

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 341 708**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2003** **PCT/GB2003/01934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2003** **WO03093320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2003** **E 03718974 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras limitación: **20.12.2017** **EP 1504035**

54 Título: **Anticuerpos específicos de CD22 humana y sus usos terapéuticos y diagnósticos**

30 Prioridad:

02.05.2002 GB 0210121

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

11.04.2018

73 Titular/es:

UCB PHARMA, S.A. (100.0%)
Allée de La Recherche 60
1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

POPPLEWELL, ANDREW GEORGE;
TICKLE, SIMON PETER y
LADYMAN, HEATHER MARGARET

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 341 708 T7

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos de CD22 humana y sus usos terapéuticos y diagnósticos

5 La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para los determinantes antigénicos del antígeno de los linfocitos B, CD22. La presente invención se refiere también a los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y a métodos para producir la molécula de anticuerpo.

10 En una molécula de un anticuerpo natural, hay dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada y cada cadena ligera tienen en su extremo N-terminal un dominio variable. Cada dominio variable se compone de cuatro regiones marco (FR) que alternan con tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los residuos de los dominios variables se numeran convencionalmente según un sistema creado por Kabat *et al.* Este sistema está descrito por Kabat *et al.*, 1987, en *Sequences of proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (de aquí en adelante "Kabat *et al.* (cita anterior)"). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indica otra cosa.

15 Las designaciones de los residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que los de la numeración estricta de Kabat que corresponde a un acortamiento de un componente estructural o a una inserción en un componente estructural, ya sea marco o CDR, de la estructura del dominio variable básico. La numeración correcta de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineamiento de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

25 Las CDR del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) según la numeración de Kabat.

Las CDR del dominio variable de cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) según la numeración de Kabat.

30 La construcción de anticuerpos injertados con CDR se describe en la solicitud de patente europea EP-A-0239400, que describe un procedimiento en el que las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón se injertan en las regiones marco de los dominios variables de una inmunoglobulina humana mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando oligonucleótidos largos. Las CDR determinan la especificidad de unión al antígeno de los anticuerpos y son secuencias peptídicas relativamente cortas mantenidas sobre las regiones marco de los dominios variables.

35 El primer trabajo sobre anticuerpos monoclonales humanizados por injertos de CDR se llevó a cabo sobre anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos sintéticos, tales como NP. Sin embargo, ejemplos en los que un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la lisozima y un anticuerpo monoclonal de rata que reconoce un antígeno sobre las células T humanas fueron humanizados por injertos de CDR, han sido descritos por Verhoeven *et al.* (Science, 239, 1534-1536, 1988) y Riechmann *et al.* (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente.

40 Riechmann *et al.*, encontraron que la transferencia de las CDR solas (como han sido definidas por Kabat (Kabat *et al.* (cita anterior) y Wu *et al.*, J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970)) no fue suficiente para proporcionar una actividad satisfactoria de unión al antígeno en el producto injertado con CDR. Se encontró que muchos residuos marco tenían que ser alterados para que se correspondieran con los de la región marco del donante. Los criterios propuestos para seleccionar qué residuos marco necesitan ser alterados están descritos en la solicitud de patente internacional No. WO 90/07861.

45 Se han publicado una serie de reseñas que exponen los anticuerpos injertados con CDR, incluyendo Vaughan *et al.* (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

50 Los linfomas malignos son un grupo diverso de neoplasmas. La mayoría de los casos aparecen en personas ancianas. El linfoma no Hodgkin (NHL) es una enfermedad que normalmente afecta de 200.000 a 250.000 pacientes en los Estados Unidos. Es el segundo cáncer que aumenta más rápidamente en los Estados Unidos, aumentando a una tasa de aproximadamente 55.000 nuevos casos por año. La incidencia aumenta a una velocidad que es mayor que la que se puede atribuir simplemente al aumento de la edad de la población y a la exposición a factores de riesgo conocidos.

55 La clasificación del linfoma es compleja, y ha evolucionado en las recientes décadas. En 1994 se introdujo la clasificación revisada de linfomas europeo-americanos (REAL). Esta clasificación organiza los linfomas de células B (el identificado más frecuentemente), de células T y de origen inclasificable en subtipos acordados. En la práctica diaria, el agrupamiento de los NHL en categorías de grado bajo, intermedio y grado alto basándose en su apariencia histológica general, refleja en líneas generales su comportamiento clínico.

