizo una transcripción inversa de 1,5 μ g ARN total a ADNc en una reacción que contenía 2,0 μ l de tampón 5X MMLV (5X = Tris-HCl 250 mM, pH 8,3 a 25°C, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 1,0 μ l de DTT (ditiotreitól) 100 mM, 0,5 μ l de mezcla de dNTP 10 mM (10 mM de cada de dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0,5 μ l de oligo dT (1 μ g/ μ l), 0,25 μ l de BSA acetilada (4 mg/ml), 1,0 μ l de cebador Ig-3' apropiado (10 pmol/ μ l), 0,5 μ l de Transcriptasa Inversa MMLV (200 unidades/ μ l) y agua libre de RNasa añadida hasta un volumen total de 10 μ l. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 37°C, 30 minutos a 42°C, y 5 minutos a 99°C. Cada cebador-Ig-3' se utilizó en una reacción aparte.

65 Se amplificaron las regiones variables a partir del material inversamente transcrito según el protocolo del fabricante. Resumiendo, se mezclaron 8 μ l del material inversamente transcrito con 4 μ l de dNTPs 2,5 mM, 5 μ l de tampón de reacción 10X (10X = Tris-HCl 100 mM, pH 8,8 a 25°C, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, 1% de Triton X-100), 2,5 μ l

ES 2 262 186 T3

de cebador líder Ig-5' (10 pmol/ μ l) (cada cebador líder Ig-5' fue usado en una reacción PCR aparte), 0,25 μ l (1,25 unidades) de ADN polimerasa AmpliTaq® (Perkin-Elmer), y agua hasta un volumen total de 50 μ l.

5 Para las ampliificaciones con los cebadores 5' MuIgV_H5' -A, MuIgV_H5' -B, MuIgKV_L5' -A, y MuIgKV_L5' -B, los parámetros de ciclo eran 35 ciclos de 1 minuto, 94°C; 1 minuto, 50°C; 2 minutos, 72°C; seguidos de una extensión final de 6 minutos a 72°C. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción para los demás cebadores 5', excepto por la temperatura de reasociación, que se elevó a 60°C.

10 La región variable de cadena pesada fue exitosamente amplificada usando MuIgGV_H3'-2 o MuIgMV_H3'-1 como cebador 3', y MuIgV_H5'-B o MuIgV_H5'-E como cebadores 5'. La región variable de la cadena ligera fue exitosamente amplificada usando MuIgKV_L3'-1 como cebador 3' y MuIgKV_L5'-G como cebador 5'.

Las secuencias de estos cebadores son como se indica a continuación:

15

MuIgGV_H3'-2 (SEC ID N°: 56):

5'-CCC AAG CTT CCA GGG RCC ARK GGA TAR ACI GRT
GG

20

MuIgMV_H3'-1 (SEC ID N°: 57):

5'-CCC AAG CTT ACG AGG GGG AAG ACA TTT GGG AA

25

MuIgV_H5'-B (SEC ID N°: 58):

5'-GGG AAT TCA TGR AAT GSA SCT GGG TYW TYC TCT
T

30

MuIgV_H5'-E (SEC ID N°: 59):

5'-ACT AGT CGA CAT GAA GWT GTG GBT RAA CTG GRT

MuIgKV_L3'-1 (SEC ID N°: 60):

5'-CCC AAG CTT ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA

35

MuIgKV_L5'-G (SEC ID N°: 61):

5'-ACT AGT CGA CAT GGA TTT WCA RGT GCA GAT TWT
CAG CTT

40

Los fragmentos amplificados fueron purificados por gel de agarosa y ligados en el vector pT7Blue T (Novagen) suministrado con el kit Ig-Prime, y se utilizó la mezcla de ligación para transformar células competentes NovaBlue facilitadas con el kit, según el protocolo del fabricante.

45

Se secuenciaron las colonias blancas que contenían insertos del tamaño apropiado usando cebador del promotor T7 y cebador U-19mero, que reasocian en lados opuestos del inserto, justo fuera del sitio de policlonación del vector pT7Blue. Se realizó la secuenciación sobre ADN miniprep usando un kit de ADN polimerasa T7 Sequenase (USB/Amersham Life Science), según el protocolo recomendado por el fabricante.

50

En la Figura 1, se muestra la secuencia de ADN de consenso (SEC ID NO:1) de varios clones de región variable de cadena pesada independientes y la secuencia deducida de aminoácidos (SEC ID NO:2). Los cebadores degenerados dieron lugar a alguna degeneración en la secuencia. El codón de iniciación es la Met codificada por los nucleótidos 13-15, el sitio predicho de escisión por peptidasa del líder está entre la Ser codificada por los nucleótidos 67-69 y la Gln codificada por los nucleótidos 70-72 (codificando los nucleótidos 13-69 el péptido líder). Se muestra una porción de la región constante murina, que empieza en la alanina codificada por los restos 433-435.

55

En la Figura 3 se muestra la secuencia de ADN (SEC ID NO:5) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO:6) de varios clones de región variable de cadena ligera independientes. A diferencia de la región variable de la cadena pesada, las secuencias amplificadas no eran degeneradas, probablemente debido a que los cebadores utilizados no eran muy degenerados y a que la región variable fue amplificada a partir de sólo un único par de cebadores.

60

Construcción de un gen quimérico de cadena pesada

65

Se produjo un gen codificante de un gen quimérico de cadena pesada murino-humano. La fuente de la región constante de cadena pesada humana era un clon que contenía una región constante gamma uno (γ 1) humana de tipo salvaje (obtenida del Dr. Herman Waldmann (Universidad de Oxford); un constructo designado 3818 que comprende el gen de cadena pesada anti-CD18 en un vector de expresión pEE6 (Celltech). La región constante corresponde a la del gen de cadena pesada CD18 humanizado clonado en pEE6.hCMV según describen Sims, M.J. *et al.*, *J. Immunol.*, 151 (4): 2296-2308 (1993) y WO 93/02191, publicada el 4 de febrero de 1993, cuyas enseñanzas son aquí cada una

ES 2 262 186 T3

incorporada a modo de referencia en su totalidad. Las secuencias codificantes de la región variable y constante de la cadena pesada (gamma uno de tipo salvaje) del anticuerpo anti-CD18 humanizado fueron liberadas del vector de expresión por digestión con HindIII y EcoRI. El fragmento de 1.421 pares de bases que contenía el gen de cadena pesada fue recuperado y subclonado en los sitios HindIII y EcoRI de pCR-Script™ (Stratagene) para dar un plásmido denominado pCR-CD18H. Un sitio de restricción SpeI se localiza en la unión entre la región variable y la región constante en el gen de la cadena pesada de anti-CD18. pCR-CD18H se digirió por restricción con HindIII y Spe I para liberar la región variable de la cadena pesada. Esta región variable se reemplazó con la región variable de Act-1 de ratón generada como sigue.

Se sintetizaron dos cebadores para incorporar nuevos sitios de restricción- Estos cebadores eran:

Cebador 5' (SEC ID N°: 41):

Hind III

5'-T[AA GCT T] CC GCC ATG GGA TGG AGC

Cebador 3' (SEC ID N°: 42):

Spe I

5'-GGT GAC [ACT AGT] GCC TTG ACC CCA G

Las negrillas indican los nucleótidos en los cebadores que difieren de la secuencia del molde. Se utilizó un clon independiente de cadena pesada del Act-1 de ratón denominado H2B#34, con la secuencia nucleotídica (SEC ID NO:3) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO:4) presentada en la Figura 2, como molde con los anteriores cebadores 5' y 3' para amplificar una región variable de ratón introduciendo concomitantemente un sitio HindIII 5' del codón de iniciación y un sitio Spe I justo 3' de la región J. El fragmento de PCR se subclonó directamente en pCR-Script™ dando lugar al plásmido pCR-mACT1HV, y se confirmó la secuencia correcta. Se liberó entonces el fragmento a partir de pCR-mACT1HV por digestión con HindIII y Spe I, y se insertó en los sitios HindIII y Spe I de pCR-CD18H en lugar de la región variable anti-CD18 para dar pCR-mhACT1Hchi. Se liberó entonces el gen quimérico de cadena pesada (variable de Act-1 de ratón más constante de gamma uno humana) a partir de pCR-mhACT1Hchi con HindIII y EcoRI y se retroclonó en el vector pEE6hCMV-B, que contenía el promotor hCMV, para dar un constructo denominado pEE6mhACT1Hchi.

35 Construcción de un gen quimérico de cadena ligera

Se construyó un gen de cadena ligera murino-humano de una forma similar a la cadena pesada. Sin embargo, en el caso de la cadena ligera quimérica, se incluyó por ingeniería un nuevo sitio de restricción, Kas I, en el constructo por amplificación por PCR de un fragmento de región variable, utilizando uno de los clones de región variable de cadena ligera del Act-1 de ratón, denominado KG#87 como molde, y por amplificación por PCR de una región constante de cadena ligera kappa usando un constructo que contenía un gen de cadena ligera kappa anti-CD18 humanizada como molde (obtenido del Dr. Herman Waldmann (Universidad de Oxford); constructo denominado 3819 que contiene una cadena ligera anti-CD18 humanizada en el vector de expresión pEE12). La región constante corresponde a la del gen de cadena ligera CD18 humanizada clonado en pEE12 según describen Sims, M.J. *et al.*, *J. Immunol.*, 151 (4): 2296-2308 (1993) y WO 93/02191, publicada el 4 de febrero de 1993.

Los cebadores para la región variable eran:

Cebador 5' (SEC ID N°: 43):

HindIII

5'-T[AA GCT T]CC GCC ATG AAG TTG CCT

Cebador 3' (SEC ID N°: 44):

Kas I

5'-[GGC GCC] GCA TCA GCC CGT TTT

Las negrillas indican nucleótidos en el cebador que difieren de los del molde. Los dos cambios de nucleótidos en la región codificante, T → G en la posición 423 y A → G en la posición 426 en la Figura 3, para crear el sitio Kas I son silenciosas y no cambian la secuencia de aminoácidos.

Los cebadores para la región constante kappa eran:

65

ES 2 262 186 T3

Cebador 5' (SEC ID N°: 45):

Kas I

5'-C[GG CGC C]AT CTG TCT TCA TC

Cebador 3' (SEC ID N°: 46):

HindIII

5' - [AAG CTT] CTA ACA CTC TCC

Las regiones variables y constantes de la cadena ligera fueron amplificadas por separado con respectivos moldes y cebadores, y los productos de PCR fueron individualmente subclonados en pCR-Script™ para confirmar la secuencia. Cada fragmento fue entonces liberado del vector por digestión con HindIII y KasI, purificado en gel y triplemente ligado en el sitio HindIII del vector de expresión 3819 pEE12, del que se había separado el gen de cadena ligera anti-CD18 humanizado por digestión con HindIII. El constructo resultante se denomina pEE12mhACT1Lchi.

Expresión de una inmunoglobulina quimérica

Para la construcción de un vector de expresión que contiene genes de cadenas quiméricas tanto ligeras como pesadas, se liberó todo el gen de cadena pesada más el promotor CMV del vector de expresión pEE6 (pEE6mhACT1Hchi) por digestión con BglII y BamHI. Este fragmento fue entonces ligado en el sitio BamHI del vector de expresión del gen de cadena ligera pEE12 (pEE12mhACT1Lchi) dando lugar a un plásmido simple denominado pEE12mhLHchi, que contiene tanto el gen de cadena ligera quimérica como el gen de cadena pesada quimérica, cada uno bajo el control de un promotor CMV independiente.

Los vectores de expresión pEE6hCMV-B y pEE12 y el sistema de amplificación génica de la glutamina sintetasa Celltech han sido descritos previamente (véanse, por ejemplo, WO 86/05807 (Celltech), WO 87/04462 (Celltech), WO 89/01036 (Celltech), EP 0 323 997 B1 (Celltech), y WO 89/10404 (Celltech).

Para la expresión transitoria del anticuerpo quimérico, se transfectaron 20 µg de pEE12mhLHchi en células COS-7 (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852) por electroporación como se indica a continuación. Se recogieron células COS-7 que crecían en fase logarítmica de matraces de cultivo de tejidos por tratamiento con tripsina-EDTA. Las células fueron lavadas una vez en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y una vez con solución de sales equilibrada de Hank (HBSS), y resuspendidas a una concentración de 1,5 x 10⁷ células por ml de HBSS. Se mezclaron 1,2 x 10⁷ células en 0,8 ml de HBSS con 20 µg del ADN plasmídico y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de ADN/células se transfirió entonces a una cubeta de electroporación de 0,4 cm y se aplicó corriente a 250 V, 960 µF con un Gene-Pulser Bio-Rad. Después de una incubación post-electroporación de 10 minutos a temperatura ambiente, se transfirieron las células a 20 ml de medio de cultivo (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) más 10% de FCS) y se cultivaron en un matraz de cultivo de tejidos de 162 cm² (Costar). Al cabo de 5 días, se recogió el sobrenadante del cultivo de células y se estudió en cuanto a la capacidad para teñir células HuT 78, que expresan la integrina α4β7. Las células HuT 78 (una línea de linfoma de células T humanas) pueden obtenerse de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, N° de Acceso ATCC TIB 161.

Se incubaron 100 µl de sobrenadante de cultivo de células COS-7 con simulacro de transfección, anticuerpo Act-1 murino purificado (10 µg/ml), o los anticuerpos control irrelevantes de isotipo pareja purificados respectivos para ratón (IgG1 de ratón, Kappa (MOPC21), 10 µg/ml de Sigma) y para humano (IgG1 humana, Kappa, 10 µg/ml de Sigma) con 1 X 10⁵ células HuT 78 sobre hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con tampón enfriado en hielo consistente en PBS que contenía 2% de suero de ternera fetal (FCS) y 0,01% de azida sódica (tampón FACS). Las células fueron entonces incubadas durante 30 minutos en hielo con el anticuerpo secundario fluorescente apropiado (bien el fragmento F(ab')₂ de IgG(H+L) de cabra anti-ratón AffiniPure conjugado a fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch) o bien el fragmento F(ab')₂ de IgG(H+L) de cabra anti-humano AffiniPure conjugado a fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch)). Después de 30 minutos sobre hielo, las células fueron lavadas dos veces con tampón FACS, resuspendidas en 300 µl del mismo tampón, y analizadas por citometría de flujo en un FACScan Becton Dickinson. La Figura 4A muestra la tinción del Act-1 murino en comparación con un anticuerpo control irrelevante de ratón de isotipo pareja, MOPC 21 (IgG1, kappa). La Figura 4B muestra la tinción con anticuerpo Act-1 quimérico de células HuT 78 en comparación con un anticuerpo control irrelevante humano de isotipo pareja (IgG1, kappa), y el sobrenadante de células COS-7 con simulacro de transfección. De este modo, en comparación con la tinción producida por el anticuerpo Act-1 murino, el anticuerpo quimérico teñía las células HuT 78 de forma similar. En conjunto, estos datos demuestran que las secuencias apropiadas para las regiones variables del Act-1 de ratón eran clonadas y expresadas con éxito.

Análisis de la secuencia de aminoácidos

Se llevó a cabo el análisis de la secuencia de aminoácidos sobre cadenas pesadas y ligeras de Act-1 murino purificado para confirmar las identidades de los ADNc para las regiones variables de cadena ligera y pesada aisladas del hibridoma. Se llevó a cabo para la cadena ligera como sigue:

ES 2 262 186 T3

Se redujo Act-1 murino (5 mg/ml) con DTT 2 mM durante 2 horas a 37°C en borato de sodio 0,3 M, cloruro de sodio 0,15 M bajo nitrógeno. Se hizo entonces la solución 10 mM en yodoacetamida y se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. El análisis SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes confirmó que las proteínas eran reducidas cuantitativamente. La solución de proteínas fue entonces dializada de forma extensiva en PBS y se aplicó una alícuota a una columna Superdex 75 (16/60, Pharmacia) (vuelta 1). La cadena pesada y la ligera coeluyeron de esta columna con un volumen de elución correspondiente al del volumen de exclusión, lo que indica que las dos cadenas aún se mantenían juntas. Se hizo entonces otra alícuota 8 M en urea y se llevó a una columna Superdex 75 en condiciones desnaturizantes (urea 6M) (vuelta 2). Ambas cadenas coeluyeron una vez más en el volumen de vacío, probablemente debido al desplegamiento. El análisis SDS-PAGE confirmó la presencia de ambas cadenas en las dos muestras eluidas de las 2 vueltas de filtración por el gel. Estas muestras fueron sometidas a análisis de secuencia N-terminal (Commonwealth Biotechnologies, Inc.) con el siguiente resultado:

Muestra 2: DVVVTQTPLSLPVSFDGQV (SEC ID N°: 47)

Muestra 1: DVVVTQTPLSL (SEC ID N°: 48)

La secuencia que se obtuvo corresponde al extremo N de la cadena ligera madura deducida de la secuencia de ADN. Este y otros intentos de obtener la secuencia de la cadena pesada indicaron que su extremo N estaba probablemente bloqueado. Por lo tanto, el análisis de la secuencia de aminoácidos de los fragmentos peptídicos internos fue realizado sobre la cadena pesada.

Para simplificar la secuenciación de aminoácidos internos, se produjeron fragmentos F(ab)₂' del anticuerpo por escisión con pepsina. Se escindió el Act-1 murino con pepsina a una razón de anticuerpo:pepsina de 1:200 durante 2 h a 37°C en citrato de sodio 0,1 M, pH 3,0. La reacción se completó, según se valoró por análisis SDS-PAGE. La proteína fue entonces purificada a través de columnas de proteína G y proteína A. Se redujo entonces la muestra y se alquiló como se ha descrito antes y se separó el fragmento de la cadena pesada de la cadena ligera por SDS-PAGE preparatoria (15%). Se escindió el fragmento de la cadena pesada y se electroeluyó en 1 ml de SDS al 0,1% haciendo correr el tampón durante 2 horas. Se escindió esta muestra con 2 ng de Asp-N endoproteinasa durante 30 minutos y se separaron los fragmentos por SDS-PAGE (17,5%). Los productos de la digestión fueron pasivamente eluidos en Hepes 0,1 M, pH 8,0, 0,1% de SDS durante la noche y sometidos a análisis de secuencia N-terminal (Commonwealth Biotechnologies, Inc.).

La secuencia obtenida de un fragmento de 17 kDa era DYAIIDYWG (SEC ID NO:49), que estaba presente en el clon para la cadena pesada (Figura 1; la secuencia AIDY corresponde al comienzo de la región JH4).

Ejemplo 2

Modelación molecular de las regiones variables del Act-1 de ratón

Con objeto de ayudar en el diseño de las regiones variables injertadas con RDC, se produjo un modelo molecular de las regiones variables del Act-1 de ratón. La modelación de la estructura de las familias de proteínas bien caracterizadas con inmunoglobulinas fue realizada usando los métodos establecidos para modelación por homología. La modelación molecular fue llevada a cabo usando una estación de trabajo IRIS 4D de Silicon Graphics, que funcionaba bajo el sistema operativo UNIX, el paquete de modelación molecular QUANTA (Polygen Corp., Waltham, MA), y la base de datos cristalográficos Brookhaven de estructuras proteicas resueltas. Como primera etapa se modelaron las regiones de marco (RM) de las nuevas regiones variables en RM de regiones variables de inmunoglobulinas similares estructuralmente resueltas. Mientras que las cadenas laterales de aminoácidos idénticas fueron mantenidas en su orientación original, las cadenas laterales mutadas fueron sustituidas usando el procedimiento de máximo solapamiento para mantener los ángulos *chi* como en el anticuerpo Act-1. La mayor parte de las RDC de las nuevas regiones variables fueron modeladas en base a las estructuras canónicas para RDC (Chothia, C., y A.M. Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia, C., *et al.*, *Nature* 342:877-883 (1989); Tramontano, A., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 225:175-182 (1990); Chothia, C., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227:799-817 (1992)). En casos tales como RDC3 de la región variable de la cadena pesada, donde no existen estructuras canónicas reconocidas, se modeló el bucle de RDC en base a la estructura similar de bucle presente en cualquier proteína estructuralmente resuelta. Finalmente, con objeto de eliminar los contactos atómicos no favorables y de optimizar las interacciones de Van der Waals y electrostáticas, se sometió el modelo a minimización de energía usando el potencial CHARMM (Brooks, B.R., *J. Comp. Chem.* 4:187-217 (1983)) ejecutado en QUANTA.

Para las regiones variables del Act-1 de ratón, las RM de la región variable de la cadena ligera fueron modeladas sobre las RM del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal de ratón 4-4-20 (Herron, J.N., *et al.*, *Proteins. Structure, Function and Genetics* 5:271-280 (1989)). Las RM de la región variable de cadena pesada fueron modelados sobre las RM del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal de ratón D11.15 (Chitarra, V., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:7711-7715 (1993)). Las cadenas laterales de aminoácidos que diferían entre el anticuerpo Act-1 de ratón y las regiones variables sobre las que se basó el modelo estaban sustituidas. La cadena ligera del Fab del anticuerpo 4-4-20 fue entonces superpuesta a la cadena ligera de D11.15 alineando en el espacio los restos 35-39, 43-47, 84-88 y 98-102 (según definen Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno (1991)), con objeto de poner las dos regiones

variables heterólogas (es decir, la región variable de cadena ligera kappa basada en 4-4-20 y la región variable pesada basada en D11.15) en la orientación correcta una con respecto a la otra.

La RDC1 (L1) de la región variable de la cadena ligera de Acm Act-1 se ajustaba al subgrupo canónico L1 4, según propusieron Chothia, C., *et al.*, Nature 342:877-883 (1989). El bucle L1 del Fab 4-4-20 de ratón (véase lo anterior) era idéntico en cuanto a longitud de aminoácidos, similar en cuanto a secuencia de aminoácidos y también se ajustaba al subgrupo canónico 4. En consecuencia, el bucle L1 fue modelado sobre el bucle L1 de Fab 4-4-20. De forma similar, RDC2 (L2) y RDC3 (L3) de la región variable de cadena ligera del Acm Act-1 se correspondía tanto a sus respectivas estructuras de bucle del subgrupo canónico 1 como a las correspondientes RDC de Fab 4-4-20. En consecuencia, los bucles L2 y L3 de la región variable de cadena ligera kappa de Act-1 fueron modelados sobre las RDC L2 y L3 de Fab 4-4-20.

RDC1 (H1) de la región variable de cadena ligera del Acm Act-1 se ajustaba al subgrupo canónico H1 1, definido por Chothia, C., *et al.*, Nature 342:877-883 (1989), al igual que el correspondiente bucle H1 del Acm D11.15 de ratón (véase lo anterior). Más aún, el bucle de la RDC1 del Acm D11.15 era idéntico en cuanto a longitud y muy similar en cuanto a secuencia de aminoácidos a H1 del Acm Act-1. En consecuencia, como con la cadena ligera, este bucle fue modelado sobre el bucle RDC1 de la región variable pesada en la que se basaba este modelo. La RDC2 de la región variable de cadena pesada (H2) era más difícil de definir, pero parecía corresponder al subgrupo carbónico H2 2. Una vez más, el bucle H2 del anticuerpo D11.15 se correspondía también al mismo subgrupo canónico y era muy similar en secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, el bucle H2 del Acm Act-1 fue modelado sobre el bucle H2 de D11.15.

Tal como se ha discutido anteriormente, las RDC3 de las regiones variables de cadena pesada son altamente variables y no pueden dividirse en grupos estructurales identificables. Para modelar los bucles H3, se identifican los bucles de idéntica longitud y similar secuencia de aminoácidos -preferiblemente de otro anticuerpo- y se usan como base para el bucle modelado. Hubo tres bucles, todos bucles H3 de tres anticuerpos, que se correspondían con la RDC3 de Act-1 en cuanto al tamaño del bucle. Después de estudiar las tres estructuras del bucle en cuanto a discordancias estéricas en el modelo, el bucle H3 del anticuerpo humano Pot (Fan, Z.C., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 228:188-207 (1992)) fue elegido para modelar el bucle H3 del Acm Act-1. Después de ajustar todo el modelo en cuanto a discordancias estéricas obvias, fue sometido a minimización de energía, ejecutada en QUANTA.

Diseño de las regiones variables injertadas con RDC

La primera etapa en el diseño de regiones variables injertadas con RDC es la selección de las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas humanas que servirán como base de las regiones variables humanizadas. Se estudiaron y compararon dos aproximaciones para seleccionar las regiones variables humanas. En una aproximación, las regiones variables humanas fueron seleccionadas entre las secuencias consenso para los diferentes grupos de regiones variables humanas (Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)). Se compararon las regiones variables de cadena ligera y pesada de roedores con las secuencias consenso humanas y se seleccionaron las secuencias consenso de cadena ligera y pesada humanas más similares entre los seis subgrupos de regiones variables de cadena ligera lambda humanas, los cuatro subgrupos de regiones variables de cadena ligera kappa humanas y los tres subgrupos de regiones variables de cadena pesada humana (véase Kettleborough, C.A., *Protein Engineering* 4:773-783 (1991)). En otra aproximación, las regiones variables humanas fueron seleccionadas entre todas las secuencias publicadas para regiones variables humanas (Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)). Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada de roedores fueron comparadas con secuencias humanas y se seleccionaron las regiones variables humanas con un grado alto de similitud con las regiones variables de roedores. Se pueden usar las regiones variables de cadena ligera y pesada humanas del mismo anticuerpo humano para asegurar que las dos regiones variables se ensamblen apropiadamente (Queen, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86:10029-10033 (1989)). Sin embargo, tal como se describe aquí, las regiones variables de cadena ligera y pesada humanas seleccionadas como moldes derivaban de dos diferentes anticuerpos humanos. de este modo era posible seleccionar regiones variables humanas con un mayor grado de similitud con las regiones variables humanas con un mayor grado de similitud con las regiones variables de roedores. Hay muchos ejemplos exitosos de anticuerpos injertados con RDCR basados en regiones variables derivadas de dos diferentes anticuerpos humanos. Uno de los dos ejemplos mejor estudiados es el anticuerpo CAMPATH-1 humano reformado (Riechmann, L., *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988)).

Para diseñar regiones variables de ACT-1 humano reformado, se compararon las regiones variables del ACT-1 de ratón con las secuencias consenso para todos los subgrupos de regiones variables de ratón y humanas (Kabatt, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)). Los resultados están resumidos en las tablas 1 y 2.

La región variable de la cadena ligera del Act-1 de ratón era muy similar a la secuencia consenso para el subgrupo II de cadena ligera kappa de ratón, con una identidad global del 83,9% y una identidad del 87,5% en las RM solamente (Tabla 1). Con respecto a las secuencias del anticuerpo humano, la región variable de la cadena ligera del Act-1 de ratón era muy similar a la secuencia consenso para el subgrupo II de la cadena ligera kappa humana, con una identidad global del 72,3% y una identidad del 78,8% en las RM solamente (Tabla 1).

TABLA 1

Comparación de la región variable de la cadena ligera kappa del Act-1 de ratón con las secuencias consenso para los subgrupos de las regiones variables de la cadena ligera kappa de ratón y humanas

5 Se comparó la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa de ratón y humanas, con y sin las secuencias de las RDC. Se dan los porcentajes de similitud y de identidad con los subgrupos de ratón y humanos más similares.

Región variable de ratón o humana	Subgrupo de Kabat	Región variable completa o RM sólo	Porcentaje de similitud	Porcentaje de identidad
Ratón	II	Completa	91,07	83,93
		RM sólo	95,00	87,50
Humana	II	Completa	83,93	72,32
		RM sólo	90,00	78,75

La región variable de la cadena pesada del Act-1 de ratón era muy similar a la secuencia consenso para el subgrupo IIB de la cadena pesada de ratón, con una identidad global del 83,5% y una identidad del 94,3% en las RM solamente (Tabla 2). Con respecto a las secuencias del anticuerpo humano, la región variable de la cadena pesada del Act-1 de ratón era muy similar a la secuencia consenso para el subgrupo I de cadena pesada humana, con una identidad global del 68,6% y una identidad del 75,9% en las RM solamente (Tabla 2). Estos resultados confirman que las regiones variables del Act-1 de ratón parecen ser típicas de las regiones variables de ratón. Los resultados también indican los subgrupos de las regiones variables humanas que pueden servir como buenas fuentes de moldes de región variable humana o aceptores para injertación de RDC.

TABLA 2

35 *Comparación de la región variable de la cadena pesada del Act-1 de ratón con las secuencias consenso para los subgrupos de regiones variables de cadena pesada de ratón y humanas*

Se comparó la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del Act-1 de ratón, con y sin las secuencias de las RDC, con las secuencias consenso de los diferentes subgrupos de regiones variables de cadena pesada de ratón y humanas, con y sin las secuencias de las RDC. Se dan los porcentajes de similitud y de identidad con los subgrupos más similares de ratón y humanos.

Región variable de ratón o humana	Subgrupo de Kabat	Región variable completa o RM sólo	Porcentaje de similitud	Porcentaje de identidad
Ratón	IIB	Completa	89,26	83,47
		RM sólo	95,40	94,25
Humana	I	Completa	81,82	68,60
		RM sólo	85,06	75,86

55 También se compararon las regiones variables del Act-1 de ratón con las secuencias individuales de todos los ejemplos registrados de regiones variables de ratón y humanas (Kabat, B.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991); paquete UW GCG (Universidad de Wisconsin)). Con respecto a las secuencias de anticuerpos humanos, la región variable de cadena ligera del Act-1 de ratón era muy similar a la secuencia para la región variable de la cadena ligera kappa humana del anticuerpo humano GM607'CL (Klobeck, H.-G., *et al.*, *Nature* 309:73-76 (1984)). La Figura 5 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del Act-1 de ratón (SEC ID NO:7) y de la región variable de la cadena ligera del GM607'CL humano (SEC ID NO:8). Tal como se esperaba, la región variable de cadena ligera del GM607'CL humano es un miembro del subgrupo II de las regiones variables de cadena ligera kappa humanas. La identidad global de secuencia entre las regiones variables de cadena ligera de Act-1 de ratón y GM607'CL humano se calculó como del 71,4%. La región variable de la cadena pesada del Act-1 de ratón era muy similar a la secuencia para la región variable de la cadena pesada humana del anticuerpo humano 21/28'CL (Dersimonian, H., *et al.*, *J. Immunol.* 139:2496-2501 (1987)). La Figura 6 muestra una

alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del Act-1 de ratón (SEC ID NO:9) y de la región variable de la cadena pesada del 21/28'CL humano (SEC ID NO:10). Tal como se esperaba, la región variable de la cadena pesada del 21/28'CL humano es un miembro del subgrupo I de regiones variables de cadena pesada humana. La identidad global de secuencia entre las regiones variables de cadena pesada de Act-1 de ratón y 21/28'CL humano se calculó como del 68,1%. En base a estas comparaciones, se seleccionó la región variable de cadena ligera del GM607'CL humano como molde humano para el diseño de la región variable de la cadena pesada del Act-1 humano reformado.

La segunda etapa en el procedimiento de diseño era insertar las RDC de roedores en las regiones variables de cadena ligera y pesada humanas seleccionadas. Se unieron las RDC completas de roedores, según definen Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)), a las RM humanas para crear un injerto RDC simple. En algunos casos, un anticuerpo de roedores humanizado en un injerto RDC simple mostrará poca o ninguna unión a antígeno. Es importante estudiar las secuencias de aminoácidos de las RM humanas para determinar si alguno de estos restos de aminoácidos tiene probabilidad de influir de manera adversa sobre la unión al antígeno, ya sea directamente a través de interacciones con el antígeno, o indirectamente, alterando el posicionamiento de los bucles RDC.

En la tercera etapa, se tomaron decisiones en cuanto a qué restos de aminoácido en las RM humanas tendrían que ser alteradas para conseguir una buena unión al antígeno. En esta etapa, el modelo de las regiones variables de roedores resulta de lo más útil en el procedimiento de diseño. También son útiles las estructuras canónicas para las RDC, según definen Chothia C. *et al.*, *Nature* 342:877-883 (1989). Es importante conservar en las regiones variables humanizadas cualquiera de los restos de aminoácido de roedores que son parte de las estructuras canónicas. Es útil comparar la secuencia del anticuerpo de roedores que ha de ser humanizada con secuencias similares de otros anticuerpos de roedores para determinar si los aminoácidos en determinadas posiciones son poco habituales o raros. Esto podría indicar que el aminoácido de roedor en esa posición tiene un papel importante en la unión al antígeno. Estudiando el modelo de las regiones variables de roedores, es posible predecir si los aminoácidos en posiciones particulares podrían o no influir en la unión al antígeno. Cuando se están usando regiones variables humanas de anticuerpos humanos individuales como base del diseño, entonces es aconsejable comparar la secuencia humana individual con la secuencia consenso para ese subgrupo de regiones variables humanas. Hay que observar cualquier aminoácido que sea particularmente inusual. En la mayoría de los casos, se identifican unos cuantos aminoácidos en las RM humanas que deberían ser cambiados del aminoácido presente en esa posición en la región variable humana al aminoácido presente en esa posición en la región variable de roedores.

Las Tablas 3 y 4 resumen como fueron diseñadas las regiones variables del Act-1 humano reformado. La Tabla 3 es una alineación de secuencias de aminoácidos usadas en el diseño de regiones V_L del Acm humano reformado Act-I y de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del Act-1 de ratón que ha de ser humanizada (SEC ID NO:7) en la columna 4, la secuencia consenso para el subgrupo de regiones variables de ratón al que pertenece la región variable del act-1 de ratón (SEC ID NO:50) en la columna 5 (κ -II de ratón), la secuencia consenso para el subgrupo de regiones variables humanas al que es más similar la variable del Act-1 de ratón (SEC ID NO:51) en la columna 6 (κ -II humana), la secuencia de aminoácidos de la región variable humana que sirve como molde (es decir, GM607'CL) (SEC ID NO:8) en la columna 7, y la secuencia de aminoácidos de la región variable del Act-1 humano reformado (SEC ID NO:52) diseñada en la columna 8 (Act-1 RHV_H). La Tabla 4 es la alineación de las secuencias de aminoácidos usadas en el diseño de las regiones V_H del Acm humano Act-1 reformado y da la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del Act-1 de ratón que ha de ser humanizada (SEC ID NO:9) en la columna 4, la secuencia consenso para el subgrupo de las regiones variables de ratón al que pertenece la región variable del Act-1 de ratón (SEC ID NO:53) en la columna 5 (IIB de ratón), la secuencia consenso para el subgrupo de regiones variables humanas al que el Act-1 de ratón es más similar (SEC ID NO:54) en la columna 6 (I humana), la secuencia de aminoácidos de la región variables humana que sirve como molde (es decir, 21/28'CL) (SEC ID NO:10) en la columna 7, y la secuencia de aminoácidos de la región variable del Act-1 reformado (SEC ID NO:55) diseñada en la columna 8 (Act-1 RHV_H). La penúltima columna en las Tablas 3 y 4 indica la posición (superficial o enterrada) de los restos en las RM que difieren entre las RM del Act-1 de ratón y las humanas seleccionadas. La columna final en las Tablas 3 y 4 da comentarios relevantes en cuanto a esa posición en la región variable.

En la Tabla 3, se utilizan los siguientes símbolos: (*) restos invariantes definidos por las secuencias consenso de Kabat, es decir una aparición del 95% o más en el subgrupo de Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)) (en el caso de las columnas 5 y 6) o como parte de la estructura canónica para los bucles RDC (en el caso de las columnas 5 y 6) o como parte de la estructura canónica para los bucles RDC (en el caso de la columna 8) según definen Chothia, C., *et al.*, *Nature* 342:877-883 (1989); (NEGRILLA) posiciones en las RM y RDC en las que el resto de aminoácido humano fue sustituido por el correspondiente resto de ratón; (SUBRAYADO) posiciones en las RM en las que el resto humano difiere del número de restos de ratón análogos; (Δ) numeración de los cambios en las RM humanas; (Ac Act-1 de ratón) secuencia de aminoácidos de la región V_L del anticuerpo Act-1 de ratón; (κ -II de ratón) secuencia consenso de las regiones V_L kappa del subgrupo II (Kabat, E.A., *et al.*, *supra*); (human κ -II) secuencia consenso de las regiones V_L humanas del subgrupo II (Kabat, E.A., *et al.*, antes citado); (GM607'CL) secuencia de aminoácidos del anticuerpo GM607'CL humano (Klobeck, H.-G., *et al.*, *Nature* 309:73-76 (1984)); (Superficial o enterrado) posición de aminoácido en relación con los demás restos en ambas cadenas de las regiones variables del anticuerpo; (RH V_K de Act-1) secuencia de aminoácidos de la región V_L del Acm Act-1 humano reformado.

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_L del AcM Act-1 humano reformado.

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	κ-II ratón	κ-II humana	GX 607 CL	Act-1 6 RH V _K	Superf. o enterr.	Comentario
1	1	RM1	D	D*	D*	D	D		
2	2		V	V	I*	I	V	enterr.	AA canónico para bucle L1 (Δ1).
3	3		V	V	V*	V	V		
4	4		V	M	M	M	M	enterr.	Enterrado entre L1 y L2. V=9/245, M=202/245 en κ-II de ratón. M=42/45, V no observada en κ-II humana. Si la unión es pobre, considérese cambiar éste a Val en segunda versión
5	5		T	T*	T*	T	T		
6	6		Q	Q*	Q*	Q	Q		

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_L del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	κ-II ratón	κ-II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RH V _L	Superf. o enterr.	Comentario
7	7		T	T	S	S	S	superf.	Distal al sitio de unión (SU). T=164/245 en κ-II de ratón. T=10/37, S=27/37 en κ-II humana.
8	8		P	P	P*	P	P		
9	9		L	L	L*	L	L		
10	10		S	S	S*	S	S		
11	11		L	L	L*	L	L		
12	12		P	P	P	P	P		
13	13		V	V*	V*	V	V		
14	14		S	S	T*	T	T	superf.	Distal al SU. S=151/248 en κ-II de ratón. T sola (30/30) observada en κ-II humana

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_h del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-I ratón	κ -II ratón	κ -II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RR V _i	Superf. o enterr.	Comentario
15	15		F	L	P	P	P	superf.	Distal al SU. F=9/253 en κ -II de ratón. F no ob servada en κ -II humana. F=29/31 en κ -humana.
16	16		G	G*	G*	G	Q		
17	17		D	D	E	E	E	superf.	Distal al SU. E=18/30, D no ob servado en κ -II humana
18	18		Q	Q	P*	P	P	superf.	Distal al SU y en una vuelta. P sola (31/31) ob servada en κ -II humana
19	19		V	A	A*	A	A	enterr.	Señalando al nú cleo, pero cambio estándar de ratón a humano. V=66/253, A=187/253 en κ -II de ratón. A sola (30/30) observada en κ -II humana

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_L del Acin Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	κ-II ratón	κ-II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RH V _L	Superf. o enterr.	Comentario
20			S	S*	S*	S	S		
21			I	I*	I*	I	I		
22			S	S*	S*	S	S		
23		RMI	C	C*	C*	C	C		
24		RDCI	R	R	R	R	R		
25			S	S*	S*	S	S		AA canónico para el bucle L1
26			S	S*	S*	S	S		AA canónico para el bucle L1
27			Q	Q	Q	Q	Q		AA canónico para el bucle L1
27A			S	S	S	S	S		AA canónico para el bucle L1
27B			L	L	L*	L	L		AA canónico para el bucle L1
27C			A	V	L	L	A		AA canónico para el bucle L1
27D			K	H	H	H	K		AA canónico para el bucle L1

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V₁ del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	κ-II ratón	κ-II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RH V ₂	Superf. o enterr.	Comentario
27E	32		S	S	S	S	S		AA canónico para el bucle L1
27F			-	-	X	-	-		
28	33		Y	N	D	N	Y		AA canónico para el bucle L1
29	34		G	G*	G	G	G		AA canónico para el bucle L1
30	35		N	N	N	Y	N		AA canónico para el bucle L1
31	36		T	T*	N	N	T		AA canónico para el bucle L1
32	37		Y	Y*	Y*	Y	Y		AA canónico para el bucle L1
33	38		L	L*	L*	L	L		AA canónico para el bucle L1

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_h del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	κ -II ratón	κ -II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RH V _h	Superf. o enterr.	Comentario
34	39	RCD1	S	R	N	D	S		AA de empaquetamiento. Inusual. (117/1365). A, H y N más comúnmente observados aquí.
35	40	RM2	W	W*	W*	W	W		
36	41		Y	Y	Y	Y	Y		AA de empaquetamiento. AA más común.
37	42		L	L*	L	L	L		
38	43		H	Q*	Q	Q	Q	enterr.	AA de empaquetamiento. H es inusual (31/1312). Q es el AA más común (1158/1312). H=6/225. Q-219/225 en κ -II de ratón. Q=15/17. H no observado en κ -II humana.

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminocido usadas en el diseño de las regiones V₁ del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RK o RDC	Act-1 ratón	K-II ratón	K-II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RK V _r	Superf. o enteri.	Comentario
44			K	K	K	K	K		
45			P	P*	P	P	P		
46			G	G*	G*	G	G		
47			Q	Q*	Q	Q	Q		
48			S	S*	S	S	S		
49			P	P*	P*	P	P		AA de empaquetamiento. AA más común
50			Q	K	Q	Q	Q		
51			L	L	L	L	L		AA de empaquetamiento. AA más común.
52			L	L*	L	L	L		
53			I	I*	I*	I	I		AA canónico para el bucle L2.
54		RN2	Y	Y	Y*	Y	Y		
55		RDC2	G	K	L	L	G		AA canónico para el bucle L2.
56			I	V	V	G	I		AA canónico para el bucle L2

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_L del AcM Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	k-II ratón	k-II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RH V _L	Superf. o enterr.	Comentario
52	57		S	S*	S*	S	S		AA canónico para el bucle L2
53	58		N	N	N	N	N		
54	59		R	R	R*	R	R		
55	60		F	F	A	A	F		
56	61	RDC2	S	S*	S*	S	S		
57	62	RM3	G	G*	G*	G	G		
58	63		V	V*	V*	V	V		
59	64		P	P	P*	P	P		
60	65		D	D*	D	D	D		
61	66		R	R*	R	R	R		
62	67		F	P*	F*	F	F		
63	68		S	S	S*	S	S		
64	69		G	G*	G	G	G		AA canónico para el bucle L2
65	70		S	S*	S*	S	S		
66	71		G	G*	G*	G	G		

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V₆ del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM O RDC	Act-1 ratón	κ -II ratón	κ -II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RH V ₆	Superf. o enterr.	Comentario
67	72		S	S*	S	S	S		
68	73		G	G*	G	G	G		
69	74		T	T*	T*	T	T		
70	75		D	D	D	D	D		
71	76		F	F*	F*	F	F		AA canónico para el bucle LI
72	77		T	T*	T*	T	T		
73	78		L	L*	L*	L	L		
74	79		K	K	K	K	K		
75	80		I	I*	I*	I	I		
76	81		S	S	S	S	S		
77	82		T	R*	R	R	R	superf.	Distal al SU. T=6/221, R=211/221 en κ -II de ratón. R=11/12, T no ob- servada en κ -II humana

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_L del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	κ -II ratón	κ -II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RH V _L	Superf. o enterr.	Comentario
78	83	I	I	V	V*	V	Y	enterr.	Señalando hacia el núcleo, pero cambio estándar de ratón a humano. I=6/213, V=194/213 en κ -II de ratón. Y sola (12/12) observada en κ -II humana.
79	84	I	K	E	E	E	E	superf.	Distal al SU. K=20/215, E=191/215 en κ -II de ratón. E=9/12, K no observada en κ -II humana.
80	85	I	P	A*	A	A	A	superf.	Distal al SU. P=6/183, A=175/183 en κ -II de ratón. P=1/12, A=11/12 en κ -II humana.
81	86	I	E	E*	E	E	E		
82	87	I	D	D*	D	D	D		

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_L del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	κ -II ratón	κ -II humana	CM 607 CL	Act-1 6 RH V _L	Superf. o enterr.	Comentario
83	88		L	L	V*	V	V	medio enterr.	Distal al SU. V sola (12/12) observada en κ -II humana.
84	89		G	G*	G*	G	G		
85	90		M	V	V*	V	V	medio enterr.	Distal al SU. M=6/612, V=186/212 en κ -II de ratón. V sola (12/12) observada en κ -II humana.
86	91		Y	Y*	Y*	Y	Y		
87	92*		Y	Y	Y*	Y	Y		AA de empaquetamiento. AA más común.
88	93	RM3	C	C*	C*	C	C		
89	94	RDC3	L	F	M*	M	L		AA de empaquetamiento. L es inusual (93/1238). Q es el AA más común (654/1238).
90	95		Q	Q*	Q	Q	Q		AA canónico para el bucle L3

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_L del AcM Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	K-II ratón	K-II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RR V _L	Supera. o enterr.	Comentario
91	96		G	G	A	A	G		AA canónico para L3/de empaquetamiento. 3 ^{er} AA más común.
92	97		T	T	L	L	T		AA canónico para el bucle L3
93	98		H	H	Q	Q	H		AA canónico para el bucle L3
94	99		Q	V	X	T	Q		AA canónico para el bucle L3
95	100		P	P*	P	P	P		AA canónico para el bucle L3
95A			-	P	R*		-		
95B			-	-	-		-		
95C			-	-	-		-		
95D			-	-	-		-		
95E			-	-	-		-		
95F			-	-	-		-		
96	101		Y	Y	X	Q	Y		AA de empaquetamiento. 2 ^o AA más común.

Tabla 3. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V₁ del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	κ-II ratón	κ-II humana	GM 607 CL	Act-1 ó RH V ₁	Superf. o enterr.	Comentario
97	102	RDC3	T	T*	T*	T	T		Canónico para L3.
98	103	RM4	F	F*	F*	F	F		AA de empaquetamiento. AA más común.
99	104		G	G*	G*	G	G		
100	105		G	G	Q	Q	Q	medio enterr.	Distal al SU. Q=12/13, G=1/12 en κ-II humana.
101	106		G	G*	G*	G	G		
102	107		T	T*	T*	T	T		
103	108		K	K*	K	K	K		
104	109		L	L*	V	V	V	medio enterr.	Distal al SU. L=5/14, V=9/14 en κ-II humana.
105	110		E	E*	E	E	E		
105	111		I	I	I*	I	I		
106A			-	-	-	-	-		
107	112	RM4	K	K*	K	K	K		

ES 2 262 186 T3

En la Tabla 4, se usan los siguientes símbolos: (*) restos invariantes definidos por las secuencias consenso de Kabat, es decir, 95% o más de aparición en el subgrupo de Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)) (en el caso de las columnas 5 y 6) o como parte de la estructura canónica para los bucles RDC (en el caso de la columna 8) según definen Chothia, C., *et al.*, *Nature* 342:877-883 (1989); (**NEGRILLA**) posiciones en las RM y RDC en las que el resto de aminoácido humano fue sustituido por el correspondiente resto de ratón; (SUBRAYADO) posiciones en las RM en las que el resto humano difiere del número de restos de ratón análogos; (Δ) numeración de los cambios en las RM humanas; (Ac Act-1 de ratón) secuencia de aminoácidos de la región V_H del anticuerpo Act-1 de ratón; (IIB de ratón) secuencia consenso de las regiones V_H de ratón del subgrupo IIB (Kabat, E.A., *et al.*, antes citado); (I humana) secuencia consenso de las regiones V_H humanas del subgrupo I (Kabat, E.A., *et al.*, antes citado); (21/28^oCL humana) secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano 21/28^oCL (Dersimonian, H., *et al.*, *J. Immunol.* 139:2496-2501 (1987)); (Superficial o enterrado) posición de aminoácido en relación con los demás restos en ambas cadenas de las regiones variables del anticuerpo; (RH V_H de Act-1) secuencia de aminoácidos de la región V_H del Acm Act-1 humano reformado.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_h del Acm Act-1 humano refinado.

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _h Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
1	1	PM1	Q	Q	Q	Q	Q		
2	2	I	V	V*	V	V	V		
3	3	I	Q	Q*	Q*	Q	Q		
4	4	I	L	L*	L*	L	L		
5	5	I	Q	Q	V	V	V	superf.	Distal al sitio de unión (SU). Q=135/143 en IIB de ratón. V=49/53, Q=1/53 en I humana.
6	6	I	Q	Q	Q	Q	Q		
7	7	I	P	P	S*	S	S	medio enterr.	Distal al SU. P=102/150 en IIB de ratón. P no observada en I humana.
8	8	I	G	G*	G*	G	G		
9	9	I	A	A	A	A	A		
10	10	I	R	E	E	E	B		

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_H del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	PM O RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CT donante humana	RH V _H Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
11	11		L	L*	V	V	V	superf.	Distal al SU. V=50/54, I=4/54 en I humana.
12	12		V	V*	K	K	K	enterr.	Señalando al núcleo, pero cambio estándar de ratón a humano. K=41/55, V=3/55 en I humana.
13	13		K	K	K*	K	K		
14	14		P	P*	P*	P	P		
15	15		G	G*	G*	G	G		
16	16		T	A	A	A	Δ	superf.	Distal al SU. T=12/139, A=117/139 en IIB de ratón. T=1/52, A=23/52 en I humana.
17	17		S	S*	S*	S	S		
18	18		V	V*	V	V	V		
19	19		K	K	K	K	K		

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_h del Acm Act-1 humano reformatado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RR V _h Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
20	20	I	L	L	V	V	V	enterr.	Señalando al núcleo, pero cambio estándar de ratón a humano. L=138/179 en IIB de ratón. V=36/52, L=1/52 en I humana.
21	21	I	S	S*	S	S	S		
22	22	I	C	C*	C*	C	C		
23	23	I	K	K*	K	K	K		
24	24	I	G	A*	A	A	G	enterr.	AA canónico para el bucle H1 (Δ1). No se observa G en IIB de ratón. G=12/51, A=34/51 en I humana.
25	25	I	Y	S*	S*	S	S	superf.	Señalando lejos del SU y por ello no parece unirse al antígeno (AG). Y=1/185 en IIB de ratón. S=48/50. Y no observado en I humana.

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_H del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _H Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
26			G	G*	G*	G	G		AA canónico para el bucle HI.
27			Y	Y	Y	Y	Y		AA canónico para el bucle HI.
28			T	T	T	T	T		AA canónico para el bucle HI.
29			F	F*	F*	F	F		AA canónico para el bucle HI.
30		RM1	T	T	T	T	T		AA canónico para el bucle HI.
31		RDC1	S	S	S	S	S		AA canónico para el bucle HI.
32			Y	Y	Y	Y	Y		AA canónico para el bucle HI.
33			W	W	A	A	W		
34			M	M	I	M	M		AA canónico para el bucle HI.
35			H	H	S	H	H		AA de empaquetamiento. AA más común.