60

El NHL afecta predominantemente a los nódulos linfáticos pero, en pacientes individuales, el tumor puede implicar otros sitios anatómicos tales como el hígado, bazo, médula ósea, pulmones, intestino y piel. La enfermedad comúnmente se presenta como un alargamiento indoloro de los nódulos linfáticos. El linfoma extranodular afecta con la mayor frecuencia al intestino, aunque ha sido documentado el linfoma primario virtualmente de cada órgano. Los síntomas sistémicos incluyen fiebre, sudores, cansancio y pérdida de peso.

Hasta recientemente, el sistema de clasificación de Ann Arbor, basado enteramente en la extensión anatómica de la enfermedad, ha sido el principal determinante de la terapia en el NHL. Esta información puede ser mejorada incorporando indicadores adicionales de pronóstico, incluyendo la edad, los niveles de lactato-deshidrogenasa sérica y el estado general. Aún así, el conocimiento del sistema de clasificación de Ann Arbor, junto con el subtipo histológico e inmunológico del tumor, es todavía el principal determinante del tratamiento.

El NHL de grado bajo tiene un curso poco activo, con una supervivencia media del paciente de 8 a 10 años. La supervivencia se ve poco impactada por la terapia actualmente disponible, aunque la irradiación de la enfermedad local y la quimioterapia para los síntomas sistémicos mejoran la calidad de vida de los pacientes. La quimioterapia de combinación se puede reservar para la enfermedad recurrente. La enfermedad intermedia y, especialmente, la enfermedad de grado alto es extremadamente agresiva y tiende a diseminarse. La enfermedad de este grado requiere tratamiento urgente. La radioterapia puede ser un componente útil de tratamiento en pacientes con una enfermedad muy masiva. Se han empleado muchos regímenes diferentes de quimioterapia, y se puede obtener una supervivencia a largo plazo libre de la enfermedad en más de la mitad de los pacientes. La terapia de dosis altas con soporte de células madre se introdujo inicialmente para los pacientes con enfermedad recurrente o refractaria, pero ahora está encontrando, cada vez más, un lugar en la terapia de primera línea para los pacientes con enfermedad de poco riesgo. La tendencia en los últimos años hacia una estrategia terapéutica cada vez más agresiva debe ser sopesada frente a la edad generalmente elevada y la debilidad relativa de muchos pacientes con NHL, y por la necesidad de combinar la toxicidad del tratamiento con el diagnóstico individual de la enfermedad de cada paciente.

Se necesitan mejores tratamientos, que sean más eficaces y mejor tolerados. Los agentes recientemente introducidos incluyen nuevos fármacos citotóxicos, incorporados progresivamente en combinaciones, y la introducción de terapias basadas en anticuerpos.

El linfoma no Hodgkin engloba un conjunto de linfomas de células B. Los antígenos de las células B representan por tanto dianas adecuadas para la terapia con anticuerpos.

El CD22 es una glicoproteína de membrana de 135 kDa que pertenece a una familia de proteínas de unión al ácido siálico llamadas sialoadhesinas. Se detecta en el citoplasma de modo temprano en el desarrollo de las células B, aparece en la superficie celular simultáneamente con la IgD y se encuentra en la mayor parte de las células B maduras. La expresión aumenta después de la activación de las células B. El CD22 se pierde con la diferenciación terminal y generalmente se define como ausente en las células plasmáticas. Por tanto este antígeno de interiorización está presente en la superficie de células pre-B y de las células B maduras pero no en las células madre ni en las células plasmáticas.

Existen dos isoformas de CD22 en el hombre. La forma predominante (CD22 β) contiene 7 dominios tipo inmunoglobulina (tipo Ig) en la región extracelular. La variante CD22 α carece del dominio 4 tipo Ig y puede tener un dominio citoplásmico truncado. Los anticuerpos que bloquean la adhesión de CD22 a los monocitos, neutrófilos, linfocitos y eritrocitos se ha demostrado que se unen dentro del primero o segundo dominio tipo Ig.

El dominio citoplásmico de CD22 es tirosina fosforilada después del ligamiento del receptor del antígeno de células B y se asocia con Lyk, Syk y fosfatidil-inositol 3-quinasa. La función de CD22 es modular por reducción el umbral de activación de las células B. Puede mediar también en la adhesión de las células mediante la interacción con células que llevan los sialoglicoconjugados apropiados.

El CD22 se expresa en la mayor parte de las leucemias y linfomas de células B, incluyendo el NHL, la leucemia linfoblástica aguda (B-ALL), la leucemia linfocítica crónica (B-CLL) y especialmente la leucemia no linfocítica aguda (ANLL).

Los anticuerpos monoclonales frente a CD22 han sido descritos en la técnica anterior. El documento WO 98/41641 describe anticuerpos recombinantes anti-CD22 con residuos de cisteína en V_H44 y V_L100. El documento WO 96/04925 describe las regiones V_H y V_L del anticuerpo LL2 anti-CD22. El documento US 5686072 describe combinaciones de inmunotoxinas anti-CD22 y anti-CD19. El documento WO 98/42378 describe el uso de anticuerpos desnudos anti-CD22 para el tratamiento de tumores malignos de células B.

Una serie de medicamentos basados en anticuerpos han sido autorizados recientemente, por ejemplo, Rituxan (un anticuerpo quimérico humano no marcado γ 1 (+región my1V), específico para CD20), o están en ensayos clínicos para esta enfermedad. Estos se basan o bien en la destrucción de las células B mediada por el complemento o mediada por ADCC o bien en el uso de radionúclidos, tales como ¹³¹I o ⁹⁰Y, que llevan asociados los problemas de preparación y de uso para los clínicos y pacientes. Existe la necesidad de una molécula de anticuerpo para tratar el

NHL que se pueda usar repetidamente y que se produzca de manera fácil y eficiente. Existe también la necesidad de una molécula de anticuerpo, que tenga una alta afinidad para CD22 y una baja inmunogenicidad en los seres humanos.

- 5 El epratuzumab es una versión humanizada del anticuerpo LL2 que se une al dominio extracelular de CD22 con una afinidad (K_D) de 0,7 nM (Carnahan *et al.*, Clin. Cancer Res. 9. supplement, 3982s-3990s, 2003)

Sumario de la invención

- 10 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para el CD22 humano, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR (como ha sido definida por Kabat *et al.*, (cita anterior)) que tiene la secuencia dada como H1 en la Figura 1 (SEQ ID NO:1) para CDR-H1, como H2 en la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o como H2 de la que se ha separado un sitio potencial de glicosilación, o una H2 en la que el residuo de lisina en la posición 60 (según el sistema de numeración de Kabat) ha sido reemplazado por un aminoácido alternativo, o una H2 en la que tanto el sitio de glicosilación como la lisina reactiva en la posición 60 han sido eliminados para CDR-H2 y como H3 en la Figura 1 (SEQ ID NO:3) para CDR-H3 y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR (como ha sido definida por Kabat *et al.*, (cita anterior)) que tiene la secuencia dada como L1 en la Figura 1 (SEQ ID NO:4) para CDR-L1, como L2 en la Figura 1 (SEQ ID NO:5) para CDR-L2 y como L3 en la Figura 1 (SEQ ID NO:6) para CDR-L3.

- 20 Las CDR dadas en las SEQ IDS NOS:1 a 6 y en la Figura 1 mencionadas anteriormente se derivan de un anticuerpo monoclonal de ratón 5/44.

- 25 Las secuencias completas de los dominios variables del anticuerpo de ratón 5/44 se muestran en la Figura 2 (cadena ligera) (SEQ ID NO:7) y en la Figura 3 (cadena pesada) (SEQ ID NO:8). Este anticuerpo de ratón se denomina también en lo que sigue "el anticuerpo del donante" o el "anticuerpo monoclonal murino".

- 30 Una realización alternativamente preferida de la presente invención es el anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 que tiene las secuencias del dominio variable de cadena ligera y de cadena pesada que se muestran en la Figura 2 (SEQ ID NO:7) y en la Figura 3 (SEQ ID NO:8), respectivamente. La región constante de cadena ligera de 5/44 es kappa y la región constante de cadena pesada es IgG1.