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_H del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _H Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
35A			-	-	-	-			
35B		RDC1	-	-	-	-			
36	36	RM2	W	W*	W*	W	W		
37	37		V	V	V	V	V		AA de empaquetamiento. AA más común.
38	38		K	K	R*	R	R	enterr.	Señalando al núcleo, pero cambio estándar de ratón a humano. IIB de ratón. R=48/49, K no observado en I humana. Sin embargo, Lys puede estar empaquetando al bucle H2, por lo que hay que considerar el cambio en segunda versión, junto con A40R, si la unión es pobre.

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_H del Acm Act-1 humano reformado (Cont.),

Kabat	#	RM O RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RR V _H Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
39	39	I	Q	Q	Q*	Q	Q		AA de empaquetamiento. AA más común.
40	40	I	R	R	A	A	A	enterr.	Señalando al núcleo, pero cambio estándar de ratón a humano. IIB R=160/177 en IIB de ratón. A=37/49, R=0/49 en I humana. Sin embargo, Arg puede estar empaquetando al bucle H2, por lo que hay que considerar el cambio en segunda versión, junto con A38K, si la unión es pobre.

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_H del AcM Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RK V _H Act-1	Supersf. o enterr.	Comentario
41		I	P	P	P	P	P		
42		I	G	G	G	G	G		
43		I	Q	Q	Q	Q	Q		
44		I	G	G	G	R	B	enterr.	Señalando al número, pero cambio estándar de ratón a humano. G=41/48, R=5/48 en I humana.
45		I	L	L*	L*	L	L		AA de empaquetamiento. AA más común.
46		I	E	E*	E*	E	E		
47		I	W	W*	W*	W	W		AA de empaquetamiento. AA más común.
48		I	I	I*	M	M	I	enterr.	Ile por debajo y soportando al bucle H2 (Δ2). Met=41/48, Ile=1/48 en I humana.

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_g del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _r Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
49		RM2	G	G*	G	G	G		
50		RDC2	E	R	M	M	E		
51			I	I	I	I	I		
52			D	D	N	N	D		
52A			P	P*	P	A	P		AA canónico para el bucle H2.
52B			-	-	Y	-			
52C			-	-	-	-			
53	54		S	N	G	G	S		AA canónico para el bucle H2.
54	55		E	S	N	N	E		AA canónico para el bucle H2.
55	56		S	G	G	G	S		AA canónico para el bucle H2.
56	57		N	G	D	N	N		
57	58		T	T	T	T	T		
58	59		N	N	N	K	N		

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_H del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _H Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
59	60		Y	Y	Y	Y	Y		
60	61		N	N	A	S	N		
61	62		Q	S	Q	Q	Q		
62	63		K	K*	K	K	K		
63	64		F	F*	F	F	F		
64	65		K	K	Q	Q	K		
65	66	RCD2	G	S	G	G	G		
66	67	RM3	K	K*	R	R	R	superf.	Distal al SU. R=39/49, K no observado en I humana.
67	68		A	A*	V	V	V	medio enterr.	Distal al SU. V=45/48, A no observado en I humana.
68	69		T	T*	T	T	T		
69	70		L	L*	I	I	L	enterr.	Leu por debajo y soportando al bucle H2 (Δ3). Ile=26/49. Leu=1/49 en I humana.

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_h del AcM Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _h Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
70	71		T	T*	T	T	T		
71	72		V	V	A	R	V	enterr.	AA canónico para el bucle H2 (A4).
72	73		D	D*	D	D	D		
73	74		I	K	T	T	I	superf.	Detrás del bucle H2 y puede tener parte directa en la unión al antígeno (A5). No se observa ILe en IIB de ratón o I humana. T=21/49 en I humana.
74	75		S	S	S*	S	S		
75	76		S	S*	T	A	A	superf.	Distal al SU. T=26/50, A=4/50, S no observado en I humana.
76	77		S	S	S	S	S		
77	78		T	T*	T	T	T		
78	79		A	A	A	A	A		

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_h del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _h Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
79	80		Y	Y*	Y	Y	Y		
80	81		M	M	M	M	M		
81	82		Q	Q	E	E	E	medio enterr.	Distal al SU. Q=163/194 en IIB de ratón. E=35/50, Q=11/50 en I humana.
82	83		L	L*	L	L	L		
82A	84		S	S	S	S	S		
82B	85		S	S	S	S	S		
82C	86		L	L*	L*	L	L		
83	87		T	T*	R	R	R	superf.	Distal al SU. R=33/51, T=4/51 en I humana.
84	88		S	S*	S	S	S		
85	89		B	E	E	E	E		
86	90		D	D*	D*	D	D		
87	91		S	S*	T	T	T	superf.	Distal al SU. T=48/51, S=2/51 en I humana.

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_H del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _H Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
88	92		A	A*	A	A	A		
89	93		V	V*	V	V	V		
90	94		Y	Y*	Y*	Y	Y		
91	95		Y	Y	Y	Y	Y		AA de empaquetamiento, AA más común.
92	96		C	C*	C*	C	C		
93	97		A	A	A*	A	A		AA de empaquetamiento, AA más común.
94	98	RM3	R	R	R	R	R		AA canónico para el bucle III.
95	99	RDC3	G	Y	A	G	G		AA de empaquetamiento, 2º residuo más común observado en este punto - OK.
96	100		G	Y	P	-	G		
97	101		Y	Y	G	.	Y		
98	102		D	G	Y	-	D		

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminocidos usadas en el diseño de las regiones V₁ del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RM V ₁ Act-1	Suparf. o enter.	Comentario
99	103		G	G	G	G	G		
100	104		W	S	S	-	W		
100A	105		D	S	G		D		
100B	106		Y	X	G		Y		
100C	107		A	X	G	-	A		
100D	108		I	V	C	-	I		AA de empaqueta- miento. I-26/1211. P y M son más común- mente observados.
100E			-	Y	Y	-			
100F			-	X	R	Y			
100G			-	-	G	Y			
100H			-	Y*	D	G			
100I			-	W	Y	S			
100J			-	Y	X	G			
100K			-	F	F	S			
101	109		D	D	D	N	D		
102	110	RDC3	Y	Y	Y	Y	Y		

Tabla 4. Alineación de las secuencias de aminoácido usadas en el diseño de las regiones V_h del Acm Act-1 humano reformado (Cont.).

Kabat	#	RM o RDC	Act-1 ratón	II-B ratón	I humana	21/28CL donante humana	RH V _h Act-1	Superf. o enterr.	Comentario
103	111	RM4	W	W*	W*	W	W		AA de empaquetamiento. AA más común.
104	112		G	G*	G	G	G		
105	113		Q	Q	Q	Q	Q		
106	114		G	G*	G*	G	G		
107	115		T	T*	T	T	T		
108	116		S	T	L	L	L	superf.	Dietal al SU. T=08/149 en IIB de ratón. L=25/39, T=7/39 en I humana.
109	117		V	V	V*	V	V		
110	118		T	T*	T	T	T		
111	119		V	V*	V	V	V		
112	120		S	S*	S*	S	S		
113	121		S	S	S*	S	S		

Con respecto al diseño de la región variable de la cadena ligera del Act-1 humano reformado (Tabla 3), se cambió un resto en las RM humanas del aminoácido presente en las RM humanas al aminoácido presente en las RM de ratón originales. Este cambio estaba en la posición 2 in RM1 (según definen Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)). Concretamente, la isoleucina encontrada en la región variable de la cadena ligera del GM607'CL humano fue cambiada a valina, tal como se encuentra en la región variable de la cadena ligera del Act-1 de ratón. Esta posición en la región variable de la cadena ligera kappa ha sido identificada por Chothia, C., *et al.*, *Nature* 342:877-883 (1989) como una de las localizaciones críticas para la correcta orientación y estructura del bucle L1, y, como tal, se conoce como uno de los “aminoácidos canónicos”. Debido a su importante papel en la conformación de bucles, dichos restos de marco de ratón se conservan generalmente siempre en la región variable reformada.

En la posición 4 de RM1, existe una valina en la secuencia de ratón y una metionina en la secuencia humana. Un cambio de una valina a una metionina no es un cambio drástico en sí mismo, ya que ambos aminoácidos son restos hidrofóbicos, no polares, por lo que la metionina presente en la secuencia humana fue usada en la región variable del Act-1 humano reformado. Sin embargo, el modelo indica que la valina está enterrada entre los bucles L1 y L2 y el volumen medio de valina cuando está enterrada en las proteínas es 142\AA^3 , mientras que la metionina ocupa aproximadamente 171\AA^3 de espacio. El resto de metionina, más grande, podría causar un cambio en la conformación de cualquiera de los bucles L1 y L2, o ambos. La unión a antígeno del Act-1 humano reformado puede mejorar por medio de un cambio adicional en la posición 4 de metionina a valina en la región variable de cadena ligera del Act-1 humano reformado.

Con respecto al diseño de la región variable de cadena pesada del Act-1 humano reformado (Tabla 4), había cinco restos en las RM humanas que fueron cambiados de los aminoácidos presentes en las RM humanas a los aminoácidos presentes en las RM de ratón originales. En las posiciones 24 de RM1 y 71 de RM3 (según definen Kabat, E.A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)), los restos de aminoácido presentes en la secuencia de ratón fueron retenidos en la región variable de cadena pesada del Act-humano reformado, ya que estas posiciones son parte de las estructuras canónicas para los bucles H1 y H2, respectivamente (Chothia, C., *et al.*, *Nature* 342:877-883 (1989)). Dado que cualquier cambio de aminoácidos en estas posiciones podría alterar el empaquetamiento y las estructuras finales de los bucles H1 y H2, los restos de ratón en estas localizaciones críticas son rutinariamente conservados en la región variable de cadena pesada humanizada.

En la posición 48 de RM2, la metionina en la secuencia humana fue cambiada a una isoleucina, tal como está presente en la secuencia del Act-1 de ratón. La sustitución de una metionina por una isoleucina es inusual. Lo que es más importante, el modelo muestra que el resto de isoleucina está enterrado debajo del bucle H2. Como resultado de ello, los cambios en esta posición enterrada pueden haber influido en la estructura del bucle H2 y, por lo tanto, haber interferido con la unión a antígeno.

En la posición 69 de RM3, la isoleucina en la secuencia humana fue cambiada a una leucina, tal como está presente en la secuencia del Act-1 de ratón. Aunque la sustitución de una isoleucina por una leucina no es inusual, el modelo muestra que la leucina esté enterrada bajo el bucle H2. En consecuencia, como el resto en posición 48, los cambios en esta posición podrían influir en la conformación del bucle H2 y de este modo alterar la unión a antígeno.

Finalmente, en la posición 73 de RM3, la treonina en la secuencia humana fue cambiada a una isoleucina, tal como está presente en la secuencia de ratón. Una isoleucina en esta posición en RM3 no ha sido nunca vista con anterioridad en el subgrupo IIB de ratón o el subgrupo I humano (según definen Kabat, E.A., *et al.*, Quinta edición, Ministerio de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Imprenta del Gobierno de los EE.UU (1991)), lo que sugiere que la isoleucina en esta localización puede tener un importante papel en la unión a antígeno.

En el modelo, la leucina en la posición 73 aparece en la superficie cerca del límite del sitio de unión y, dependiendo del tamaño y orientación del epitopo sobre la integrina $\alpha 4\beta 7$, puede posiblemente tomar parte directa en la unión a antígeno. Sin embargo, como posición de resto superficial, el anticuerpo en conjunto tendría menos potencial inmunogénico si estuviera presente el aminoácido de ratón en el anticuerpo humano reformado y el nuevo constructo podría ser reestudiado para determinar si la segunda versión mantiene un nivel similar de unión a antígeno.

Además de los cinco cambios en las RM humanas hechos en el diseño original de la región variable de cadena pesada del Act-1 humano reformado, se podrían hacer otros dos cambios que pueden mejorar la unión a antígeno. El modelo sugiere que los restos 38Lys y 40Arg en la región variable pesada del Act-1 de ratón están posicionados por debajo del bucle H2 y en próximo empaquetamiento a 63Phe en RDC2 (numeración como en la Tabla 4). Sin embargo, estos restos se localizan también en el núcleo de la región variable de la cadena pesada y pueden tener otros efectos, posiblemente perjudiciales, si se usan para sustituir a sus correspondientes aminoácidos humanos (38 Arg y 40 Ala, respectivamente). Por lo tanto, los cambios a las posiciones 38 y 40 en RM2 no fueron incorporados a la región variable pesada humana reformada del Act-1. Sin embargo, se puede usar cualquiera de las modificaciones, o ambas, de la cadena pesada reformada en derivados para mejorar la unión a antígeno.

Conclusiones

Se construyó un modelo de las regiones variables del Act-1 de ratón en base, principalmente, a las estructuras resultas de otras regiones variables de anticuerpos. El modelo fue utilizado en el diseño de regiones variables del Act-1 humanizado. Se puso un énfasis particular en el mantenimiento de la estructura del sitio de unión a antígeno en las regiones variables humanas reformadas.

Se diseñaron una región variable de cadena ligera del Act-1 humano reformado y regiones variables de cadena pesada del Act-1 humano reformado (Tablas 3 y 4). La región variable de cadena ligera del Act-1 humano reformado estaba basada en las RDC de la región variable de cadena ligera del Act-1 de ratón y en las RM de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo GM607'CL humano. Se hizo un cambio de aminoácido en las RM humanas en la posición 2. La región variable de la cadena pesada del Act-1 humano reformado estaba basada en las RDC de la región variable de la cadena pesada del Act-1 de ratón y en las RM de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humano 21/28'CL. Se hicieron cinco cambios de aminoácidos en las RM humanas, en las posiciones 24, 48, 69, 71 y 73.

Además, se observaron un único sitio en la posición 4 de RM1 de la cadena ligera kappa y dos sitios en las posiciones 38 y 40 en RM2 en la cadena pesada que podrían ser considerados en el diseño de versiones adicionales de las regiones variables del Act-1 humano reformado. Además, también se identificó un único resto en la posición 73 de RM3 de la cadena pesada como candidato para la retromutación del aminoácido de ratón al humano, en vista de su localización sobre la superficie del anticuerpo.

Ejemplo 3

Construcción de ácidos nucleicos codificantes de regiones variables reformadas

Después de confirmar que se habían clonado las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera correctas bioquímica (secuencia parcial de aminoácidos) y funcionalmente (tinción con anticuerpos quiméricos de células HuT 78), se diseñó una secuencia reformada de aminoácidos como se ha descrito antes. A continuación se diseñaron y prepararon genes codificantes de las cadenas de anticuerpo reformadas.

Diseño, construcción y expresión de ACT-1 humanizado

Después de determinar la secuencia primaria de aminoácidos del anticuerpo humanizado según se describe en el Ejemplo 2, se hizo una traducción inversa de la secuencia a una secuencia degenerada de ácido nucleico y se analizó en cuanto a sitios de enzimas de restricción potenciales usando la versión 4.5.3 de MacVector (Kodak, Scientific Imaging Systems). Se seleccionó entonces una secuencia de ácido nucleico que incorporaba sitios de escisión para enzimas de restricción pero que conservaba la secuencia primaria de aminoácidos. En la Figura 11 se muestran la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada (SEC ID NO:18) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO:19), y en la Figura 12 se muestran la secuencia nucleica de la cadena ligera (SEC ID NO:20) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO:21), con indicación de los sitios de enzimas de restricción que fueron utilizados en la subclonación.

Se construyeron los genes de las regiones variables de cadena pesada y ligera del Act-1 humanizado como sigue. Se sintetizaron oligonucleótidos complementarios solapantes, denominados L1-L6 (SEC ID NOS: 22-27, respectivamente) para la cadena ligera, y H1-H10 (SEC ID NOS:28-37, respectivamente) para la cadena pesada usando un Sintetizador de ADN de Applied Biosystems Modelo 392 (Figura 13). Después de desprotección durante la noche a 55°C, los oligos fueron secados en un Speed-Vac, resuspendidos en 100 ml de agua y desalificados sobre columnas Bio-Spin 6 (Hio-Rad). La concentración de oligos se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, y los oligos se purificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

Se mezclaron 100 µg de cada oligo con 2 volúmenes de colorante de carga (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol FF 0,05%), se calentó durante 2 minutos a 65°C, y se hizo correr en 1X TBE durante aproximadamente 3 horas a 250 V. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó con luz ultravioleta. Se sacaron del gel los oligos de longitud correcta, se pusieron en tubos de diálisis con agua y se electroeluyeron. Se extrajeron dos veces los oligos con volúmenes iguales de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) (Gibco/BRL) y se precipitaron añadiendo 0,1 volúmenes de acetato de potasio 3,0 M (pH 6) y 2 volúmenes de etanol frío. Después de la centrifugación, se lavaron los pellets una vez con etanol al 70%, se secaron a vacío y se resuspendieron en 50 µl de agua.

Se reasociaron los oligos complementarios mezclando cantidades molares iguales (aproximadamente 100 µg en 50 µl de agua) del oligo purificado con un volumen igual (100 µl) de 2X tampón de reasociación (2X = NaCl 1 M, Tris-HCl 40 mM a pH 7,5, EDTA 2 mM). Los oligos fueron desnaturalizados calentando a 95°C durante 10 minutos, seguido de una incubación de 8 horas a 65°C. Los oligos reasociados fueron entonces precipitados con etanol como se ha descrito previamente y resuspendidos en 40 µl agua.

La extensión de los oligos reasociados fue realizada por adición de 2 µl de Fragmento Grande de ADN Polimerasa I (Klenow), 5 µl de dNTP 2,5 mM y 5 µl de Tampón 10 X (10X = Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7,9 a 25°C) llevando el volumen final hasta 52 µl. Se incubó la mezcla durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron 1 µl de dNTP y 1 µl de Klenow con una incubación de media hora a 37°C. Obsérvese que el fragmento A de cadena pesada no tuvo que ser extendido.

ES 2 262 186 T3

Los fragmentos reasociados y extendidos fueron purificados a partir de un material no reasociado, monocatenario, por electroforesis a través de un gel de poliacrilamida nativo al 12%. El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado con luz ultravioleta. Se sacaron los fragmentos de longitud correcta y se recuperaron por electroelución en tubos de diálisis como se ha descrito antes. Los fragmentos fueron lavados dos veces con volúmenes iguales de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, precipitados con etanol y resuspendidos en 10 μ l de agua.

Los tres fragmentos de cadena ligera (LA, LB y LC) y cinco fragmentos de cadena pesada (denominados HA-HE) fueron independientemente ligados en pCR-Script™ y transformados, excepto por lo que se describe a continuación, en Células Supercompetentes XL-1 Blue usando un kit pCR-Script (Stratagene) según el protocolo recomendado por el fabricante. Los fragmentos pCR-LA y pCR-LB fueron transformados en células competentes DM1 (Gibco/BRL) para evitar la Dcm metilasa, que bloquearía la digestión con la enzima de restricción Msc I. Se recogieron las colonias blancas y se secuenció el ADN miniprep usando un kit de ADN polimerasa Sequenase T7 según el protocolo recomendado por el fabricante. Se usaron cebadores T3 y T7, que se reasociarían en lados opuestos del inserto, para la secuenciación.

La subclonación de recopilación de los fragmentos de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera humanizadas fue llevada a cabo usando sitios de restricción específicos incorporados a la secuencia durante la síntesis. Los fragmentos de cadena pesada HA-HD incluyen un sitio adicional de restricción Age I al final de cada secuencia, que permite la subclonación secuencial de los fragmentos como se describe a continuación.

Se digirió ADN miniprep de pCR-HA y pCR-HB con enzimas de restricción Spe I y Age I. El ADN fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El fragmento HB de 141 pb fue recuperado del gel y ligado en pCR-HA en los sitios Spe I y Age I dando lugar a pCR-HAB. A continuación, el fragmento HC de 112 pb fue liberado de pCR-HC usando Xba I y Age I y ligado en los sitios Xba I y Age I en pCR-HAB dando como resultado el plásmido pCR-AC. Los fragmentos HD (141pb) y HC (130pb) fueron ligados de la misma forma secuencial usando sitios de restricción Nhe I y Age I para el Fragmento HD, y BstE II y Age I para el fragmento E. El plásmido final que contenía los cinco fragmentos de la región variable de cadena pesada en pCR-script fue denominado pCR-HAE. Todos los digestos fueron realizados utilizando ADN miniprep con incubaciones a 37°C durante al menos dos horas excepto aquellos en los que se utilizó BstE II, que tiene una temperatura óptima de incubación de 65°C. Las ligaciones se hicieron durante la noche a 16°C usando ADN ligasa de T4 con una razón vector a inserto 1:10 y se transformaron al día siguiente en células competentes en cuanto a eficacia de subclonación DH5 α (Gibco/BRL) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

La región variable de la cadena pesada humanizada del Act-1 en pCR-Script™ fue liberada por digestión de pCR-HAE con HindIII y Age I. Este fragmento de 411 pb fue usado para sustituir las secuencias de la región variable de ratón de pEE6mhACT1Hchi (Ejemplo 1) que habían sido digeridas con HindIII y Age I, generando el gen de cadena pesada de ACT-1 humanizada en pEE6hCMV-B. El plásmido resultante es denominado pEE6hACT1H. Se determinó la secuencia correcta de ADN por secuenciación.

El fragmento A de cadena ligera en pCR-Script™ fue digerido con BspE I y MscI. Este fragmento de 153pb fue luego utilizado para sustituir la porción de ratón de BspE I a MscI de la cadena ligera variable de ratón en pCR-script™. Este plásmido es denominado pCR-LhAmBC. El fragmento B de cadena ligera, digerido con Msc I y Nru I, y el fragmento C de cadena ligera, digerido con Nru I y Kas I, se ligaron triplemente en los sitios MscI y Kas I de pCR-LhAmBC sustituyendo a la parte restante de la secuencia de ratón. Las digestiones, ligaciones y transformaciones utilizaron los mismos procedimientos que los previamente indicados, excepto por la utilización de células competentes DM1 en todas las transformaciones, excepto en la final.

La región variable de la cadena ligera humanizada en pCR-Script™ y el plásmido pEE12mhACT1Lchi (Ejemplo 1) fueron digeridos con Hind III y Kas I. El fragmento de la región variable de la cadena ligera de 360 pb y la región constante de la cadena ligera de 315 pb fueron purificados en gel y triplemente ligados en el sitio de restricción Hind III de pEE12 para dar pEE12hACT1L. Se realizó secuenciación para confirmar la orientación y la secuencia de ácido nucleico correctas.

Se construyó un vector de expresión que contenía tanto los genes humanizados de cadena pesada como los de cadena ligera usando el mismo método que el descrito para el anticuerpo quimérico (véase el Ejemplo 1, *Expresión de una Inmunoglobulina quimérica*) con la siguiente salvedad. Debido a un sitio adicional de restricción Bgl II en la región de cadena pesada variable humanizada, se usó un digesto parcial al cortar con Bgl II para obtener el fragmento correcto. El vector que contenía los genes humanizados de cadena pesada y ligera es denominado pEE12hACT1LH.

Se llevó a cabo la expresión transitoria de todos los constructos de anticuerpos humanizados y la tinción de células usando los mismos protocolos que los empleados para el anticuerpo quimérico (véase Ejemplo 1, *Expresión de una inmunoglobulina quimérica*). La Figura 14 muestra los resultados de la tinción de HuT 78 usando el anticuerpo Act-1 quimérico murino-humano o el anticuerpo Act-1 humanizado en comparación con un anticuerpo control irrelevante de isotipo parejo (IgG1, kappa).

Se obtuvieron transfectantes estables de células NSO, una línea de células de mieloma (*Methods in Enzymol.* 73 (B):3-46 (1981); European Collection of Animal Cell Cultures, PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, U.K., ECACC N° 85110503) por electroporación de células NSO con pEE12hACT1LH.

ES 2 262 186 T3

Expresión estable en células NSO

Se linealizaron 40 μg de pEE12hACT1LH para transfección estable por digestión con la enzima de restricción SalI, que corta dentro de la porción de plásmido bacteriano del constructo. Se precipitó el ADN linealizado en el seno de la solución usando dos volúmenes de etanol más 1/10 de volumen de acetato de sodio, se lavó en etanol al 70%, se secó y se resuspendió en agua estéril.

Se mantuvieron células NSO de crecimiento exponencial en medio no selectivo (medio de Eagle modificado por Dulbecco (rico en glucosa) con L-glutamina 2 mM, sin piruvato de sodio, con 4500 mg/L de glucosa, y con tampón HEPES 25 mM (GIBCO/BRL, N° de catálogo 12430-021), más 10% de suero bovino fetal (Gibco/BRL, N° de catálogo 16000-044)). Las células NSO se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en PBS frío, de forma que, después de la adición del ADN, las células estuvieran a una concentración de 10^7 células/ml. Se añadió el ADN plasmídico linealizado (40 μg) a 10^7 células en una cubeta de electroporación en hielo. Se mezclaron suavemente las células y el ADN para evitar la generación de burbujas y se dejó la mezcla sobre hielo durante 10 minutos. Se secó el exterior de la cubeta y se dieron dos pulsos consecutivos de 1500 V, 3 μFe , usando un pulsador génico (Bio-Rad). Se devolvió la cubeta al hielo durante 10 minutos.