- 35 En otra realización preferida, el anticuerpo según la presente invención es una molécula de anticuerpo quimérico de ratón/humano, que se denomina aquí molécula de anticuerpo 5/44 quimérico. La molécula de anticuerpo quimérico comprende los dominios variables del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 (SEQ ID NOS:7 y 8) y los dominios constantes humanos. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo 5/44 quimérico comprende el dominio C kappa humano (Hieter *et al.*, Cell, 22, 197-207, 1980; número de acceso de Genbank J00241) en la cadena ligera y los 4 dominios gamma humanos (Flanagan *et al.*, Nature, 300, 709-713, 1982) en la cadena pesada, opcionalmente con el residuo de serina en la posición 241 reemplazado por un residuo de prolina.

- 40 Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (como ha sido definida por Kabat *et al.*, (cita anterior)) un H2' en el que una secuencia del sitio potencial de glicosilación ha sido eliminada y en el que inesperadamente ha aumentado la afinidad del anticuerpo 5/44 quimérico para el antígeno CD22 y que preferiblemente tiene como CDR-H2 la secuencia dada como H2' (SEQ ID NO:13).

- 45 Alternativamente o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (como ha sido definida por Kabat *et al.*, (cita anterior)) un H2'' en el que un residuo de lisina en la posición 60, que está localizado en una posición expuesta dentro de CDR-H2 y que se considera que tiene el potencial de reaccionar con agentes de conjugación dando como resultado una reducción de la afinidad de unión al antígeno, está sustituido por un aminoácido alternativo para producir una sustitución conservada. Preferiblemente CDR-H2 tiene la secuencia dada como H2'' (SEQ ID NO:15).

- 50 Alternativamente o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (como ha sido definida por Kabat *et al.*, (cita anterior)) un H2''' en el que tanto la secuencia del sitio potencial de glicosilación como el residuo de lisina en la posición 60, están sustituidos por aminoácidos alternativos. Preferiblemente CDR-H2 tiene la secuencia dada como H2''' (SEQ ID NO:16).

- 60 En una tercera realización alternativamente preferida, el anticuerpo según la presente invención es una molécula de anticuerpo injertada con CDR. La expresión "una molécula de anticuerpo injertada con CDR " como se usa aquí se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o la cadena ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una CDR modificada) procedentes de un anticuerpo del donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertadas en una cadena pesada y/o en una cadena ligera del marco de la región variable de un anticuerpo del aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano).

Preferiblemente, dicho anticuerpo injertado con CDR tiene un dominio variable que comprende las regiones marco del aceptor humano así como una o más CDR del donante mencionadas anteriormente.

5 Cuando se injertan las CDR, se puede usar cualquier secuencia marco apropiada de la región variable del aceptor teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo del donante del que se derivan las CDR, incluyendo las regiones marco de ratón, de primates y humanas. Ejemplos de marcos humanos que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.* (cita anterior)). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada, REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden usar secuencias de la línea germinal humana. La región marco preferida para la cadena ligera es la secuencia del subgrupo germinal humano (DPK9+JK1) que se muestra en la Figura 5 (SEQ ID NO: 17). La región marco preferida para la cadena pesada es la secuencia del subgrupo humano (DP7+JH4) que se muestra en la Figura 6 (SEQ ID NO:21).

15 En un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, se prefiere usar como anticuerpo del aceptor uno que tenga cadenas que sean homólogas a las cadenas del anticuerpo del donante. Las cadenas pesadas y ligeras del aceptor no tienen que ser derivadas necesariamente del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas con regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

20 También, en un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, las regiones marco no tienen que tener necesariamente exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo del aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales pueden ser cambiados a residuos que se presentan más frecuentemente para esa clase o tipo de cadena del aceptor. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones marco del aceptor se pueden cambiar para que se correspondan con el residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo del donante o con un residuo que es una sustitución conservadora del residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo del donante. Dichos cambios se deben mantener al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo del donante. En el documento WO 91/09967 se expone un protocolo para seleccionar residuos en las regiones marco del aceptor que puede ser necesario cambiar.

30 Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada con CDR según la presente invención, si la cadena ligera del aceptor tiene la secuencia del subgrupo DPK9+JK1 humano (mostrada en la Figura 5) (SEQ ID NO:17 (DPK9) más SEQ ID NO:18(JK1)) entonces las regiones marco del aceptor de la cadena ligera comprenden residuos del donante en las posiciones 2, 4, 37, 38, 45 y 60 y pueden comprender adicionalmente un residuo del donante en la posición 3 (según Kabat *et al.* (cita anterior)).

35 Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada con CDR de la presente invención, si la cadena pesada del aceptor tiene la secuencia DP7+JH4 humana (mostrada en la Figura 6 (SEQ ID NO:21 (DP7) más SEQ ID NO:22 (JH4))), entonces las regiones marco del aceptor de la cadena pesada comprenden, en adición a una o más CDR del donante, residuos del donante en las posiciones 1, 28, 48, 71 y 93 y pueden comprender adicionalmente residuos del donante en las posiciones 67 y 69 (según Kabat *et al.* (cita anterior)).

Los residuos del donante son residuos procedentes del anticuerpo del donante, esto es el anticuerpo del cual se derivaron originalmente las CDR.

45 Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (como ha sido definida por Kabat *et al.*, (cita anterior)) un H2' en el que una secuencia del sitio potencial de glicosilación ha sido eliminada para aumentar la afinidad del anticuerpo 5/44 quimérico para el antígeno CD22 y que preferiblemente tiene como CDR-H2 la secuencia dada como H2' (SEQ ID NO:13).

50 Alternativamente o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (como ha sido definida por Kabat *et al.*, (cita anterior)) un H2'' en el que un residuo de lisina en la posición 60, que está localizado en una posición expuesta dentro de CDR-H2 y que se considera que tiene el potencial de reaccionar con agentes de conjugación dando como resultado una reducción de la afinidad de unión al antígeno, está sustituido por un aminoácido alternativo. Preferiblemente CDR-H2 tiene la secuencia dada como H2'' (SEQ ID NO: 15).

60 Alternativamente o adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende como CDR-H2 (como ha sido definida por Kabat *et al.*, (cita anterior)) un H2''' en el que tanto la secuencia del sitio potencial de glicosilación como el residuo de lisina en la posición 60, están sustituidos por aminoácidos alternativos. Preferiblemente CDR-H2 tiene la secuencia dada como H2''' (SEQ ID NO:16).

65 La molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender: una molécula de anticuerpo completa, que tiene las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa; un fragmento de la misma, tal como un Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂ o fragmento Fv; un monómero o dímero de cadena ligera o cadena pesada; un anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo, un Fv de cadena sencilla en el que los dominios variables de cadena pesada y de

cadena ligera están unidos por un enlace peptídico. Similarmente, las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera se pueden combinar con otros dominios de anticuerpo cuando sea apropiado.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede tener unida a ella, una molécula efectora o una molécula indicadora. Por ejemplo, puede tener un macrociclo, para quelar un átomo de un metal pesado, o una toxina, tal como ricina, unida a ella por una estructura de puente covalente. Alternativamente, se pueden usar procedimientos de tecnología de ADN recombinante para producir una molécula de anticuerpo en la que el fragmento Fc (CH2, CH3 y dominios bisagra), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa han sido reemplazados, o han sido unidos a la misma por un enlace peptídico, una proteína no inmunoglobulina funcional, tal como una enzima o una molécula de toxina.

La molécula de anticuerpo de la presente invención, tiene preferiblemente una afinidad de unión de al menos $0,85 \times 10^{-10}$ M, más preferiblemente al menos $0,75 \times 10^{-10}$ M y lo más preferiblemente al menos $0,5 \times 10^{-10}$ M.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende el dominio variable de cadena ligera 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) y el dominio variable de cadena pesada 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27). Las secuencias de los dominios variables de estas cadenas ligeras y pesadas se muestran en las Figuras 5 y 6, respectivamente.

También se han descrito variantes de la molécula de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada para CD22. Dichas variantes se pueden obtener por una serie de protocolos de maduración de afinidad incluyendo la mutación de las CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), la mezcla de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), la mezcla de ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), la exposición de fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y la PCR sexual (Cramer *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (cita anterior) expone estos métodos de maduración de afinidad.

La presente invención proporciona también una secuencia de ADN que codifica la cadena o cadenas pesadas y/o ligeras de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o la cadena ligera de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por un proceso químico, cADN, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

La presente invención se refiere también a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o de expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente.

Los métodos generales por los que los vectores se pueden construir, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York y el Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

Las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican la totalidad o parte de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se pueden sintetizar como se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las correspondientes secuencias de aminoácidos.

El ADN que codifica las secuencias marco del aceptor está ampliamente disponible para los expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente sobre la base de sus secuencias conocidas de aminoácidos.