Las células transfectadas se transfirieron a placas de 96 pocillos a densidades de 3×10^5 , $7,5 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^4$ células/ml en 50 μl de medio no selectivo y se incubó a 37°C durante 24 horas. A continuación, se añadieron a todos los pocillos 150 μl de medio selectivo (medio de Eagle modificado por Dulbecco libre de glutamina, con 4500 mg/L de glucosa, con 4 mg/L de piridoxina.HCl, con 110 mg/L de piruvato de sodio, sin nitrato férrico, sin L-glutamina (JRH BioSciences, N° de catálogo 51435-78P), más Suplemento GS 1X (Suplemento GS 50X obtenido a partir de JRH Bioscience, N° de catálogo 58672-77P), más 10% de suero bovino fetal dializado (Gibco/BRL, N° de catálogo 26300-061)). Las placas fueron devueltas a la incubadora hasta que se hubo producido la muerte sustancial de las células y hubieron aparecido colonias supervivientes discretas. Una vez que se pudieron ver las colonias de transfectantes independientes de glutamina, se seleccionaron los pocillos con colonias simples y se recogieron y estudiaron los sobrenadantes gastados del cultivo de tejidos en cuanto a secreción de IgG humana por ELISA, según se describe a continuación. Se obtuvo un clon productor de anticuerpo, denominado 3A9, que fue usado en posteriores estudios de este modo. Se realizó una segunda transfección como se ha descrito antes, excepto por el hecho de que se realizó la selección en presencia de L-metionina sulfoximina (MSX, un inhibidor de la glutamina sintetasa).

Las colonias positivas fueron estudiadas por ELISA en cuanto a secreción de IgG humana como sigue. Se revistieron placas de ELISA (NUNC Maxisorp) durante una noche a 4°C con 100 μl de fragmento AffiniPure F(ab')₂ de burro anti-IgG humana (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón carbonato pH 9,5. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS Tween 20 y se bloquearon durante 2 h a 37°C con 200 μl de PBS, 1% BSA. Las placas se lavaron e incubaron 15 min a 37°C con 100 μl de sobrenadante de NSO estables transfectadas. Se usó IgG1 humana kappa a 1 mg/ml in PBS con 1% de BSA como patrón. Se usó medio NSO fresco (DME + suplemento GS) como control negativo. Las placas fueron lavadas e incubadas 15 min a 37°C con 100 μl de fragmento AffiniPure F(ab')₂ de burro conjugado a peroxidasa anti-IgG humana (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS (sin Ca²⁺/Mg²⁺). Se disolvió un comprimido de 5 mg de dihidrocloruro de O-fenilendiamina (OPD) (Sigma) en 12 ml de tampón citrato (0,1 M, pH 5,0), y se añadieron 12 μl de peróxido de hidrógeno al 30% después de disolverse el comprimido. Después de lavar para separar el anticuerpo secundario, se añadieron 100 μl de sustrato OPD disuelto. La reacción se detuvo con 12,5% de ácido sulfúrico y las placas se leyeron en un Lector de Placas Dynatech a 490 nm. Se clonaron los pocillos positivos por dilución limitante a 2, 1 y 0,5 células por pocillo. Cuando todos los pocillos de un solo clon dieron positivo para la producción de anticuerpo por ELISA, se consideró la línea como clonada.

La purificación del anticuerpo ACT-1 humanizado de los sobrenadantes de cultivo celular de cultivos de transfectantes celulares transitorios o estables fue llevada a cabo por cromatografía de afinidad con Proteína A (Poros A/M 4,6/100 mm, 5 mL/min usando una estación de trabajo Bio-Cad (Perseptive Biosystems, Inc.). La columna se equilibró con PBS seguido de aplicación del sobrenadante del cultivo celular, que había sido previamente filtrado a través de filtros de 0,2 micras. El volumen de sobrenadante de cultivo celular aplicado por vuelta variaba según la concentración de anticuerpo. Normalmente no se aplicaron más de 15 mg de anticuerpo a la columna en una vuelta dada. El caudal era 5 ml/min a lo largo de todo el procedimiento de purificación. Después de la unión, la columna fue lavada primero extensamente con PBS hasta OD₂₈₀ nm = 0. La columna fue entonces lavada otra vez con un mínimo de 50 volúmenes de columna. La columna fue posteriormente lavada con acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0. La elución fue llevada a cabo por lavado con Na Citrato, 0,1 M, pH 3,5. El eluato fue recogido en fracciones de 5 ml y el pH fue neutralizado por adición de 200 μl de Na₂CO₃ 1,5 M, pH 12. Se reunieron entonces las fracciones que contenían anticuerpo y se concentraron hasta la concentración deseada por ultracentrifugación (centricon, corte a los 30.000 KDa, Amicon).

Construcción de una variante mutada en Fc

Se construyó también una versión de unión no-Fc (mutada en Fc) del anticuerpo Act-1 humanizado. Este anticuerpo tiene las mismas regiones variables que el anticuerpo Act-1 humanizado (Figura 11 y Figura 12), y una región constante de IgG1 humana idéntica, con la excepción de dos sustituciones de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada de la IgG1, diseñada para abolir el reconocimiento de FcR y eliminar la unión de Fc (es decir, una sustitución Leu²³⁵ → Ala²³⁵ y una sustitución Gly²³⁷ → Ala²³⁷). El ácido nucleico codificante de la cadena pesada del derivado mutado en Fc fue construido como sigue. Se digirió un constructo designado 3678 (obtenido a partir del Dr. Herman Waldmann, Universidad de Oxford), que codifica la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD18

ES 2 262 186 T3

humanizado (WO 93/02191 (publicada el 4 de febrero de 1993); Sims, M.J., *et al.*, *J. Immunol.* 151(4): 2296-2308 (1993)) en un vector de expresión pEE12, pero en el que se introdujeron dos sustituciones de aminoácido en la región constante de la cadena pesada de IgG1 por mutagénesis dirigida al sitio (Leu²³⁵ → Ala²³⁵ y Gly²³⁷ → Ala²³⁷), con Age I y EcoRI para liberar un fragmento de 900 pb que contenía el mutante de la región constante gamma. Este fragmento fue usado entonces para sustituir la región constante gamma de tipo salvaje de cadena pesada en los sitios AgeI/EcoRI en pEE6hACT1H dando lugar a pEE6hACT1H/FCmut. De una forma análoga a la descrita anteriormente para otros constructos que contienen ambas cadenas, se preparó un solo constructo (pEE12hACT1LH/FCmut) que contiene el gen de cadena ligera reformado y el gen de cadena pesada reformado mutado en Fc.

10 Ejemplo 4

Caracterización de LDP-02, un anticuerpo ACT-1 humanizado

Se llevaron a cabo estudios de caracterización inicial usando anticuerpo producido a partir de células COS-7 transitoriamente transfectadas con pEE12hACT1LH/FCmut. Esta preparación de anticuerpo fue producida y purificada como se ha descrito antes y se hace referencia a ella a continuación como “1°HUM ACT-1” seguido del número de lote apropiado.

Se realizaron ensayos adicionales usando anticuerpo producido a partir de un transfectante estable de la línea celular murina NSO según se ha descrito anteriormente (transfectada con pEE12hACT1LH/FCmut linealizado). A continuación se hace referencia a esta preparación de anticuerpo como “LDP-02/3A9/Lote 1”.

Se utilizó el anticuerpo “LDP-02/3A9/Lote #1” en los siguientes estudios descritos a continuación: SDS-PAGE, análisis por transferencia Western, enfoque isoeléctrico, análisis de la composición de aminoácidos, reactividad cruzada de especie, titulación, ensayos de lisis mediada por el complemento, ensayos ADCC, y ensayos de inhibición de la unión. Se utilizó “1°HUM ACT-1 Lote #7” en los ensayos de afinidad #1-2, se utilizó 1°HUM ACT-1 Lote #8/9 en los ensayos de afinidad #3-5, y se utilizó 1°HUM ACT-1 Lotes #8/9 en los ensayos de unión a C1q.

A. *Propiedades fisicoquímicas*

30 1. *SDS-PAGE*

Con objeto de ayudar a establecer la identidad, caracterizar la primera preparación y valorar la pureza, se sometió LDP-02/3A9/Lote#1 a electroforesis en dodecilsulfato de sodio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras y se tiñó con Azul Coomassie coloidal.

Se añadieron 80 μ l de LDP-02/3A9/Lote#1 a una concentración nominal de 0,82 mg/ml a un microconcentrador. Se cambió el tampón citrato, en el que estaba disuelto el anticuerpo, tres veces, con 160 μ l de tampón TRIS (0,5 mM, pH 8,8). El volumen final de la muestra después del cambio de tampón era de 135 μ l, dando una concentración de proteína de 0,486 mg/ml. Esta solución fue diluida dos veces con tampones no reductores y reductores para obtener una concentración de 0,243 mg/ml. Se cargó una alícuota de 13 μ l de la solución de 0,243 mg/ml, que contenía 3,16 μ g de proteína, en las calles designadas para las muestras del gel de SDS. Se realizó la SDS-PAGE y los artículos control incluían patrones de peso molecular Mark 12 (Novex, #LC5677).

En condiciones no reductoras, estaba presente una banda mayoritaria con un peso molecular aparente ligeramente inferior a 200.000 Daltons en LDP-02/3A9/Lote#1. Se observaron varios componentes minoritarios entre 116.300 y 200.000 Daltons. Se observaron también tres componentes minoritarios adicionales con pesos moleculares aproximados de 97.400 Daltons, ligeramente más de 55.400 Daltons, y menos de 31.000 Daltons. El barrido de gel usando una densitometría láser permitió el análisis cuantitativo de las bandas teñidas del polipéptido y luego el cálculo del porcentaje de área asociada a cada banda visible (Tabla 5). Los datos obtenidos a partir del análisis cuantitativo indican que el componente mayoritario observado a aproximadamente 200.000 Daltons representaba un 84,4% de las bandas teñidas totales en la banda de la muestra de ensayo. Esta banda mayoritaria representaba el anticuerpo intacto, mientras que las otras bandas a 55.000 y 31.000 Daltons representaban las cadenas pesadas y ligeras simples, respectivamente.

En condiciones reductoras se observaron dos componentes mayoritarios en el gel de electroforesis. El peso molecular de uno de los componentes era de aproximadamente 55.400 Daltons y representaba un 68,6% de las bandas teñidas totales visualizadas en la banda del gel, mientras que el segundo componente correspondiente a ligeramente menos de 31.000 Daltons, representaba un 30,5% de las bandas teñidas totales (Tabla 5). Los pesos moleculares de estos dos componentes están de acuerdo con los pesos moleculares esperados de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina G. Estos datos indican que aproximadamente un 99% de la preparación consistía en anticuerpo intacto o en cadenas simples de inmunoglobulinas de cadena pesada o ligera. Además de los componentes mayoritarios, se observó también un componente minoritario a ligeramente menos de 66.300 Daltons.

A partir de estos análisis, una especie de alto peso molecular, consistente con la de la inmunoglobulina G está presente como banda mayoritaria en LDP-02/3A9/Lote#1. También están presentes varias bandas minoritarias en LDP-02/3A9/Lote1. Después de la reducción, se observaron dos bandas mayoritarias que muestran migraciones electroforéticas consistentes con las de las cadenas pesadas y ligera de una molécula de inmunoglobulina G.

ES 2 262 186 T3

TABLA 5

RESUMEN DE LOS DATOS DE PUREZA

AZUL COOMASSIE COLOIDAL, CONDICIONES NO REDUCTORAS

Muestra	Calle	Área porcentual (compuesto principal)
LDP-02/3A9/Lote#1	5	84,4%

RESUMEN DE LOS DATOS DE PUREZA

AZUL COOMASSIE COLOIDAL, CONDICIONES NO REDUCTORAS

Muestra	Calle	Área porcentual, bajo PM	Área porcentual, bajo PM
LDP-02/3A9/Lote#1	9	68,6%	30,5%

2. Análisis por transferencia Western

Se analizaron las muestras y los patrones por SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente. Resumiendo, se analizaron muestras reducidas y no reducidas en un gel de Tris-Glicina al 4-20%. Se hicieron correr también por el gel patrones de peso molecular Novex Mark 12. Se cargaron volúmenes de alícuotas de 2,1 μ l y 4,5 μ l de la solución de 0,2143 mg/ml, dando 0,51 y 1,09 μ g de proteína, respectivamente, en las calles designadas para muestras en el gel de SDS.

Después de la SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas de la muestra del gel a nitrocelulosa, según las instrucciones del aparato de transferencia Western Novex. El tampón de transferencia utilizado fue tampón 1X Tris-Glicina en metanol al 20%. Después de aproximadamente 2 horas, se retiró la mancha de la nitrocelulosa del aparato de transferencia y se lavó con agua DDI. Se bloqueó entonces la mancha de la nitrocelulosa a 37°C durante 35 minutos en tampón Tris (20 mM), que contenía un 3% de gelatina y 0,1% de Tween 20. Se retiró la mancha de la solución bloqueante y se lavó dos veces con tampón Tris. Se añadió una solución de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón, que se preparó diluyendo x1000 una solución madre de anticuerpos anti-IgG de ratón con solución Tris 20 mM-3% de BSA, a la mancha, y se incubó a 2-8°C durante una noche. Después de la incubación, la mancha se lavó con cuatro cambios de tampón Tris durante 5 minutos cada vez. Se añadió solución de conjugado de anti-IgG de cabra y fosfatasa alcalina, preparada diluyendo x5000 el conjugado de anti-IgG de cabra y fosfatasa alcalina con solución Tris-20 mM-3% de BSA, a la mancha y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la incubación, se lavó la mancha con cuatro cambios de tampón Tris durante 5 minutos cada uno. Se añadió sustrato de BCIP/NBT (sal de p-toluidina de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilo/cloruro de nitro-azul de tetrazolio), 10 ml de una vez, a la mancha. La mancha se reveló a temperatura ambiente con agitación. La reacción se detuvo lavando la mancha con tampón Tris. Se repitió el procedimiento anterior usando anticuerpos de cabra anti-IgG humana en vez de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón.

Tanto en condiciones reductoras como no reductoras, usando el reactivo anti-IgG de ratón, las muestras de IgG de 0,51 μ g y 1,09 μ g fueron claramente detectadas en la mancha de nitrocelulosa. La intensidad de las bandas aumentó al aumentar la concentración. En condiciones no reductoras, se detectó una banda principal, que migraba ligeramente más rápido que el marcador de 200.000 Daltons. Se detectaron también varias bandas más pálidas. Dos de estas bandas migraban más lentamente que la banda principal y aproximadamente otras tres bandas migraron más rápido. En condiciones reductoras, se detectaron dos bandas, características de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina G.

Usando el reactivo anti-IgG humana tanto en condiciones reductoras como no reductoras, se detectaron claramente las muestras de IgG de 0,51 μ g y 1,09 μ g en la mancha de nitrocelulosa. La intensidad de las bandas aumentó al aumentar la concentración. En condiciones no reductoras, se detectó una banda principal, correspondiente a una especie con un marcador de peso molecular aparente ligeramente menor que 200.000 Daltons. Las bandas más pálidas observadas en la mancha, detectadas con la anti-Ig de ratón, también fueron detectadas. La intensidad de la inmunotinción era mayor para todas las bandas cuando se detectaron con anti-IgG humana. Se detectaron varias bandas adicionales, no observadas en la otra mancha. Es probable que estas bandas correspondan a fragmentos de IgG que carecen de epitopos reconocidos por el anti-IgG de ratón. En condiciones reductoras, se detectó una banda característica de la cadena pesada de una inmunoglobulina G. Como el anticuerpo era específico para la porción Fc de la IgG humana, no se detectó la cadena ligera. Se observaron varias bandas minoritarias, no observadas en la mancha revelada con anti-IgG de ratón, cuando la detección fue llevada a cabo con anti-IgG humana. Esta diferencia entre las dos manchas puede ser el resultado de la presencia de fragmentos de IgG que carecen de epitopos para la unión al anti-IgG de ratón.

ES 2 262 186 T3

3. Enfoque isoelectrico

Se sometió LDP-02/3A9/Lote#1 a enfoque isoelectrico (IEF) y se tiñó con azul Coomassie coloidal. Se compararon los resultados obtenidos para LDP-02/3A9/Lote1 con patrones de IEF (enfoque isoelectrico por sus siglas en inglés) que fueron enfocados sobre el mismo gel.

Se añadieron 80 μ l de LDP-02/3A9/Lote#1 a una concentración nominal de 0,82 mg/ml, a un microconcentrador. El tampón citrato, en el que estaba el anticuerpo, fue cambiado tres veces con 160 μ l de tampón Tris (0,5 mM, pH 8,8). El volumen final de la muestra fue 135 μ l. Se calculó que la concentración final era de 0,486 mg/ml. Esta solución fue diluida dos veces con tampón para muestras de IEF 2X para obtener una concentración de 0,243 mg/ml. Se cargó una alícuota de 13 μ l de la solución de 0,243 mg/ml, dando 3,16 μ g de proteína, sobre la muestra designada del gel de IEF. Los artículos de control incluían patrones de IEF con pI 3,6-9,3 (Sigma, Cat #I-3018).

Se generó un gráfico patrón representando gráficamente la media de la migración a distancia relativa de ocho patrones de IEF frente al pI conocido para cada una de estas proteínas patrón. El ajuste de regresión lineal de estos datos dio una pendiente negativa de 0,03459 y una ordenada en el origen de 8,91857. La R^2 del ajuste era igual a 0,99206.

La Tabla 6 contiene las distancias medias a las que migraron los seis patrones de IEF y el LDP-02/3A9/Lote#1. Los pI calculados para LDP-02/3A9/Lote#1 también se muestran en esta tabla.

Usando los parámetros de regresión lineal de la gráfica patrón, se calculó que los pI aproximados de las cinco bandas para LDP-02/3A9/Lote#1 eran 7,88, 7,95, 8,09, 8,26, y 8,43, con el pico predominante representado por un pI de 8,09 (Tabla 6). El pI de este pico principal es favorable cuando se compara con un pI de 7,91 predicho, en base a la secuencia primaria de aminoácidos.

TABLA 6

Patrón	Distancia de migración*	pI ¹
Lectina	3,3 mm	8,8
Lectina	9,5 mm	8,6
Lectina	17,88 mm	8,2
Mioglobina	59,3 mm	6,8
Anhidrasa carbónica I	74,0 mm	6,6
Anhidrasa carbónica II	92,5 mm	5,9
β -Lactoglobulina A	105,8 mm	5,1
Inhibidor de tripsina	122,0 mm	4,6
Muestra	Distancia de migración	pI ¹
LDP-02/3A9/Lote #1 (Banda 1)	14,0 mm	8,43
LDP-02/3A9/Lote#1 (Banda 2)	19,0 mm	8,26
LDP-02/3A9/Lote #1 (Banda 3)	24,0 mm	8,09
LDP-02/3A9/Lote #1 (Banda 4)	28,0 mm	7,95
LDP-02/3A9/Lote #1 (Banda 5)	30,0 mm	7,88

* Media

¹ Basado en la curva patrón (pI frente a distancia migratoria) donde:

pI de la muestra = Ordenada en el origen - pendiente (distancia de migración de la muestra).

4. Análisis de la composición de aminoácidos

Se realizó el análisis de la composición de aminoácidos para determinar el contenido proteico y la composición de aminoácidos LDP-02/3A9/Lote#1 y confirmar la identidad.

Se retiraron primero alícuotas de 45 μ l por triplicado para hidrólisis. Se realizó la hidrólisis a 165°C durante 60 minutos usando vapores de HCl 6N. Como control, el recipiente de hidrólisis contenía una proteína patrón, que fue hidrolizada simultáneamente con el LDP-02/3A9/Lote#1. También se cromatografiaron patrones de aminoácidos antes y después del análisis del LDP-02/3A9/Lote#1. Los artículos control incluían seroalbúmina bovina (solución

ES 2 262 186 T3

control Tektagen:310:197A) como proteína patrón y mezcla de hidrolizado de aminoácidos (solución control Tektagen:310:199A) como patrón de aminoácidos.

El método del ensayo empleaba el análisis del hidrolizado de proteína resuspendido o solución de aminoácidos libres por "HPLC" de intercambio iónico con reacción de ninhidrina post-columna y monitorización de la absorbancia a dos longitudes de onda. Se cuantificó la absorbancia a ambas longitudes de onda por comparación con una tabla de calibración obtenida analizando patrones de aminoácidos por triplicado.

En la Tabla 7 se presenta la composición de aminoácidos. Se determinó que la concentración proteica del LDP-02/3A9/Lote#1 era de 0,709 mg/mL. Después de corregir la falta de cuantificación de W y C, la concentración de proteína se revisó a 0,740 mg/mL. Los datos y los cálculos pertinentes se resumen en la Tabla 8.

Para LDP-02/3A9/Lote#1, se hizo un solo punto temporal de hidrólisis (60 min) a 165°C usando vapores de HCl 6N. Se aplicaron factores de corrección, que se habían obtenido a partir de la proteína patrón (BSA), a las determinaciones del contenido proteico (Tabla 8).

En las condiciones de este método, los valores de porcentaje en moles obtenidos para la prolina (Tabla 7) pueden estar ligeramente elevados, debido a la presencia de un pico coeluyente de cisteína. En consecuencia, la exactitud de la cuantificación de la prolina es dependiente de la muestra, en base a la cantidad de cisteína presente en los hidrolizados de la muestra. Para este análisis, el contenido de prolina ha sido corregido usando un factor de corrección derivado de BSA (Tabla 8). La exactitud de esta corrección es dependiente de la muestra, en base a las cantidades relativas de cisteína en la BSA (6,0%) y en la muestra.

La composición predicha de aminoácidos de LDP-02 como porcentaje relativo /frecuencia o porcentaje en moles) en base a la secuencia nucleotídica de las cadenas pesadas y ligeras (% predicho) y los resultados reales del análisis de aminoácidos (% real) se presentan en la Tabla 9. La comparación de los valores predichos frente a los reales muestra una buena correlación, excepto para la prolina, que, como se ha descrito previamente, es probablemente artificialmente alta debido a un pico coeluyente de cisteína.

TABLA 7

Muestra:	LDP-02/3A9/LOTE#1 Sin corrección	LDP-02/3A9/LOTE#1 Con factores de corrección obtenidos a partir de BSA	LDP-02/3A9/LOTE#1 con corrección para W/C ¹ y factores derivados de BSA
<u>AA</u>	<u>% moles</u>	<u>% moles</u>	<u>% moles</u>
N/D	9,1	9,0	8,6
T	6,5	7,5	7,2
S	9,2	13,3	12,7
Q/E	11,4	11,3	10,8
P	8,2	9,8	9,4
G	7,8	7,4	7,1
A	5,9	5,8	5,6
V	10,2	9,5	9,1
M	0,3	0,7	0,7
I	2,5	2,6	2,5
L	8,2	7,9	7,6
Y	5,2	5,0	4,8
F	3,4	3,4	3,3
H	2,2	2,2	2,1
K	7,0	6,9	6,6
R	2,9	2,9	2,8
Total	100,0		

¹ - El factor de correlación es 0,958, basado en el contenido de W y C de 1,8% y 2,4%, respectivamente.

ES 2 262 186 T3

TABLA 8

Determinación del contenido proteico

5	AA	Media nmoles	² Factor de corrección	nmoles corregidos	PM residuo	Cantidad encontrada (ng)
	N/D	5,954	0,991	5,900	115,1	679
	T	4,243	1,156	4,905	101,1	496
	S	6,054	1,448	8,766	87,1	764
10	Q/E	7,436	0,991	7,369	128,1	944
	P	5,365	0,830	4,453	97,1	432
	G	5,080	0,951	4,831	57,1	276
	A	3,884	0,983	3,818	71,1	271
15	V	6,681	0,930	6,213	99,1	616
	M	0,221	2,433	0,538	131,2	71
	I	1,606	1,036	1,664	113,2	188
	L	5,379	0,961	5,169	113,2	585
20	Y	3,374	0,954	3,219	163,2	525
	F	2,229	0,992	2,211	147,2	325
	H	1,442	0,981	1,415	137,2	194
	K	4,616	0,984	5,542	125,2	582
25	R	1,922	1,005	1,392	156,2	302

	Cantidad total inyectada en la columna (ng):	7250
30	Volumen de reconstitución (μ l):	220
	³ Cantidad total hidrolizada (ng):	31900
	Cantidad total hidrolizada (μ g):	31,9
	Volumen de muestra original (μ l):	45
35	Volumen de muestra diluida (μ l):	45
	Valor de alícuota para hidrólisis (μ l):	45
	Concentración de proteína (mg/ml):	0,709
	Concentración de proteína (mg/ml) después de la corrección para W/C:	0,740

¹ El contenido proteico no está corregido para cisteína y triptófano.

² Se ha aplicado un factor de corrección obtenido a partir de BSA a cada aminoácido detectado.

³ ng totales hidrolizados = (ng totales inyectados x volumen de reconstitución (50 μ l)).

TABLA 9

Composición de aminoácidos

50	Símbolo del aminoácido	Aminoácido	Número	% Predicho	% Real
	A	Ala	68	5,06	5,6
55	C	Cys	32	2,38	---
	D	Asp	56	4,17	---
	E	Glu	68	5,06	---
60	F	Phe	40	2,98	3,3
	G	Gly	90	6,70	7,1
65	H	His	28	2,08	2,1
	I	Ile	30	2,23	2,5

ES 2 262 186 T3

TABLA 9 (continuación)

5	Símbolo del aminoácido	Aminoácido	Número	% Predicho	% Real
	K	Lys	96	7,14	6,6
	L	Leu	98	7,29	7,6
10	M	Met	10	0,74	0,7
	N	Asn	50	3,72	---
	P	Pro	94	6,99	9,4
15	Q	Gln	64	4,76	---
	R	Arg	36	2,68	2,8
20	S	Ser	170	12,65	12,7
	T	Th	100	7,44	7,2
	V	Val	126	9,38	9,1
25	W	Trp	24	6,98	---
	Y	Tyr	64	4,76	4,8
30	N/D	Asn/Asp	106	7,89	8,6
	Q/E	Gln/Glu	132	9,82	10,8

35

5. Análisis EM MALDI-TOF

Se analizó LDP-02/3A9/Lote#1 por EM MALDI-TOF para determinar el peso molecular. Se detectó un pico principal con una masa centrada a 149.808 Da. El pico centrado a 74.927 Da representaba el ion +2 de la especie encontrada en el pico principal. Se observará que la masa del ion +2 no es exactamente la mitad del ion M+H; esta ligera disparidad se debe probablemente a la imprecisión experimental, que está dentro de +/-0,2% del valor medido.