Las técnicas estándar de biología molecular se pueden usar para preparar las secuencias de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar la mutagénesis dirigida a un sitio y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según sea apropiado.

Se puede utilizar cualquier sistema adecuado de célula hospedante/vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpo tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, y especialmente los fragmentos Fv y los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo, los Fv de cadena sencilla. Se pueden usar sistemas de expresión de células hospedantes eucarióticas, por ejemplo, de mamífero, para la producción de moléculas de anticuerpo más grandes, incluyendo las moléculas de anticuerpo completas. Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen células de CHO, de mieloma o hibridoma.

La presente invención proporciona también un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo según la presente invención, que comprende el cultivo de una célula hospedante que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para llevar a la expresión de una proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y al aislamiento de la molécula de anticuerpo.

Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como cadenas ligeras, la línea de células se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un vector sencillo, y el vector incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

La presente invención proporciona también una composición terapéutica o para diagnóstico, que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona también un procedimiento para la preparación de una composición terapéutica o para diagnóstico, que comprende la mezcla de una molécula de anticuerpo de la presente invención junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición terapéutica o para diagnóstico o puede ir acompañado por otros ingredientes activos incluyendo otros ingredientes anticuerpos, por ejemplo células anti-T, anticuerpos anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos tales como las xantinas.

Las composiciones farmacéuticas preferiblemente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa aquí se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición determinada, o para poner de manifiesto un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal se puede usar también para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Dicha información se puede usar entonces para determinar las dosis útiles y las vías de administración en los seres humanos.

La cantidad eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, peso y sexo del sujeto, de la dieta, tiempo y frecuencia de la administración, combinación o combinaciones de fármacos, reacciones de sensibilidad y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar por experimentación rutinaria y depende de la opinión del clínico. Generalmente, una dosis eficaz variará de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, más preferiblemente aproximadamente 15 mg/kg.

Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la enfermedad a tratar, del grado de linfoma maligno o leucemia y de si la molécula de anticuerpo se usa profilácticamente o para tratar una afección existente.

La frecuencia de administración dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, 2 a 15 días) puede ser necesario administrar solamente una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

Una composición farmacéutica puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración del anticuerpo. El vehículo no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Pueden ser vehículos adecuados las macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como las proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de un ácido mineral, tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables de las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente pueden estar presentes en dichas composiciones, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del

pH. Tales vehículos hacen posible que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

Las formas preferidas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o perfusión, por ejemplo por inyección rápida o por perfusión continua. Cuando el producto es para inyección o para perfusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo acuoso u oleoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a ser tratados pueden ser animales. Sin embargo, es preferible que las composiciones se adapten para administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por toda serie de vías incluyendo, pero sin limitarse a ellas, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Los *hyposprays* se pueden usar también para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones. Se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos previamente a la inyección.

La administración directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, o se pueden administrar en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones se pueden administrar también en una lesión. La posología de tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Se puede apreciar que el ingrediente activo de la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición es para ser administrada por una vía que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que ha sido absorbido del tracto gastrointestinal.

Una exposición concienzuda de vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

También se contempla que el anticuerpo de la presente invención sea administrado mediante el uso de terapia génica. Con el fin de conseguir esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes apropiados de ADN se introducen en un paciente, de tal modo que las cadenas de anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y sean ensambladas *in situ*.

La presente invención proporciona también la molécula de anticuerpo de la presente invención, para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por las células que expresan CD22.

La presente invención proporciona además el uso de la molécula de anticuerpo según la presente invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por las células que expresan CD22.

La molécula de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en cualquier terapia en la que se desee reducir el nivel de células que expresan CD22 que están presentes en el cuerpo humano o animal. Estas células que expresan CD22 pueden estar circulando en el cuerpo o estar presentes a un nivel indeseablemente alto localizado en un sitio particular del cuerpo. Por ejemplo, los niveles elevados de células que expresan CD22 estarán presentes en los linfomas de células B y en las leucemias. Se puede utilizar la molécula de anticuerpo de la presente invención en la terapia de enfermedades mediadas por las células que expresan CD22.

La molécula de anticuerpo de la presente invención se usa preferiblemente para el tratamiento de linfomas malignos y leucemias, muy preferiblemente el NHL.