En base a la secuencia primaria predicha del anticuerpo, la masa molecular esperada debería ser de 147.154 Da. La diferencia de masa de 2.654 Da entre la masa molecular de la IgG observada y la predicha, muy probablemente, puede atribuirse a la glicosilación de la molécula. Esta diferencia observada representaría un nivel de glicosilación de aproximadamente 1,8%.

B. Afinidad

En primer lugar, se realizó la titulación del LDP-02/3A9/Lote#1 y del ACT-1 murino (Lote#2) usando citometría de flujo en células HUT-78 de origen humano. Para explicarlo brevemente, se suspendieron $1,0 \times 10^6$ células HUT 78 en un volumen de 100 μ l de ACT-1 murino biotinilado (Lote#2), IgG1 murina biotinilada (Lote#1, preparado en LeukoSite, Inc.), LDP-02/3A9/Lote#1 biotinilado, o IgG humana biotinilada (Jackson ImmunoResearch, Avondale, PA; Lote 25794) durante 20 minutos a 4°C, después de lo cual se retiraron los anticuerpos. Salvo indicación en contrario, todos los reactivos se diluyeron en PBS 0,15 M/1,0% de FCS/0,1% de azida sódica. Las concentraciones variables para ambos anticuerpos incluían 30 μ g/ml (ACT-1 murino sólo), 15 μ g/ml, 7,5 μ g/ml, y subsiguientes diluciones 1:10 de cada una. Después de separar los anticuerpos primarios, las células se suspendieron entonces en 100 μ l de estreptavidina ficoeritrina (Dako Corp., Carpinteria, CA) diluida 1:200. Después de lavar en 200 μ l de PBS, se resuspendieron las en 0,5 ml de PBS/1% de formalina y se refrigeraron hasta su análisis. Las muestras se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) usando un láser de 488 nm para excitar la ficoeritrina. Para cada muestra, se analizó un mínimo de 10.000 células y se calculó la fluorescencia media de canal (MCF). Todas las muestras fueron realizadas por duplicado.

Estos estudios de titulación indicaron que, a concentraciones de aproximadamente 1,0 μ g/ml, se aproximaba a la fluorescencia máxima usando tanto ACT-1 murino como LDP-02/3A9/Lote#1 (Figura 15). Se consiguió la fluorescencia media de canal semimáxima a concentraciones de LDP-02 menores que para ACT-1 murino (0,1 μ g/ml para ACT-1 murino biotinilado Lote#2, y 0,02 μ g/ml para LDP-02/3A9/Lote#, respectivamente).

ES 2 262 186 T3

Las valoraciones relativas de afinidad (y especificidad) fueron realizadas utilizando citometría de flujo y unión competitiva cruzada de LDP-02 y anticuerpo Act-1 murino y viceversa en células HuT-78 de origen humano. Resumiendo, se suspendieron $1,0 \times 10^6$ HuT-78 células, o bien en $100 \mu\text{l}$ de Act-1 murino biotinilado (Lote#2) a $0,1 \mu\text{g/ml}$ con concentraciones variables de 1°HUM ACT-1 no conjugado o de Act-1 murino no conjugado durante 20 minutos a 4°C , después de lo cual se retiraron los anticuerpos. En un experimento aparte, se usaron $100 \mu\text{l}$ de LDP-02/3A9/Lote#1 biotinilado a $0,02 \mu\text{g/ml}$ con concentraciones variables de ACT-1 murino no conjugado ACT-1 (Lote#2) y LDP-02/3A9/Lote#1 no conjugado. Las concentraciones de anticuerpos biotinilados mantenidas constantes eran la concentraciones que daban lugar a una fluorescencia media de canal (MCF) semimáxima en células HUT-78 teñidas en idénticas condiciones, como se demostró anteriormente. Salvo indicación en contrario, todos los reactivos se diluyeron en PBS $0,15 \text{ M}/1,0\%$ de FCS/ $0,1\%$ de azida sódica. Las concentraciones variables para ambos anticuerpos variaban en incrementos semilogarítmicos de $2,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ a $5,0 \times 10^{-11} \text{ M}$. Después de separar los anticuerpos primarios, las células fueron entonces resuspendidas en $100 \mu\text{l}$ estreptavidina ficoeritrina (Dako Corp., Carpinteria, CA) diluida 1:200. Después de lavar en $200 \mu\text{l}$ de PBS, las células fueron resuspendidas en $0,5 \text{ ml}$ de PBS/ 1% de formalina y refrigeradas hasta ser analizadas. Las muestras se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) usando un láser de 488nm para excitar la ficoeritrina. Para cada muestra, se analizó un mínimo de 10.000 células y se calculó MCF. Todas las muestras se realizaron por duplicado. La CI_{50} se determinó como la concentración de anticuerpo no conjugado que producía una reducción del 50% en la FMC del anticuerpo homólogo biotinilado.

Se realizaron estimaciones de afinidad en cinco experimentos independientes competitivos cruzados entre LDP-02 (1°HUM ACT-1) y ACT-1 murino. Cuando se usó Act-1 murino biotinilado como anticuerpo mantenido constante en el ensayo, los valores de CI_{50} ($\pm 1 \text{ SEM}$) para LDP-02 ($5,43 \pm 0,86 \text{ nM}$) fueron estadísticamente menores que para ACT-1 murino ($7,94 \pm 1,17 \text{ nM}$; $p=,02$, prueba t de dos colas: parejas de dos muestras para las medias), mientras que la IgG1 humana irrelevante o la IgG1 murina no tenían ningún efecto competitivo (todos los experimentos se resumen en la Tabla 10; un experimento se muestra en la Figura 16). De forma similar, cuando el LDP-02/3A9/Lote#1 era el anticuerpo mantenido constante en el ensayo, se necesitaba mayor concentración de Act-1 murino no conjugado que de LDP-02/3A9/Lote#1 para competir con LDP-02 y expulsarlo de las membranas de las células HuT-78 ($\text{CI}_{50} = 6,3 \text{ nM}$ frente a $4,3 \text{ nM}$, respectivamente). En cada experimento, LDP-02 tenía una CI_{50} menor que el Act-1 murino. Estos resultados demuestran que LDP-02 era específico para el epitopo reconocido por el Act-1 murino y que su afinidad de unión era mejor que la del anticuerpo murino.

TABLA 10

Valoración de la afinidad para ACT-1 murino y ACT-1 humanizado (LDP-02)

Experimento #	Anticuerpo	Lote #	$\text{CI}_{50}(\text{nM})$
1	ACT-1 (murino)	2	7,57
2		2	10,95
3		2	6,02
4		2	4,91
5		2	10,24
		MEDIA \pm SEM	$7,94 \pm 1,17$
1	LDP-02 (humanizado)	7	4,34
2		7	6,13
3		8/9	4,71
4		8/9	3,53
5		8/9	8,44
		MEDIA \pm SEM	$5,43 \pm 0,86$

$p = 0,02$

Prueba t de dos colas: Parejas de dos muestras para las medias

C. *Reactividad cruzada de especie*

Se utilizó citometría de flujo para evaluar la reactividad cruzada de especie. Se añadieron 100 μ l de sangre anticoagulada con EDTA extraída de ser humano, perro, gato, cobaya o rata a tubos FACS. Se separó el plasma y se resuspendieron entonces las pellas de sangre en 100 μ l de, o bien LDP-02/3A9/LOTE#1 biotinilado, IgG humana biotinilada irrelevante (Jackson ImmunoResearch, Avondale, PA), Act-1 murino biotinilado Lote#2, o IgG1 murina biotinilada irrelevante (Dako Corp., Carpinteria, CA) a una concentración de 15 μ g/ml. Salvo indicación en contrario, todos los reactivos se diluyeron en PBS 0,15 M/1,0% de FCS/0,1% de azida sódica. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos durante 20 minutos a 4°C después de lo cual los anticuerpos fueron retirados por lavado. Se incubaron entonces las células con 100 μ l de estreptavidina ficoeritrina diluida 1:200 (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) durante 20 minutos a 4°C. Se dializaron entonces los glóbulos rojos de la sangre usando un reactivo de lisis comercial (solución de lisis FACS, Becton Dickinson, San Jose, CA) según el protocolo del fabricante. Después de lavar en PBS, se resuspendieron las células en 0,5 ml de PBS/1% de formalina y se refrigeraron hasta su análisis. Las muestras fueron analizadas en un FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) usando un láser de 488nm para excitar la ficoeritrina. Se ajustó la puerta de adquisición de linfocitos con parámetros de dispersión de la luz hacia adelante y a 90°C. Se analizaron 10.000 células para cada muestra.

LDP-02/3A9/Lote#1 biotinilado reconocía una subpoblación de linfocitos humanos con un patrón heterogéneo de tinción, similar al producido con el Act-1 murino y distinto del patrón producido por tinción con controles emparejados en cuanto a isotipo humano o murinos. Además, cuando se examinaron en linfocitos de perro o de gato, tanto el LDP-02/3A9/Lote#1 como el Act-1 murino producían un patrón de tinción heterogéneo similar al derivado usando linfocitos humanos. El LDP-02/3A9/Lote#1 o el ACT-1 murino no reconocían los linfocitos de rata o de cobaya en estas condiciones.

D. *Unión a C1q*

Se utilizó citometría de flujo para valorar el potencial de LPD-02 para unirse al componente C1q, usando una técnica descrita previamente (Sims, M.J. *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2296-2308 (1993)). Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humana por separación por densidad de Ficoll estándar. Primero, se bloquearon 375.000 células con suero normal de conejo al 10% en PBS durante 10 minutos a 4°C. Una vez separadas por lavado, las células se incubaron con 100 μ l de, o bien (a) CAMPATH-1H (Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K.), (b) IgG1 humana (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), (c) LDP-01 (un derivado del anticuerpo anti-CD18 descrito en WO 93/02191 (publicada el 4 de febrero de 1993) y Sims, M.J., *et al.*, *J. Immunol.* 151(4): 2296-2308 (1993), que contiene dos sustituciones de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada de IgG1 (Leu²³⁵ \rightarrow Ala²³⁵ y Gly²³⁷ \rightarrow Ala²³⁷), también denominado "FcRmut CD18", Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K.), o (d) LDP-02 (1°C hum ACT-1 Lote#8/9) a 10 μ g/ml durante 20 minutos a 4°C. CAMPATH-1H sirvió como anticuerpo control positivo, mientras que LDP-01 e IgG1 humana se utilizaron como anticuerpos control negativos. Todos los reactivos se diluyeron en 2% de BSA/PBS. Como control negativo adicional, también se añadió 2% de BSA/PBS en solitario. Se retiró entonces el anticuerpo por lavado, y se resuspendieron las células en 50 μ l de componente C1q (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) de complemento humano a 10 μ g/ml durante 30 minutos a 4°C. Las células fueron entonces lavadas y resuspendidas en 100 μ l de anticuerpo de conejo anti-C1q humano conjugado a FITC (Dako Corp., Carpinteria, CA) a 20 μ g/ml durante 20 minutos a 4°C. Después de lavar en 200 μ l PBS, las células fueron resuspendidas en 0,5 ml de PBS/1% de formalina y refrigeradas hasta su análisis. Las muestras se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) usando un láser de 488 nm para excitar FITC. Para cada muestra, se analizó un mínimo de 10.000 células y se calculó la fluorescencia media de canal (MCF).

Las PBMC humanas incubadas con CAMPATH-1H fijaron C1q humano, dando como resultado un desplazamiento significativo en MCF, mientras que los patrones de tinción provocados por incubación de las PBMC con LDP-01, BSA, o IgG1 humana fueron todos similares y se caracterizaron por una tinción de fondo relativamente baja. el patrón de tinción producido por la preincubación de PMBC con LDP-02 fue idéntico al producido en estas muestras control negativas, lo que demuestra que LDP-02 no fija C1q en estas condiciones.

E. *Lisis mediada por complemento*

Se examinó la capacidad de LDP-02/3A9/Lote#1 para participar en la lisis celular mediada por complemento usando un protocolo ya descrito en Bindon, C.I., *et al.* (*Transplantation*, 40: 538-544 (1985)). Se extrajo sangre humana heparinizada asépticamente y se recogió el plasma y se puso inmediatamente sobre hielo. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación durante 15 minutos sobre una capa de Ficoll-Hypaque, densidad 1,077 g/ml, y se lavaron dos veces en medio completo consistente en RPMI 1640/10% de FCS/100 U/ml de penicilina/100 μ g/ml de estreptomycin/L-glutamina 2,0 mM. Se incubaron entonces 25 millones de células a 37°C durante 1 h en 150 μ Ci de ⁵¹ cromato de sodio en solución salina estéril (E.I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE). Las células fueron lavadas dos veces en medio y resuspendidas a 10⁶/ml. Se añadieron entonces 50 μ l de la suspensión (5,0 x 10⁴ células) a pocillos de una placa de microtitulación de fondo en U, que contenía 100 μ l de, o bien (a) CAMPATH-1H (Therapeutic Center, Cambridge, U.K.), (b) CAMPATH-1G (Therapeutic Center, Cambridge, U.K.), (c) IgG1 humana (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), (d) LDP-02/3A9/Lote#1, o (e) LDP-01 (FcRmut CD18, Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K. (véase más arriba)) a concentraciones de 50, 25, 5, 2,5, y 0,5 μ g/ml en medio. Los anticuerpos CAMPATH-1 fueron utilizados como anticuerpos control positivos en el ensayo, mientras que IgG1 humana y LDP-01 fueron utilizados como controles negativos. Los pocillos adicionales contenían

ES 2 262 186 T3

células suspendidas en 100 μ l de 0,1% de Triton-X-100 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) en medio completo. Las células incubadas con Triton-X-100 fueron usadas para medir la liberación total, mientras que los pocillos control sin anticuerpo fueron usados para medir la liberación espontánea. Después de incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 50 μ l de plasma autólogo como fuente de complemento a cada pocillo hasta una concentración final de 20%. Las células fueron incubadas durante 45 minutos a 37°C, después centrifugadas a 100 g durante 2 minutos, y se recogieron 100 μ l de los sobrenadantes. Se midió el ^{51}Cr liberado en un contador gamma Cobra II todas las muestras (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Todas las muestras fueron hechas por duplicado. El porcentaje de liberación específica de ^{51}Cr fue calculado usando la fórmula:

$$\text{Liberación específica} = \frac{(\text{ensayo-espontáneo}) \times 100\%}{\text{total-espontáneo}}$$

Como han descrito previamente Bindon *et al.* (*Transplantation*, 40: 538-544 (1985)), tanto CAMPATH-1H como ATH-1G inducían hasta un 35% de lisis mediada por complemento de PBMC humanas de manera dependiente de la dosis. Además, como era de esperar, los controles de IgG1 humana y LDP-01 (Fc-mut CD18) no indujeron ninguna lisis celular detectable. LDP-02 no midió la lisis celular a ninguna de las concentraciones examinadas, hasta 25 $\mu\text{g/ml}$ inclusive (Figura 17).

F. Toxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se utilizaron blastos CD3+ humanos como células diana para valorar la capacidad de LDP-02 para participar en la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC). Se generaron blastos CD3+ en placas de 24 pocillos revestidos con el anticuerpo RT66 anti-CD3 a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ diluido en PBS. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCS) humanas fueron aisladas por centrifugación durante 15 minutos sobre una capa de Ficoll-Hypaque, densidad 1,077 g/ml, lavadas y resuspendidas en medio completo, según se ha descrito en la sección anterior. Después se añadieron 2 millones de células a cada pocillo de la placa de 24 pocillos y se incubaron a 37°C, 5% CO_2 durante 4 días. Las células fueron entonces transferidas a un matraz de cultivo e incubadas a 37°C, 5% CO_2 , en medio con IL-2 recombinante humana (Genzyme Corp., Cambridge, MA) a una concentración de 10 unidades/ml. Después de tres días en cultivo, 10,0 x 10⁶ blastos CD3 fueron entonces incubados a 37°C durante 45 minutos en 150 μCi ^{51}Cr cromato de sodio en solución salina estéril (E.I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE; Lote#95M682). Después de dos lavados en medio completo, las células fueron resuspendidas hasta 2 x 10⁵ células/ml, y se añadieron 50 μ l (10,000 células) de la suspensión a los pocillos de una placa de microtítulo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U. Los pocillos contenían 50 μ l de, o bien CAMPATH-1H (Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K.) o LDP-02/3A9/Lote#1 a concentraciones finales de 50, 5, 2,5, 0,5, 0,25, o 0,05 $\mu\text{g/ml}$ en medio. Las células fueron incubadas con anticuerpos durante 30 minutos a temperatura ambiente después de lo cual se añadieron 0,5 x 10⁶ PBMC recién aisladas (gradiente de ficoll-hypaque, 2 lavados en medio completo a 37°C), procedentes de un donante diferente, a cada pocillo como células efectoras (relación efectoras:diana de 50:1). A los pocillos adicionales, se añadieron 100 μ l de 5% Triton-X-100 en medio (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). Las células incubadas con Triton-X-100 fueron usadas para medir la liberación total, mientras que los controles sin anticuerpo y las células efectoras se incluyeron para medir la liberación espontánea de radiactividad. Las células se centrifugaron a 100g durante 2 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante 20 horas a 37°C, 5% CO_2 , después de lo cual las células fueron transferidas a una placa de 96 pocillos de fondo en V y se dejaron precipitar a temperatura ambiente. Se recogieron 100 μ l de sobrenadantes y se midió la reactividad liberada usando un contador gamma Cobra II (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Todas las muestras fueron realizadas por duplicado. El porcentaje de liberación específica de ^{51}Cr se calculó usando la fórmula:

$$\text{Liberación específica} = \frac{(\text{ensayo-espontáneo}) \times 100\%}{\text{total-espontáneo}}$$

Como demostraron previamente Sims, M.J. *et al.*, *J. Immunol.*, 151(4): 2296-2308 (1993), CAMPATH-1H participó en ADCC de manera dependiente de la dosis, provocando hasta aproximadamente un 30% de liberación específica de ^{51}Cr a concentraciones $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$. No se detectó liberación específica alguna en pocillos que contenían LDP-02 a ninguna de las concentraciones examinadas.

G. Inhibición de la adhesión a MAdCAM-1

Se valoró la capacidad de LDP-02 para inhibir la unión de $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM-1 usando células $\alpha 4\beta 7+$ RPMI 8866 (un linfoma humano de células B) marcadas fluorescentemente y una quimera MAdCAM-1 que comprende el dominio

ES 2 262 186 T3

extracelular de MAdCAM-1 humano fusionado a la región Fc de una IgG1 humana (una región constante derivada del mismo constructo usado para hacer la región constante de LDP-02 mutado en Fc).

1. Construcción de la quimera MAdCAM-IgG

Se usó un clon MAdCAM-1 humano designado pcDhuMAd4 (ADNc del clon 4 en pCADN3; Shyjan, A.M. *et al.*, *J. Immunol.*, 156: 2851-2857 (1996); cuyas enseñanzas se incorporan aquí íntegramente como referencia) como molde para amplificación por PCR de las regiones extracelulares de MAdCAM-1 humano que habían de ser fusionadas con la región constante de IgG1 humana, según se describe en la Solicitud Internacional n° PCT/US96/02153 (WO 96/24673), presentada el 12 de febrero de 1996, que es una continuación en parte de la n° de serie EE.UU. 08/523,004, presentada el 1 de setiembre de 1995, que es una continuación en parte de la n° de serie EE.UU. 08/386,857, presentada el 10 de febrero de 1995. Para construir la quimera MAdCAM-IgG, se sintetizó el cebador HUMADIG4/2 (SEC ID NO:62), que contiene el extremo 5' de la secuencia codificante de mAdCAM-1 humana (codon ATG, en negrilla):

HindIII
5' -GGAAGCTTCCACCATGGATTTCGGACTGGCCC - 3'

Este cebador 5' fue usado junto con un cebador 3' denominado HUMADIG3 para amplificar una región codificante de todo el dominio extracelular de la MAdCAM-1 humana. El cebador 3' HUMADIG3 (SEC ID NO:63) tiene la siguiente secuencia:

SpeI
5' -GGACTAGTGTTTGGACGAGCCTGTTG - 3'

Los cebadores fueron diseñados con un sitio HindIII 5' o sitios 3' SpeI según se indica. Estos cebadores fueron utilizados para amplificar por PCR un fragmento MAdCAM usando un kit optimizador de PCR de Invitrogen (San Diego, CA). Los productos de la PCR fueron digeridos con las enzimas HindIII y SpeI para generar extremos para la clonación y fueron purificados por electroforesis en gel usando el sistema de aislamiento de ADN Glassmax (Gibco, Bethesda, MD).

Se cortó un fragmento de aprox. 1 kb que abarcaba las regiones CH1, H (bisagra), CH2 y CH3 por digestión con SpeI y EcoRI a partir de un constructo codificante de una cadena pesada γ 1 de inmunoglobulina humana que tenía una región constante humana mutada en Fc. La región constante humana en este constructo corresponde a la obtenida por amplificación por PCR de la cadena pesada de CAMPATH-1H (Reichmann, L. *et al.*, *Nature*, 322: 323-327 (1988)) como describen by Sims, M.J. *et al.* (*J. Immunol.*, 151: 2296-2308 (1993)) y Waldmann *et al.* (WO 93/02191, 4 de febrero de 1993 (página 23)). Las mutaciones en la región constante de este constructo (Leu²³⁵ → Ala²³⁵ y Gly²³⁷ → Ala²³⁷) fueron diseñadas para reducir la unión a los receptores Fc γ , y fueron producidas por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos. Así, la fusión MAdCAM-Ig producida contiene el fragmento de región constante SpeI-EcoRI descrito por Sims *et al.* (*J. Immunol.*, 151: 2296-2308 (1993)) y Waldmann *et al.* (WO 93/02191), excepto por la introducción de mutaciones Leu²³⁵ → Ala²³⁵ y Gly²³⁷ → Ala²³⁷.

Se aisló el fragmento SpeI-EcoRI de 1 kb codificante de la región constante de IgG1 mutada en Fc por electroforesis en gel usando el sistema de aislamiento de ADN Glassmax (Gibco, Bethesda MD). Este fragmento de región constante y el fragmento HindIII-SpeI que contenía todo el dominio extracelular de MAdCAM fueron ligados en una ligación de tres vías al vector pEE12 (Stephens, P.L. y M.L. Cockett, *Nucl. Acids Res.*, 17: 7110 (1989) y Bebbington, C.R. y C.C.G. Hentschel, 1987, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells*, (Academic Press, N.Y.), que había sido digerido con HindIII y EcoRI. Se obtuvieron transformantes de la cepa bacteriana DH10B. Se hizo crecer a las colonias y se analizaron las preps miniplásmido por cartografía de restricción. Se secuenció un constructo, que codifica una proteína de fusión que contiene todo el dominio extracelular de MAdCAM-1 (constructo HuMAdIg21) fusionado a la región constante de IgG1 mutada en Fc, a través de toda la porción MAdCAM-1, confirmando la apropiada fusión de segmentos y la ausencia de mutaciones inducidas por la PCR. La quimera fue producida en células NSO y purificada por cromatografía de afinidad por Proteína A estándar.

2. Ensayo de adhesión

Se revistió una placa de 96 pocillos de fondo plano y de alta unión (Costar) durante 1 h a 37°C con 50 μ l de quimera MAdCAM-1 diluida a 2,5 μ g/ml en tampón carbonato, pH 9,5. Se lavaron entonces los pocillos una vez con tampón de lavado (Tris HCl 50 mM, NaCl 0,14 M, MnCl₂ 1 mM, pH 7,2) usando una lavadora automática de microplacas (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) y se bloquearon durante 1,5 h a 37°C con 100 μ l de 10% de FBS diluido en PBS.

ES 2 262 186 T3

Se lavaron primero células RPMI 8866 (una línea humana de linfoma de células B que expresa $\alpha 4\beta 7$ (y no $\alpha 4\beta 1$) (Erle, D.J., *et al.*, *J. Immunol.*, 153:517 (1994); una donación de D. Erle)) en 20 ml de PBS (4°C) y se resuspendieron a $4,0 \times 10^6$ células/ml en PBS. Se reconstituyó BCECF (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y 6)-carboxi fluoresceína, éster acetoximetílico; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) a $50 \mu\text{g/ml}$ en DMSO y se añadió a la suspensión celular a una dilución final de 1:500. Después de incubar durante 30 minutos a 37°C, se lavaron las células entonces en tampón de ensayo (HBSS con 2% de suero bovino fetal, HEPES 25 mM, penicilina/estreptomicina, pH 7,2), y se añadieron 50.000 células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en V. Las células fueron entonces resuspendidas en $100 \mu\text{l}$ de, o bien (a) Act-1 murino, (b) IgG1 murina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), (c) LDP-02/3A9/Lote#1, o (d) IgG1 humana (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a concentraciones de 15,0 a $0,00075 \mu\text{g/ml}$ en tampón de ensayo durante 10 minutos a temperatura ambiente. La placa revestida con la quimera MAdCAM-1 se lavó para separar el tampón bloqueante y entonces se transfirieron estas células RPMI 8866 marcadas fluorescentemente a cada pocillo. La placa se puso sobre un agitador de plataforma (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) a 40 RPM durante 30 minutos a temperatura ambiente envuelta en una lámina de aluminio. Las células no unidas se separaron mediante una sola etapa de lavado y seguidamente se midió la fluorescencia (excitación a 485 nm, lectura a 535 nm) con un Analizador Concentrador de Fluorescencia (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME) antes y después del lavado. Se calculó el porcentaje de células unidas para cada pocillo a partir de las unidades fluorescentes relativas (RFU) usando la fórmula:

$$\% \text{ de células unidas} = \frac{\text{RFU antes del lavado}}{\text{RFU después del lavado}} \times 100$$

Tanto LDP-02 como Act-1 murino inhibieron la adhesión de células RPMI 8866 a MAdCAM humana de una manera dependiente de la dosis (Figuras 18A-18B). Las concentraciones que inhibieron la adhesión en un 50% (CI_{50}) fueron relativamente similares para Act-1 murino ($0,0018 \mu\text{g/ml}$) y LDP-02 ($0,0014 \mu\text{g/ml}$). Por lo tanto, LDP-02 inhibía funcionalmente la adhesión mediada por $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM-1 al menos al menos tan eficazmente como Act-1 murino.