Se ha descrito un método para tratar sujetos humanos o animales que padecen o tienen riesgo de padecer un trastorno mediado por las células que expresan CD22, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

La molécula de anticuerpo de la presente invención se puede usar también en el diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico *in vivo* y en el diagnóstico por imagen de las enfermedades que implican células que expresan CD22.

La presente invención se describe adicionalmente sólo a modo de ilustración en los siguientes ejemplos, que hacen referencia a las Figuras adjuntas, en las cuales:

La Figura 1 presenta la secuencia de aminoácidos de las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 (SEQ ID NOS:1 a 6);

La Figura 2 presenta la secuencia completa del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44;

La Figura 3 presenta la secuencia completa del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44;

La Figura 4 presenta la estrategia para la eliminación del sitio de glicosilación y de la lisina reactiva en CDR-H2;

La Figura 5 presenta el diseño de injerto para la secuencia de cadena ligera 5/44;

La Figura 6 presenta el diseño de injerto para la secuencia de cadena pesada 5/44;

La Figura 7 presenta los vectores pMRR14 y pMRR10.1;

La Figura 8 presenta los resultados del ensayo Biacore de los mutantes 5/44 quiméricos;

La Figura 9 presenta los oligonucleótidos para el ensamblaje de los genes gH 1 y gL1 en 5/44;

La Figura 10 presenta los vectores intermedios pCR2.1 (544gH1) y pCR2.1 (544gL1);

La Figura 11 presenta las casetas de oligonucleótidos utilizadas para preparar injertos adicionales;

La Figura 12 presenta el ensayo de competición entre el anticuerpo de ratón 5/44 marcado fluorescentemente y las variantes injertadas; y

La Figura 13 presenta la secuencia completa de ADN y proteína de las cadenas pesadas y ligeras injertadas.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos candidatos

Se seleccionaron un panel de anticuerpos frente a CD22 a partir de hibridomas utilizando los siguientes criterios de selección: unión a células Daudi, interiorización sobre células Daudi, unión a células mononucleares de sangre periférica (PBMC), interiorización sobre PBMC, afinidad (superior a 10^{-9} M), γ 1 de ratón y tasa de producción. Se seleccionó el 5/44 como el anticuerpo preferido.

Ejemplo 2

Clonación y expresión génica de una molécula de anticuerpo 5/44 quimérico

Preparación de las células de hibridoma 5/44 y preparación del RNA a partir de ellas

El hibridoma 5/44 se generó por tecnología convencional de hibridoma después de la inmunización de ratones con proteína CD22 humana. Se preparó el RNA a partir de las células de hibridoma 5/44 utilizando un kit RNEasy (Qiagen, Crawley, UK; Catalogue No. 74106). El RNA obtenido se transcribió de forma inversa a cADN, como se describe más adelante.

Distribución de CD22 en los tumores de NHL

Se ha realizado un estudio inmunohistoquímico para examinar la incidencia y la distribución de la tinción utilizando anticuerpos monoclonales 5/44 anti-CD22. Se incluyeron en el estudio anticuerpos control anti-CD20 y anti-CD79a para confirmar las áreas de células B de los tumores.

Se estudió un total de 50 tumores y se dividieron en categorías como sigue utilizando los sistemas de clasificación de Formulación de Trabajo y el REAL:

- 7 Leucemias/linfomas linfoblásticos B (Grado alto/I)
- 4 Linfomas linfocíticos pequeños B-CLL (Grado bajo/A)
- 3 Inmunocitomas linfoplasmacitoides (Grado bajo /A)

- 1 Célula de cubierta (Grado intermedio/F)
- 14 Linfomas del centro folicular (Grado bajo a intermedio/D)
- 13 Linfomas de células grandes difusas (Grado intermedio a alto/G,H)
- 6 Inclasificables (K)
- 2 Linfomas de células T

40 linfomas de células B fueron positivos para el antígeno CD22 con el anticuerpo 5/44 a 0,1 µg/ml y otros 6 se convirtieron en positivos cuando la concentración aumentó a 0,5 µg/ml. Para los 2 tumores restantes de células B que fueron negativos a 0,1 µg/ml, hubo insuficiente tejido restante para analizar a la concentración más alta. Sin embargo, el ensayo paralelo con otro anticuerpo 6/13 anti-CD22 Celltech, que dio una tinción más fuerte que el 5/44, dio como resultado en los 48 linfomas de células B una tinción positiva para CD22.