Ejemplo 5

Anticuerpos humanizados adicionales

Como se ha descrito más arriba, se pueden hacer algunas variaciones del anticuerpo reformado designado en el Ejemplo 2 para mejorar la afinidad y/o disminuir la capacidad antigénica del anticuerpo reformado. Tales constructos incluyen, pero sin limitarse a ellos, los que tienen una o más de las siguientes mutaciones: mutación M4V en la cadena ligera, mutación R38K en la cadena pesada, mutación A40R en la cadena pesada, y retromutación I73T en la cadena pesada. Los mutantes pueden ser producidos individualmente (por ejemplo, una mutación en una cadena), o en varias combinaciones.

Por ejemplo, la Figura 19 muestra los resultados de la tinción de HuT 78 usando el anticuerpo reformado (diseñado en el Ejemplo 2) o un derivado con una mutación adicional en la cadena ligera (MV4) y dos mutaciones adicionales en la cadena pesada (R38K, A40R). Estos dos anticuerpos muestran patrones de tinción similares en células HuT 78 (Figura 19). Las mutaciones fueron realizadas cambiando la secuencia de ácido nucleico utilizando un kit de mutagénesis dirigida al sitio transformador (*Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit*) (Clontech) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se hicieron mutaciones tanto de las regiones variables de cadena pesada como de las de cadena ligera con fragmentos variables clonados en pCR-Script™. Se usó el trans oligo Sca I/Stu I (Clontech) para el trans oligo. Las secuencias de los oligos mutagénicos fueron las siguientes (SEC ID NOS:38-40):

H/R38K (SEC ID N°: 38):
5'-C TGG CCA ACG
H/I73T (SEC ID N°: 39):
5'-CAC ATT GAC TGT AGA CAC TTC CGC TAG CAC AGC C
L/M4V (SEC ID N°: 40):
5'-CCG GAG GTG ATG TTG TGG TGA CTC

Todas las demás manipulaciones, incluyendo la subclonación en los vectores de expresión pEE6hCMV-B y pEE12, y la construcción de plásmidos de expresión que contienen genes tanto de cadena ligera como de cadena pesada, fueron como se ha descrito para el anticuerpo reformado primario. Las transfecciones transitorias y la tinción celular también se hicieron como se ha descrito para el anticuerpo reformado primario.

REIVINDICACIONES

1. Una inmunoglobulina humanizada o fragmento de la misma de unión a antígeno, que se une selectivamente a integrina $\alpha 4\beta 7$, comprendiendo dicha inmunoglobulina o fragmento una región de unión a antígeno de origen no humano y al menos una porción de una inmunoglobulina de origen humano.

2. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, donde la porción de una inmunoglobulina de origen humano se deriva de una región constante humana.

3. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 2, donde la región constante humana es de tipo gamma.

4. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la región de unión a antígeno es de origen de roedor.

5. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 4, donde la región de unión a antígeno se deriva de anticuerpo monoclonal Act-1 murino.

6. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, donde la región de unión a antígeno comprende una región determinante de complementariedad de origen de roedor, y la porción de una inmunoglobulina de origen humano se deriva de una región de marco humana.

7. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 6, donde la región determinante de complementariedad se deriva de anticuerpo monoclonal Act-1 murino.

8. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha región de unión a antígeno de origen no humano comprende al menos una de tres regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) de una región variable de la cadena ligera y al menos una de tres regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) de una región variable de la cadena pesada, donde dichas regiones determinantes de complementariedad tienen las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación:

cadena ligera:

RDC1 aminoácidos 44-59 de SEC ID NO:12

RDC2 aminoácidos 75-81 de SEC ID NO:12

RDC3 aminoácidos 114-122 de SEC ID NO:12

cadena pesada:

RDC1 aminoácidos 50-54 de SEC ID NO:15

RDC2 aminoácidos 69-85 de SEC ID NO:15

RDC3 aminoácidos 118-129 de SEC ID NO:15.

9. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, donde dicha inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena ligera y una cadena pesada,

comprendiendo dicha cadena ligera regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) que tienen las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación:

cadena ligera:

RDC1 aminoácidos 44-59 de SEC ID NO:12

RDC2 aminoácidos 75-81 de SEC ID NO:12

RDC3 aminoácidos 114-122 de SEC ID NO:12; y

una región de marco derivada de la región variable de una cadena ligera de origen humano;

comprendiendo dicha cadena pesada regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) que tienen las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación:

ES 2 262 186 T3

cadena pesada:

RDC1 aminoácidos 50-54 de SEC ID NO: 15

5 RDC2 aminoácidos 69-85 de SEC ID NO: 15

RDC3 aminoácidos 118-129 de SEC ID NO:15; y

una región de marco derivada de la región variable de una cadena pesada de origen humano.

10

10. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 9, donde la región variable de una cadena ligera de origen humano es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo GM607'CL (SEC ID NO:8).

15

11. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 9 o reivindicación 10, donde la región variable de una cadena pesada de origen humano es la región variable del anticuerpo 21/28'CL humano (SEC ID NO:10).

20

12. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8 o reivindicación 9, donde la cadena ligera comprende la región variable de SEC ID NO:21, y la cadena pesada comprende la región variable de SEC ID NO:19.

25

13. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, donde dicha inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno puede competir con el anticuerpo monoclonal Act-1 murino para unirse a integrina $\alpha 4\beta 7$.

30

14. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 8-13, donde dicha inmunoglobulina o fragmento de unión a antígeno tiene la especificidad epitópica del anticuerpo monoclonal Act-1 murino.

35

15. La cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, o un fragmento de la misma, del anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha cadena ligera o fragmento tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una porción funcional de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en la Figura 7 (SEC ID NO:12).

40

16. La cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la reivindicación 15, donde dicha cadena ligera o fragmento tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia del péptido señal que se muestra en la Figura 7 (SEC ID NO:12), y al menos una porción funcional de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se muestra en la Figura 7 (SEC ID NO:12).

45

17. Una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, o un fragmento de la misma, donde dicha cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento comprende regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal Act-1 murino y una región de marco de la cadena ligera de origen humano, comprendiendo dichas regiones determinantes de complementariedad las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación de manera que un anticuerpo que comprende dicha cadena ligera o fragmento de la misma se une selectivamente a integrina $\alpha 4\beta 7$:

cadena ligera:

50

RDC1 aminoácidos 44-59 de SEC ID NO:12

RDC2 aminoácidos 75-81 de SEC ID NO:12

55

RDC3 aminoácidos 114-122 de SEC ID NO:12.

18. La cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la reivindicación 17, donde la región de marco humana se deriva de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo GM607'CL (SEC ID NO:8).

60

19. La cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde dicha cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento comprende la región variable de SEC ID NO:21.

65

20. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19.

21. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 20, donde dicha secuencia comprende la secuencia codificante de la región variable de SEC ID NO:20.

ES 2 262 186 T3

22. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la reivindicación 15 o reivindicación 16, donde dicha secuencia comprende la secuencia codificante de la región variable de SEC ID NO:11.

5 23. Un vector de expresión que comprende un gen fusionado que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19.

24. El vector de expresión de la reivindicación 23, donde dicho gen fusionado comprende la secuencia codificante de la región variable de SEC ID NO:20.

10 25. Un vector de expresión que comprende un gen fusionado que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la misma de la reivindicación 15 o reivindicación 16, donde dicho gen fusionado comprende la secuencia codificante de la región variable de SEC ID NO:11.

15 26. La cadena pesada de inmunoglobulina humanizada, o un fragmento de la misma, del anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha cadena pesada o fragmento tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una porción funcional de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en la Figura 9 (SEC ID NO:15).

20 27. La cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la reivindicación 26, donde dicha cadena pesada o fragmento tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia del péptido señal que se muestra en la Figura 9 (SEC ID NO: 15), y al menos una porción funcional de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en la Figura 9 (SEC ID NO:15).

25 28. Una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la misma, donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento comprende regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal Act-1 murino, y una región de marco de cadena pesada de origen humano, comprendiendo dichas regiones determinantes de complementariedad las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación de manera que un anticuerpo que comprende dicha cadena pesada o fragmento de la misma se une selectivamente a integrina $\alpha 4\beta 7$:

cadena pesada:

35 RDC1 aminoácidos 50-54 de SEC ID NO:15

RDC2 aminoácidos 69-85 de SEC ID NO:15

RDC3 aminoácidos 118-129 de SEC ID NO:15.

40 29. La cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la reivindicación 28, donde la región de marco humana se deriva de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 21/28'CL humano (SEC ID NO:10).

45 30. La cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-29, donde dicha cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento comprende la región variable de SEC ID NO:19.

31. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 26-30.

50 32. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 31, donde dicha secuencia comprende la secuencia codificante de la región variable de SEC ID NO:18.

55 33. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica la cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la reivindicación 26 o reivindicación 27, donde dicha secuencia comprende la secuencia codificante de la región variable de SEC ID NO:14.

34. Un vector de expresión que comprende un gen fusionado que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la misma de una cualquiera de las reivindicaciones 26-30.

60 35. El vector de expresión de la reivindicación 34, donde dicho gen fusionado comprende la secuencia codificante de la región variable de SEC ID NO:18.

65 36. Un vector de expresión que comprende un gen fusionado que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la misma de la reivindicación 26 o reivindicación 27, donde dicho gen fusionado comprende la secuencia codificante de la región variable de SEC ID NO:14.

37. Una célula hospedante que comprende el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 23-25 o 34-36.

ES 2 262 186 T3

38. Un método de preparación de una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, fragmento de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada, que comprende mantener una célula hospedante de la reivindicación 37 en condiciones apropiadas para la expresión de una cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina humanizada, por lo que se expresa y produce, y opcionalmente se aísla, una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, fragmento de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada.

39. Una célula hospedante que comprende un primer ácido nucleico recombinante que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la misma, y un segundo ácido nucleico recombinante que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o fragmento de la misma, donde un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende dicha cadena ligera o fragmento de la misma y dicha cadena pesada o fragmento de la misma se une selectivamente a integrina $\alpha 4\beta 7$,

dicho primer ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica una RDC derivada de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal Act-1 murino y una región de marco derivada de una cadena ligera de origen humano; y

dicho segundo ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica una RDC derivada de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal Act-1 murino y una región de marco derivada de una cadena pesada de origen humano.

40. La célula hospedante de la reivindicación 39 donde: dicho primer ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica al menos una de tres regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) que tienen las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación:

cadena ligera:

RDC1 aminoácidos 44-59 de SEC ID NO:12

RDC2 aminoácidos 75-81 de SEC ID NO:12

RDC3 aminoácidos 114-122 de SEC ID NO:12; y

una región de marco derivada de la región variable de una cadena ligera de origen humano; y

dicho segundo ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica al menos una de tres regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) que tienen las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación:

cadena pesada:

RDC1 aminoácidos 50-54 de SEC ID NO:15

RDC2 aminoácidos 69-85 de SEC ID NO:15

RDC3 aminoácidos 118-129 de SEC ID NO:15; y

una región de marco derivada de la región variable de una cadena pesada de origen humano.

41. La célula hospedante de la reivindicación 40 donde: dicho primer ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica tres regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) que tienen las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación:

cadena ligera:

RDC1 aminoácidos 44-59 de SEC ID NO:12

RDC2 aminoácidos 75-81 de SEC ID NO:12

RDC3 aminoácidos 114-122 de SEC ID NO:12; y

una región de marco derivada de la región variable de una cadena ligera de origen humano; y

dicho segundo ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica tres regiones determinantes de complementariedad (RDC1, RDC2 y RDC3) que tienen las secuencias de aminoácidos que se expresan a continuación:

ES 2 262 186 T3

cadena pesada:

RDC1 aminoácidos 50-54 de SEC ID NO:15

5 RDC2 aminoácidos 69-85 de SEC ID NO:15

RDC3 aminoácidos 118-129 de SEC ID NO:15; y

10 una región de marco derivada de la región variable de una cadena pesada de origen humano.

42. Un método de preparación de una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma, que comprende mantener una célula hospedante de una cualquiera de las reivindicaciones 39-41 en condiciones apropiadas para la expresión de una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma, por lo que se expresan cadenas de inmunoglobulina humanizada y se produce, y opcionalmente se aísla, una inmunoglobulina humanizada o fragmento.

43. Una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para uso en terapia o diagnóstico.

20 44. Una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y un vehículo adecuado para uso como medicamento.

45. Uso de una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria o enfermedad asociada a infiltración leucocitaria de tejidos, donde la enfermedad es colecistitis, colangitis, pericolangitis mastitis, sinusitis crónica, pancreatitis o diabetes mellitus insulino-dependiente.

46. Uso de una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino.

30 47. El uso de la reivindicación 46, donde dicha enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

48. El uso de la reivindicación 46 o reivindicación 47, donde dicha inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y donde dicha cadena pesada comprende la región variable de SEC ID NO:19 y dicha cadena ligera comprende la región variable de SEC ID NO:21.

49. Uso de una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 9 para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino.

50. Uso de una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria asociada a tejidos mucosales, donde la enfermedad es la enfermedad del injerto contra el hospedante.

45

50

55

60

65

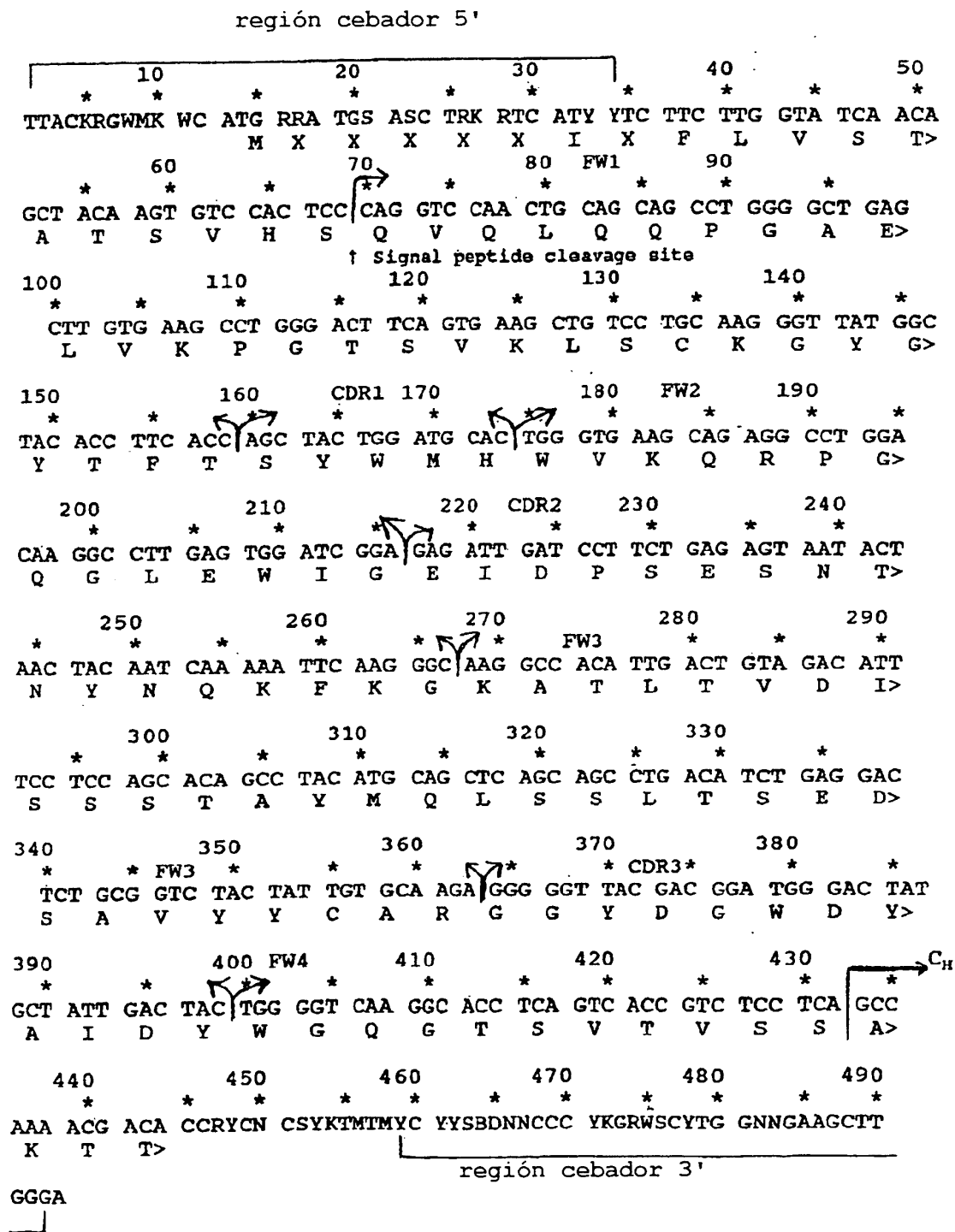


FIG. 1

ES 2 262 186 T3

```

      10      20      30      40      50
      *      *      *      *      *
TTACTT GACG ACTCGGG ATG GGA TGG AGC TAT ATC ATC TTC TTC TTG GTA TCA
      M   G   W   S   Y   I   I   F   F   L   V   S>

      60      70      80      90      100
      *      *      *      *      *
ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT
      T   A   T   S   V   H   S   Q   V   Q   L   Q   Q   P   G   A>

      110     120     130     140
      *      *      *      *      *
GAG CTT GTG AAG CCT GGG ACT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GGT TAT
      E   L   V   K   P   G   T   S   V   K   L   S   C   K   G   Y>

150      160      170      180      190
      *      *      *      *      *
GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT
      G   Y   T   F   T   S   Y   W   M   H   W   V   K   Q   R   P>

200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *
GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT
      G   Q   G   L   E   W   I   G   E   I   D   P   S   E   S   N>

250      260      270      280      290
      *      *      *      *      *
ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC
      T   N   Y   N   Q   K   F   K   G   K   A   T   L   T   V   D>

      300     310     320     330     340
      *      *      *      *      *
ATT TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG
      I   S   S   S   T   A   Y   M   Q   L   S   S   L   T   S   E>

      350     360     370     380
      *      *      *      *      *
GAC TCT GCG GTC TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC
      D   S   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   Y   D   G   W   D>

390      400      410      420
      *      *      *      *      *
TAT GCT ATT GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACA TCA GTC ACC
      Y   A   I   D   Y   W   G   Q   G   T   S   V   T>

```

FIGURA 2

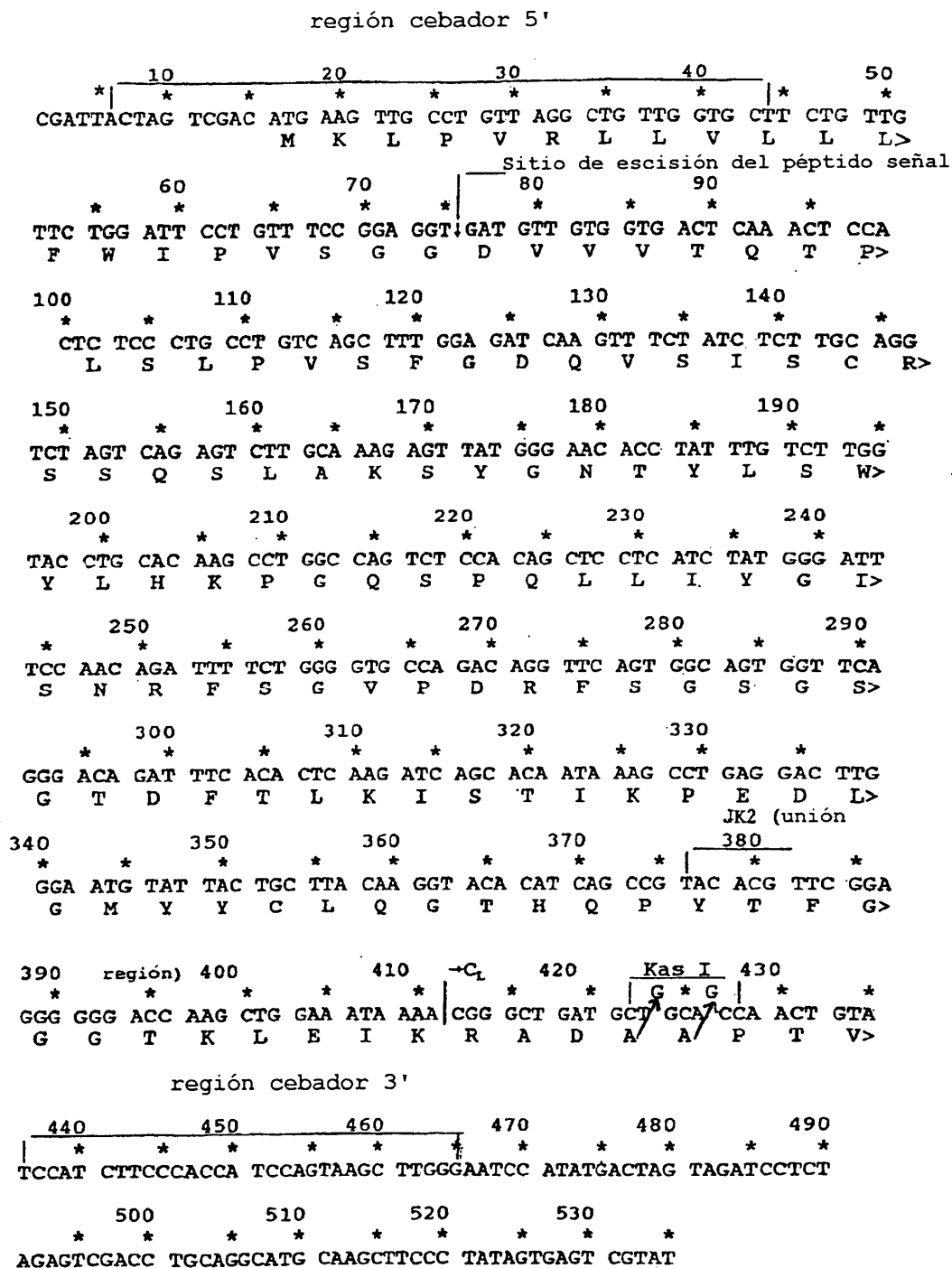


FIG. 3

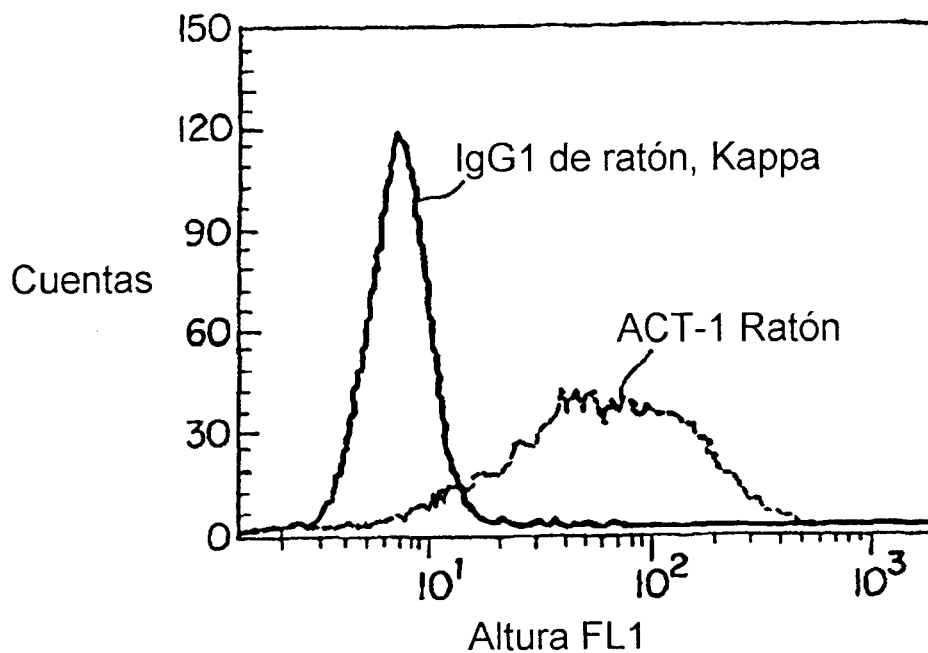


FIG. 4A

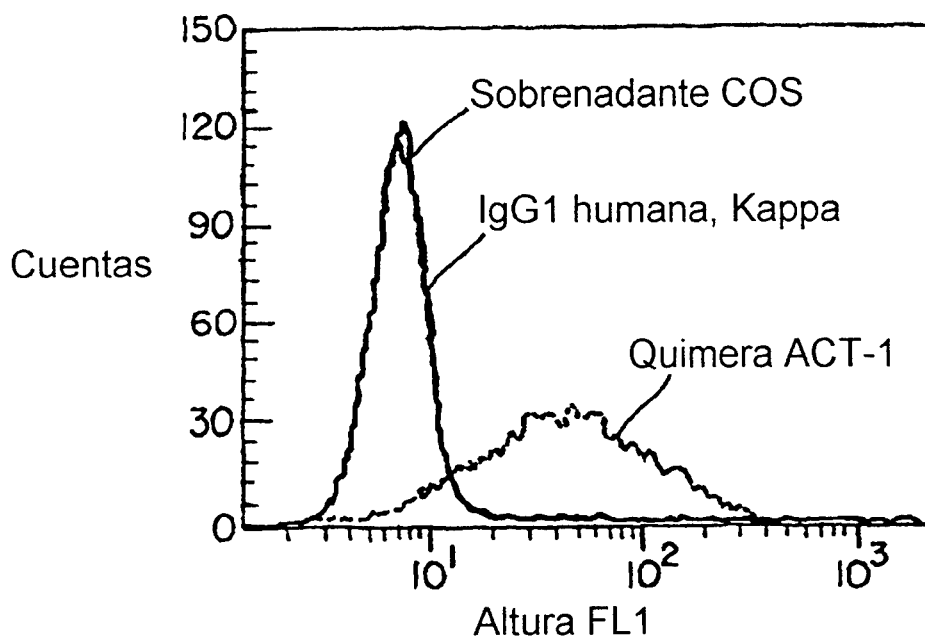


FIG. 4B

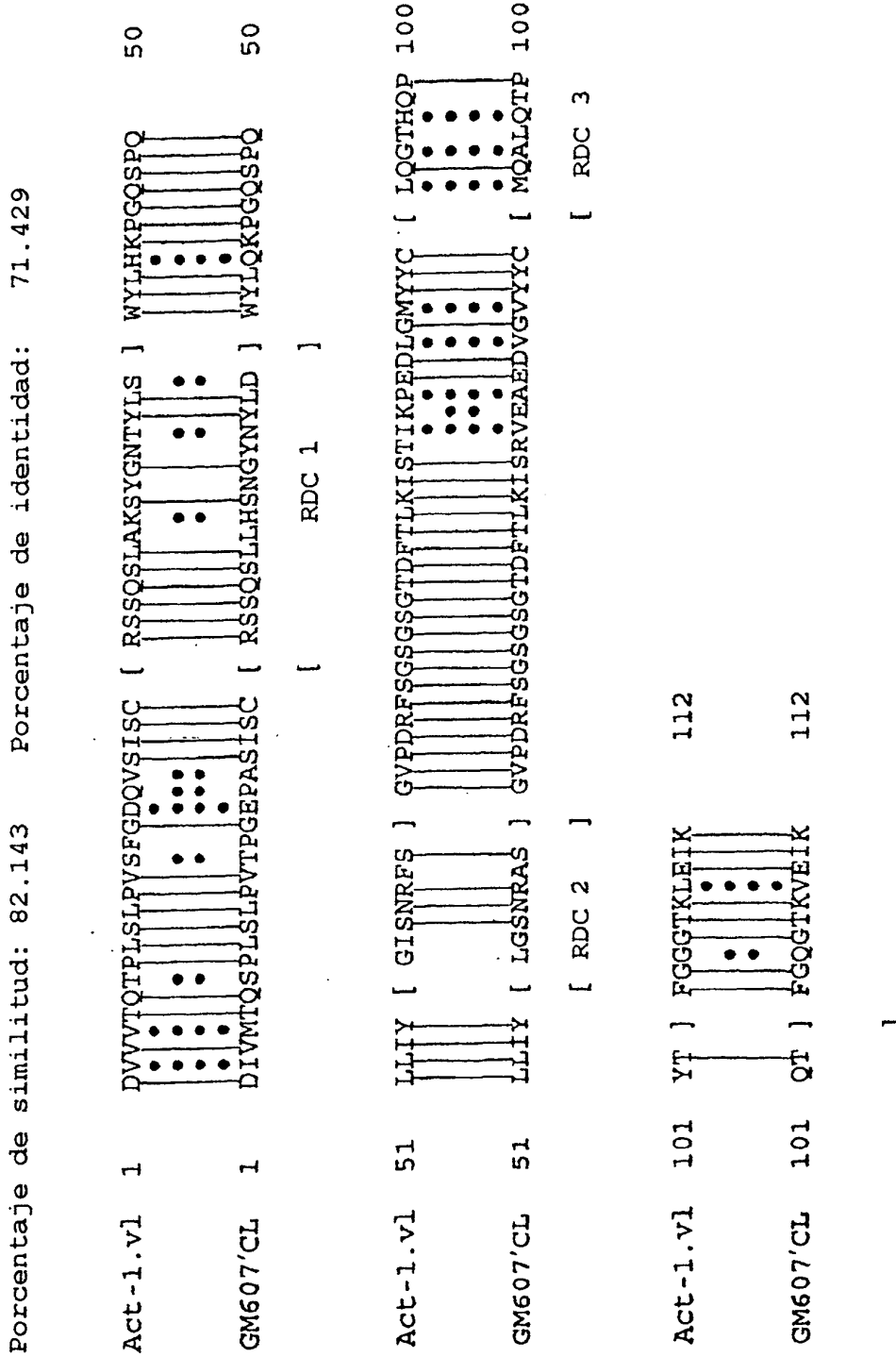


FIGURA 5

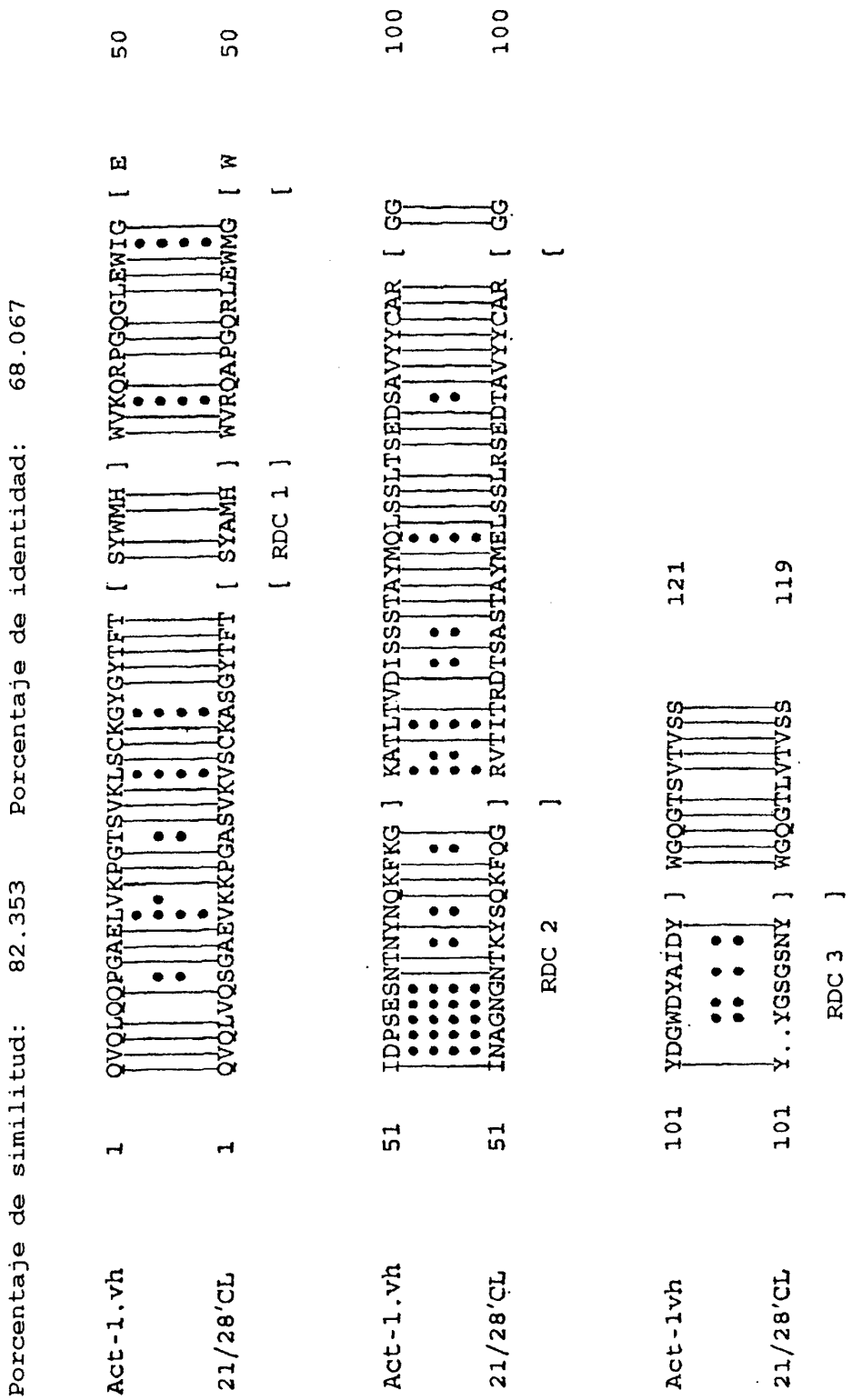


FIGURA 6

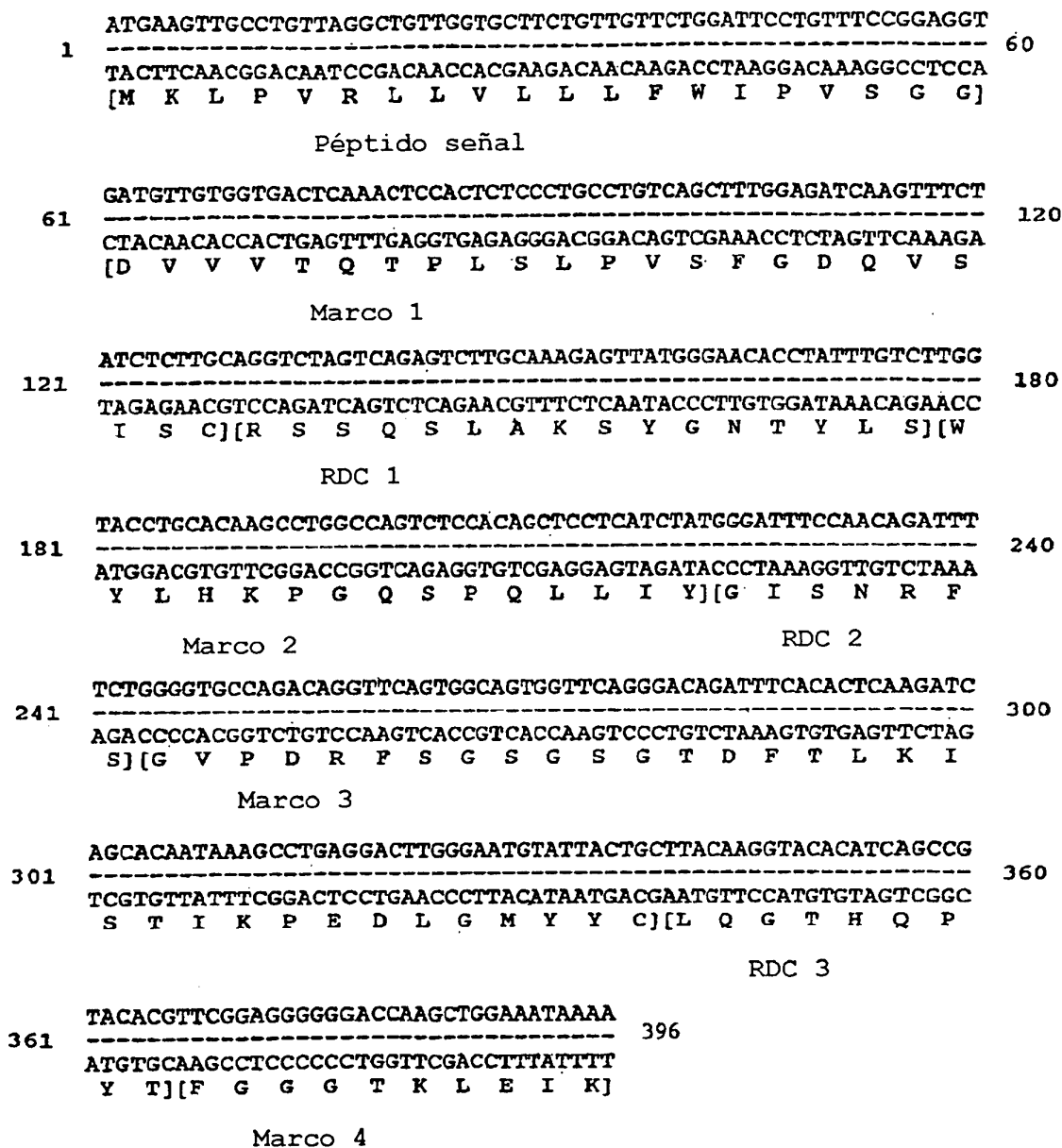


FIG. 7

1 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC 60
CTATAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGGGGACCTCTCGGCCGGAGG
 [D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S
 Marco 1
 61 ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTCCATAGTAATGGATCAAACCTATTTGGATTGG 120
TAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGGAGGAGGTATCATTACCTAGTTTGATAAACCTAAC
 I S C][R S S Q S L L H S N G Y N Y L D][W
 RDC 1
 121 TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC 180
ATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTGAGGACTAGATAAACCCAAGATTAGCCCG
 Y L Q K P G Q S P Q L L I Y][L G S N R A
 Marco 2 RDC 2
 181 TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC 240
AGGCCCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGTCTAAAATGTGTCTTTTAG
 S][G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 Marco 3
 241 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTA TACTGCATGCAAGCTCTACCAACTCCT 300
TCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGTACGTTTCGAGATGGTTGAGGA
 S R V E A E D V G V Y Y C][M Q A L Q T P
 RDC 3
 301 CAGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAA 336
GTCGTGCAAGCCGGTTCCTGGTTCCACCTTTAGTTT
 Q T][F G Q G T K V E I K
 Marco 4

FIGURA 8

1 ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTATCAACAGCTACAAGTGTCCACTCCCAG 60

 TACCTTACCTCGACATAGTAGGAGAAGAACCATAGTTGTCGATGTTACAGGTGAGGGTC
 M G W S C I I L F L V S T A T S V H S][Q

Péptido señal

61 GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGCTGTCC 120

 CAGGTTGACGTGCGTCGGACCCCGACTCGAACACTTCGGACCCTGAAGTCACTTCGACAGG
 V Q L Q Q P G A E L V K P G T S V K L S

Marco 1

121 TGCAAGGGTTATGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCT 180

 ACGTTCCCAATACCGATGTGGAAGTGGTCGATGACCTACGTGACCCACTTCGTCTCCGGA
 C K G Y G Y T F T][S Y W M H][W V K Q R P

RDC 1

181 GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGAGAGTAATACTAACTACAAT 240

 CCTGTTCCGGAACCTCACCTAGCCTCTCTAACTAGGAAGACTCTCATTATGATTGATGTTA
 G Q G L E W I G][E I D P S E S N T N Y N

Marco 2 RDC 2

241 CAAAAATTC AAGGGCAAGGCCACATTTGACTGTAGACATTTCCCTCCAGCACAGCCTACATG 300

 GTTTTTAAGTTCCCGTTCCGGTGTAACGACATCTGTAAAGGAGGTGCGTGTCCGGATGTAC
 Q K F K G][K A T L T V D I S S S T A Y M

Marco 3

301 CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTAC 360

 GTCGAGTTCGTCGGACTGTAGACTCCTGAGACGCCAGATGATAACACGTTCTCCCCAATG
 Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R][G G Y

361 GACGGATGGGACTATGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCTCAGTCACCGTCTCCTCA 420

 CTGCCTACCCTGATACGATAACTGATGACCCAGTTCCGTGGAGTCAAGTGGCAGAGGAGT
 D G W D Y A I D Y][W G Q G T S V T V S S]

RDC 3 Marco 4

FIGURA 9

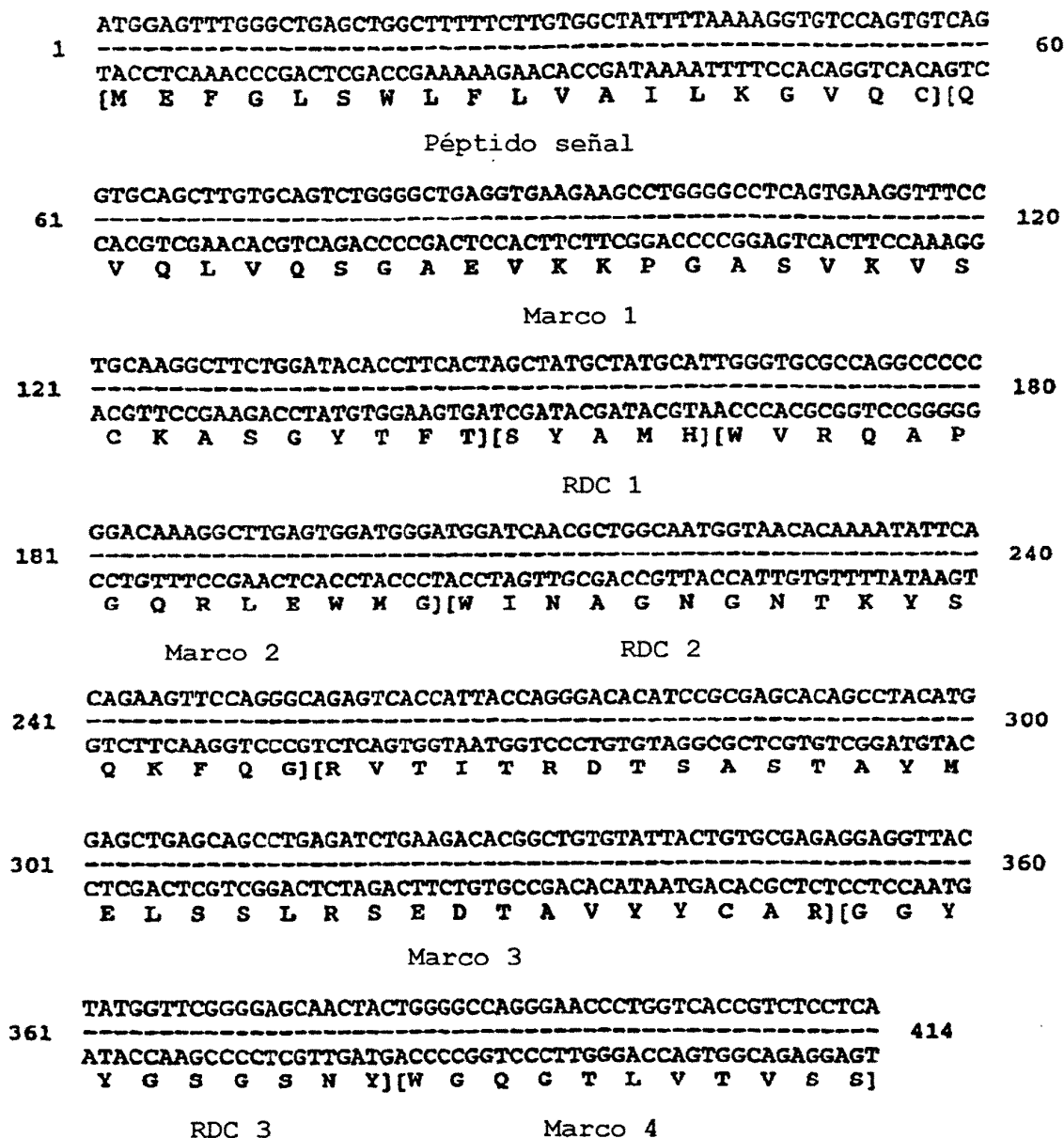


FIGURA 10

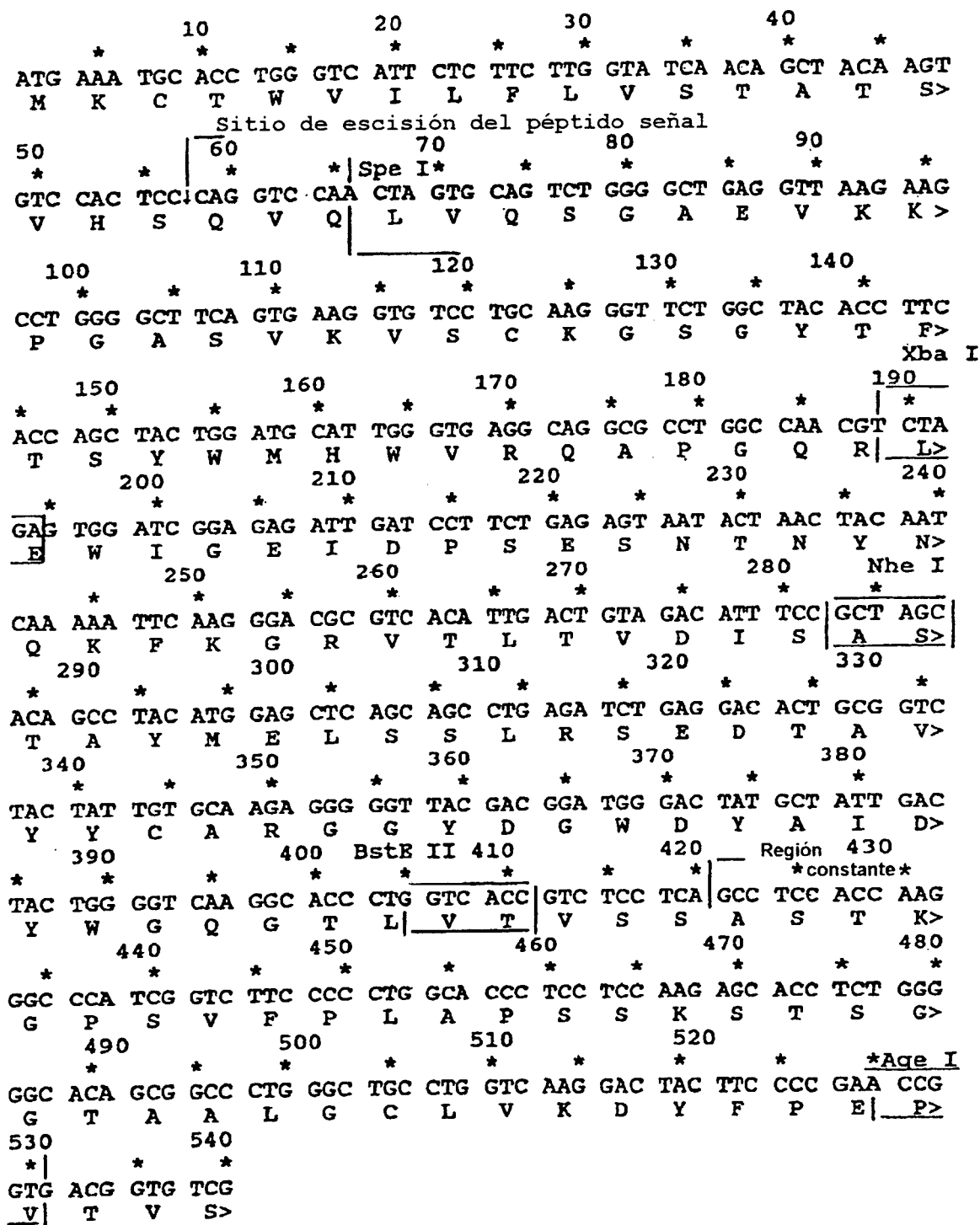


FIG. 11

```

          10          20          30          40
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT CCT
M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  L  L  F  W  I  P>

          50          60          70          80          90
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
GTT TCC GGA GGT GAT GTT GTG ATG ACT CAA AGT CCA CTC TCC CTG CCT
V  S  G  G  D  V  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P>
      Sitio de escisión del péptido señal

          100          110          120          130          140
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
GTC ACC CCT GGA GAA CCA GCT TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT
V  T  P  G  E  P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S>

          150          160          170          180 Asp 718 190
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
CTT GCA AAG AGT TAT GGG AAC ACC TAT TTG TCT TGG TAC CTG CAG AAG
L  A  K  S  Y  G  N  T  Y  L  S  W  Y  L  Q  K>

          200          210          220          230          240
      *Msc I *   *   *   *   *   *   *   *
CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT
P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  G  I  S  N  R  F>

          250          260          270          280
      *   *   *   *   *   *   *   *
TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC
S  G  V  P  D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F>

          290          300 NruI          310          320          330
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
ACA CTC AAG ATC TCG CGA GTA GAG GCT GAG GAC GTG GGA GTG TAT TAC
T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y>

          340          350          360          370          380
      *   *   *   *   *   *   *   *   *
TGC TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG
C  L  Q  G  T  H  Q  R  Y  T  F  G  Q  G  T  K>

          390          400          410 Kas I
      *   *   *   *   *   *   *
GTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCG GCG CC
V  E  I  K  R  A  D  A  A  P>
    
```

FIG. 12

ES 2 262 186 T3

OLIGOS DE CADENA LIGERA	FRAGMENTOS DE DOBLE HEBRA
L1 5'- TTT CCG GAG GTG ATG TTG TGA TGA CTC AAA GTC CAC TCT CCC TGC CTG TCA CCC CTG GAG AAC CAG CTT CTA TCT CTT GCA GGT CTA GTC AGA G	LA
L2 5'- ACT GGC CAG GCT TCT GCA GGT ACC AAG ACA AAT AGG TGT TCC CAT AAC TCT TTG CAA GAC TCT GAC TAG ACC TGC AAG AGA TAG AAG CTG GTT C	LB
L3 5'- CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TC	LB
L4 5'- ACT CGC GAG ATC TTG AGT GTG AAA TCT GTC CCT GAA CCA CTG CCA CTG AAC CTG TCT GGC ACC CCA GAA AAT CTG TTG GAA ATC	LB
L5 5'- TCT CGC GAG TAG AGG CTG AGG ACG TGG GAG TGT ATT ACT GCT TAC AAG GTA CAC ATC AGC CGT ACA C	LC
L6 5'- ATG GCG CCG CAT CAG CCC GTT TTA TTT CCA CCT TGG TCC CCT GTC CGA ACG TGT ACG GCT GAT GTG TAC CTT GTA AGC AGT AAT AC	LC
OLIGOS DE CADENA PESADA	FRAGMENTOS DE DOBLE HEBRA
H1 5'- ATA AGC TTC GCC ATG AAA TGC ACC TGG GTC ATT CTC TTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTA GTG CAC CGG TTA	HA
H2 5'- TAA CCG GTG CAC TAG TTG GAC CTG GGA GTG GAC ACT TGT AGC TGT TGA TAC CAA GAA GAG AAT GAC CCA GGT GCA TTT CAT GGC GAA GCT TAT	HA
H3 5'- CAA CTA GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTT AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC	HB
H4 5'- TAA CCG GTA CTC TAG ACG TTG GCC AGG CGC CTG CCT CAC CCA ATG CAT CCA GTA GCT GGT GAA GGT GTA GCC AGA ACC CTT GCA GGA C	HB
H5 5'- CGT CTA GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGA CGC GTC A	HC
H6 5'- TAA CCG GTG TGC TAG CGG AAA TGT CTA CAG TCA ATG TGA CGC GTC CCT TGA ATT TTT GAT TGT AGT TAG TAT TAC T	HC
H7 5'- CCG CTA GCA CAG CCT ACA TGG AGC TCA GCA GCC TGA GAT CTG AGG ACA CTG CGG TCT ACT ATT GTG CAA GAG GGG GTT ACG ACG GAT G	HD
H8 5'- TCA CCG GTG CGG TGA CCA GGG TGC CTT GAC CCC AGT AGT CAA TAG CAT AGT CCC ATC CGT CGT AAC CCC CTC TTG CAC AAT AGT AGA C	HD
H9 5'- CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA G	HE
H10 5'- TCA CCG GTT CGG GGA AGT AGT OCT TGA CCA GGC AGC CCA GGG CCG CTG TGC CCC CAG AGG TGC TCT TGG AGG AGG GTG CCA GGG G	HE

FIGURA 13

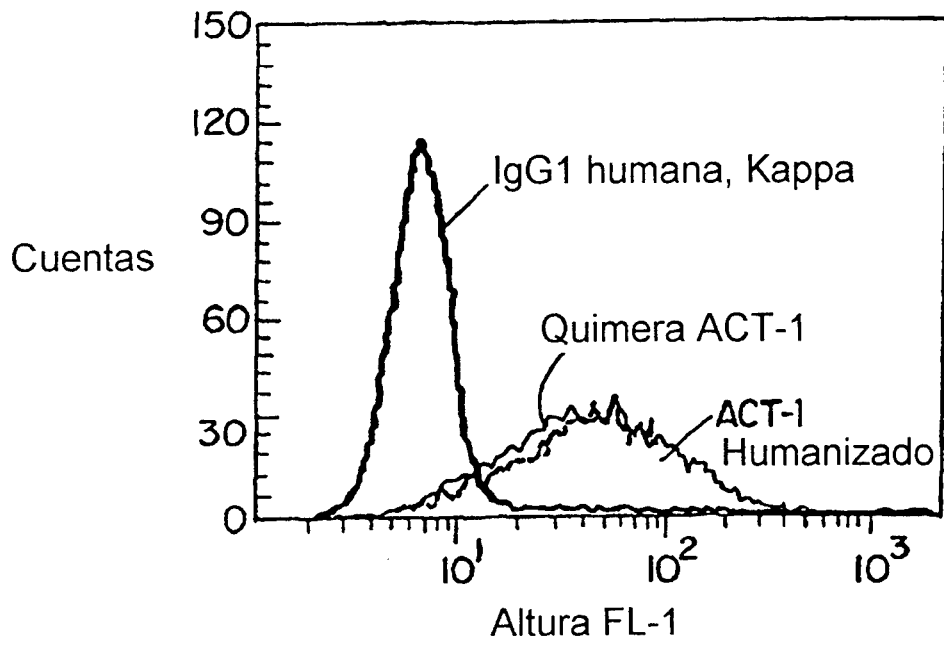


FIG. 14

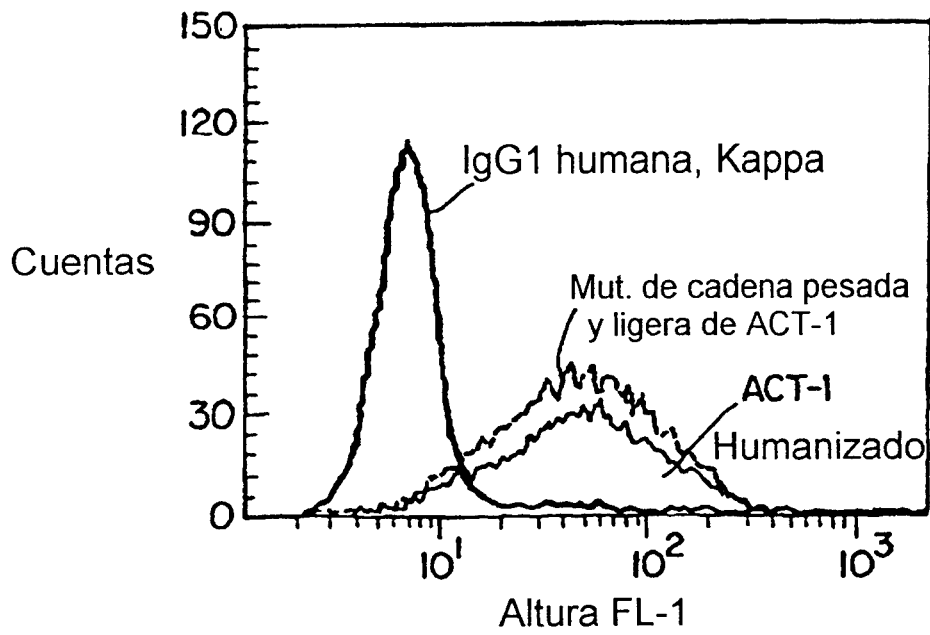


FIG. 19

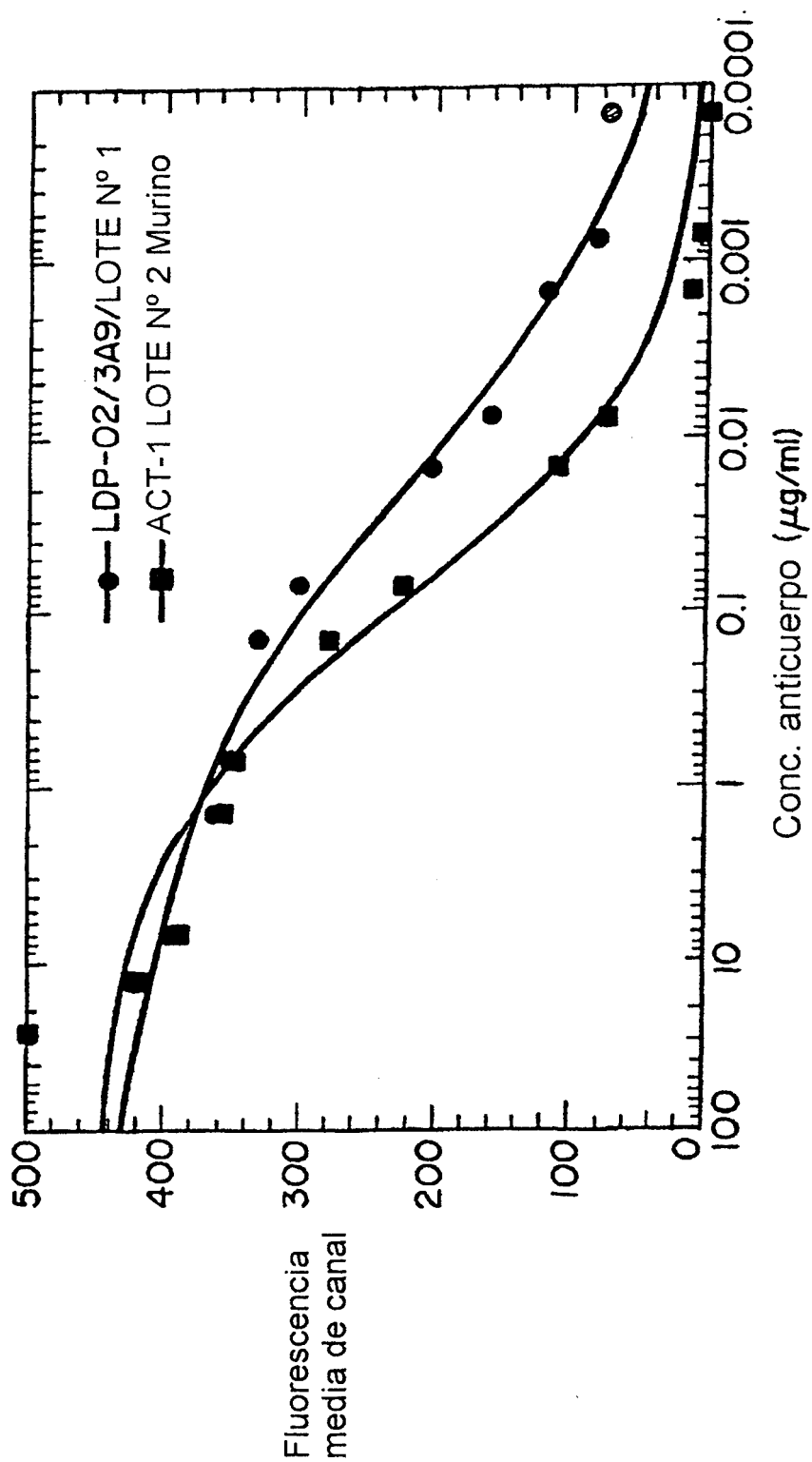


FIG. 15

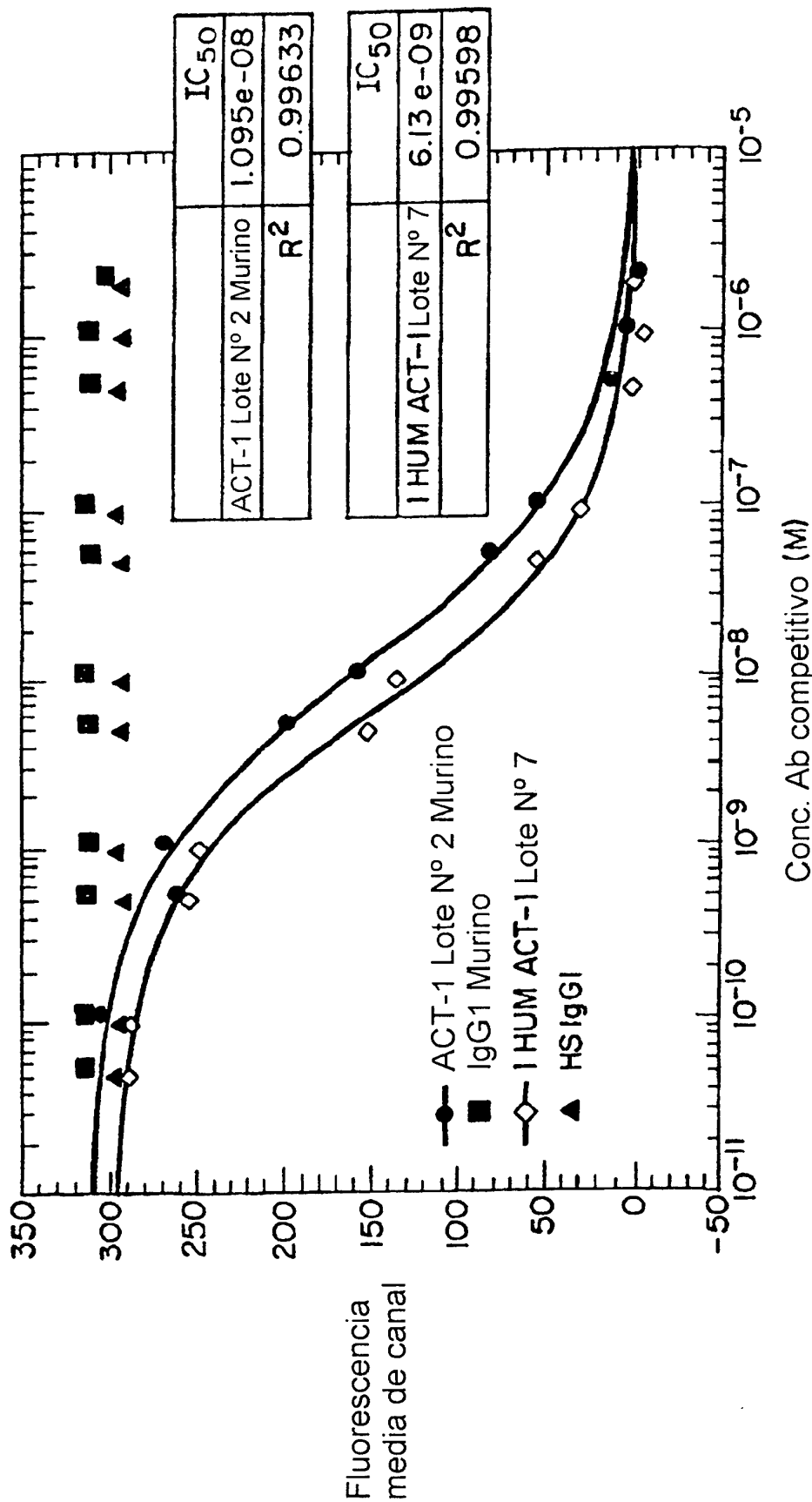


FIG. 16

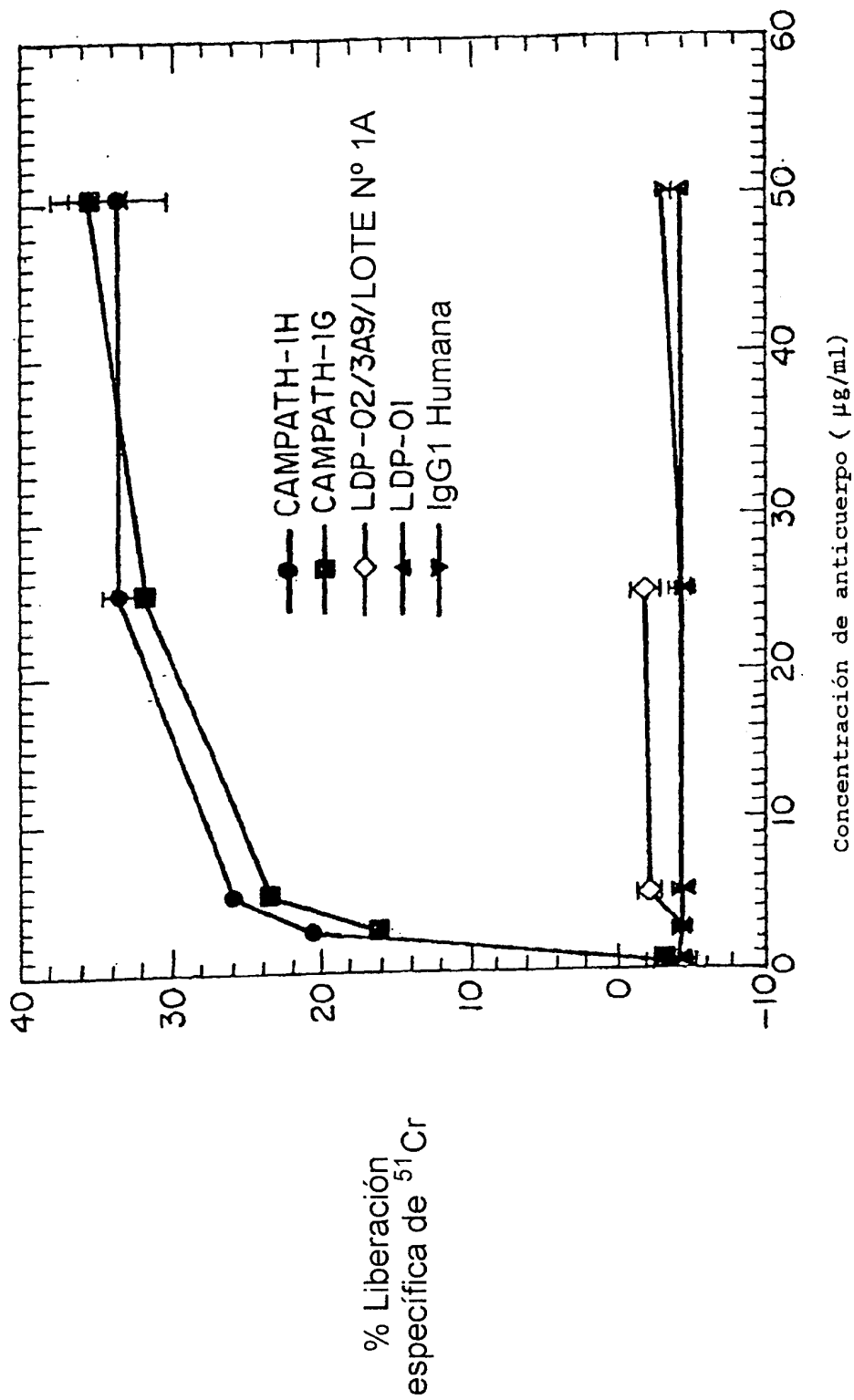


FIG. 17

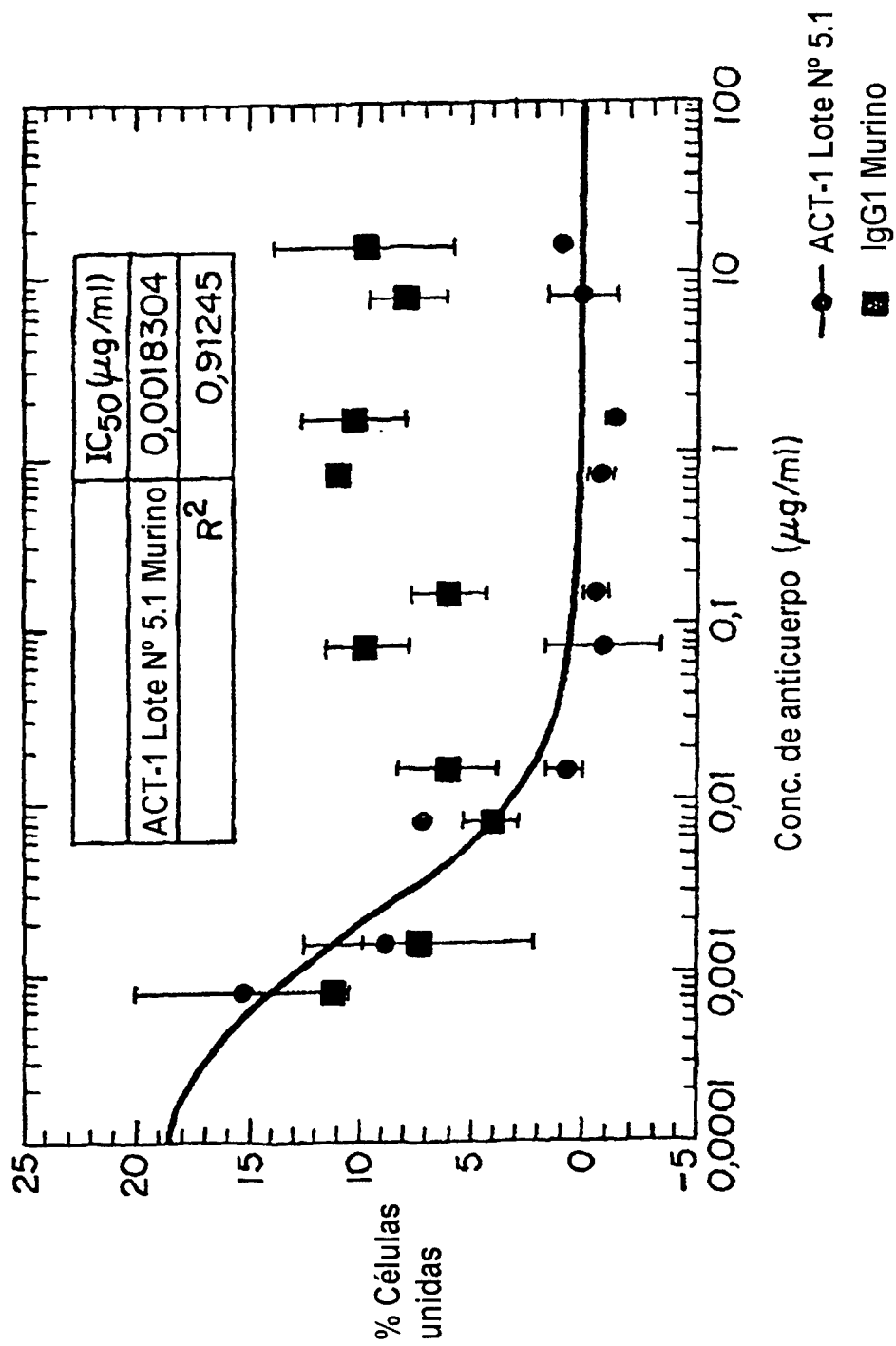


FIG. 18A

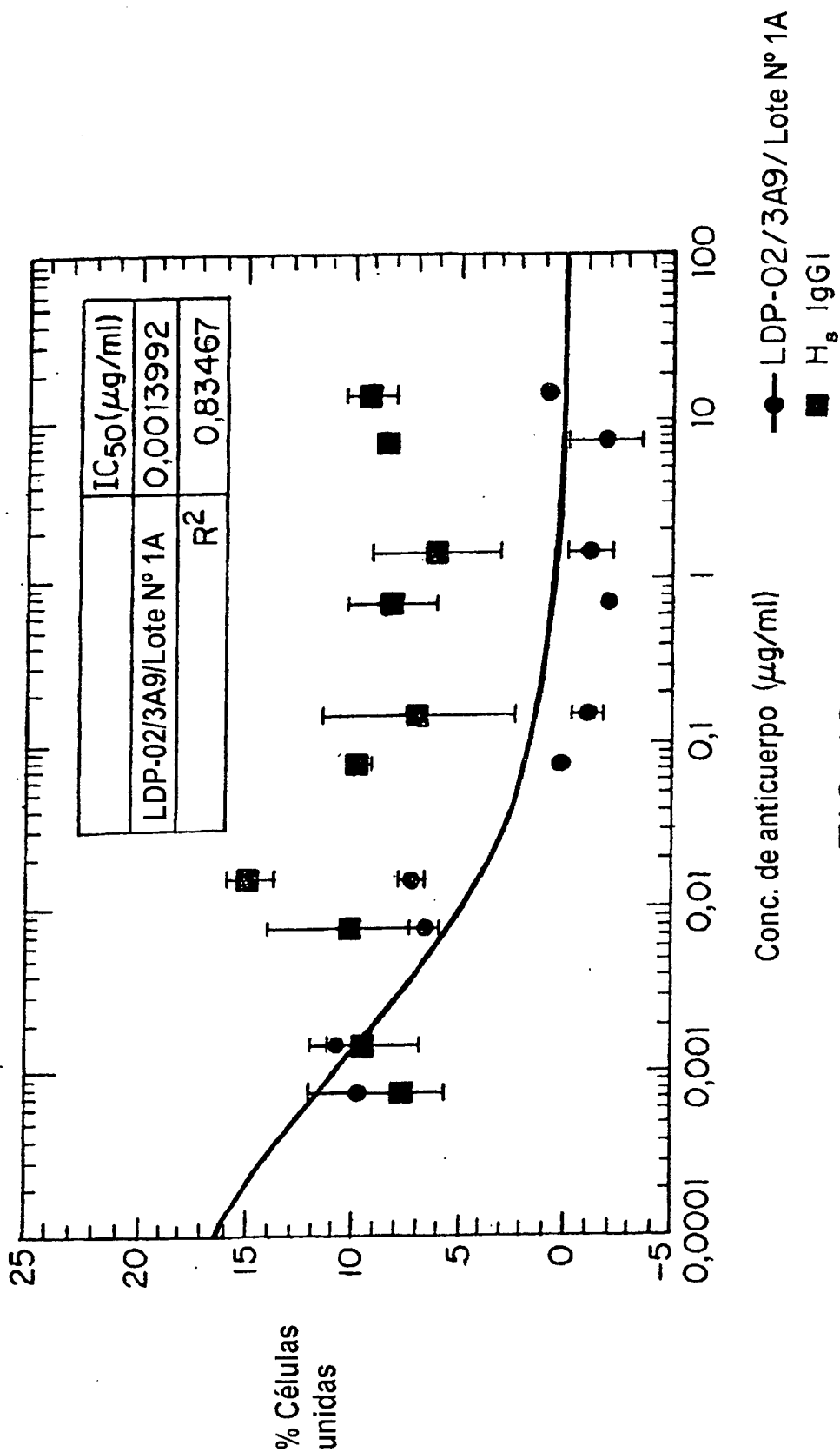


FIG. 18B