Por tanto, es posible llegar a la conclusión de que el antígeno CD22 está ampliamente expresado en los linfomas de células B y por ello proporciona una diana adecuada para la inmunoterapia en el NHL.

Clonación por PCR de 5/44 V_H y V_L

Las secuencias de cADN que codifican los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de 5/44 se sintetizaron utilizando transcriptasa reversa para producir copias de cADN de una sola cadena del mRNA presente en el RNA total. Este se utilizó entonces como el modelo para la amplificación de las secuencias de la región V murina utilizando cebadores de oligonucleótidos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

a) Síntesis de cADN

El cADN se sintetizó en un volumen de reacción de 20 µl que contenía los siguientes reactivos: Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, ditiotretol 10 mM, MgCl₂ 3 mM, cada desoxiribonucleósido-trifosfato a concentración 0,5 mM, 20 unidades de RNAsin, 75 ng de cebador hexanucleótido aleatorio, 2 µg de RNA 5/44 y 200 unidades de transcriptasa reversa de virus de leucemia murina de Moloney. Después de incubación a 42 °C durante 60 minutos, se terminó la reacción calentando a 95 °C durante 5 minutos.

b) PCR

Se sometieron alícuotas de cADN a la PCR usando combinaciones de cebadores específicos para cadenas pesadas y ligeras. Se utilizaron como cebadores directos mezclas de cebadores degenerados diseñados para hibridarse con las secuencias del péptido señal. Todas estas secuencias contienen, en orden, un sitio de restricción (V_L SfuI; V_H HindIII) a partir de 7 nucleótidos de sus extremos 5', la secuencia GCCGCCACC (SEQ ID NO:50), para permitir la traducción óptima de los mRNA resultantes, un codón de iniciación y 20-30 nucleótidos basados en las secuencias del péptido líder de anticuerpos conocidos de ratón (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

Los cebadores 3' se diseñan para abarcar la unión J-C del marco 4 del anticuerpo y contienen un sitio de restricción para la enzima BsiWI para facilitar la clonación del fragmento V_L PCR. Los cebadores 3' de cadena pesada son una mezcla diseñada para abarcar la unión J-C del anticuerpo. El cebador 3' incluye un sitio de restricción ApaI para facilitar la clonación. La región 3' de los cebadores contiene una secuencia mixta basada en las que se encuentran en anticuerpos conocidos de ratón (Kabat *et al.*, 1991, cita anterior).

Las combinaciones de los cebadores descritos antes hacen posibles los productos de la PCR para que V_H y V_L sean clonados directamente en un vector de expresión apropiado (véase más adelante) para producir cadenas pesadas y ligeras quiméricas (de ratón-humano) y para que estos genes sean expresados en células de mamíferos para producir anticuerpos quiméricos del isotipo deseado.

Las incubaciones (100 µl) para la PCR se prepararon como sigue. Cada reacción contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,01 % p/v, cada desoxiribonucleósido-trifosfato a concentración 0,25 mM, 10 pmol de mezcla de cebador 5', 10 pmol de cebador 3', 1 µl de cADN y 1 unidad de Taq polimerasa. Se incubaron las reacciones a 95 °C durante 5 minutos y después se sometieron a ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos, se analizaron alícuotas de cada reacción por electroforesis sobre un gel de agarosa.

Para la región V de cadena pesada, solamente se obtuvo un producto de ADN amplificado cuando un grupo de cebadores hibridado dentro del comienzo del marco I reemplazó al grupo de cebadores del péptido señal. Los fragmentos se clonaron en vectores de secuenciación del ADN. Se determinó la secuencia de ADN y se tradujo para dar una secuencia deducida de aminoácidos. Esta secuencia deducida se verificó por referencia a la secuencia proteínica N-terminal determinada experimentalmente. Las figuras 2 y 3 presentan la secuencia proteínica de ADN de las regiones V maduras de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44 respectivamente.

c) Clonación molecular de los fragmentos de la PCR

Se clonaron entonces las secuencias de la región V murina en los vectores de expresión pMRR10.1 y pMRR14 (Figura 7). Estos son vectores para la expresión de la cadena ligera y de la cadena pesada respectivamente que contienen ADN que codifica las regiones constantes de la cadena ligera kappa humana y de la cadena pesada gamma-4 humana. La región V_L se subclonó hasta el vector de expresión por digestión de restricción y ligamiento a partir del vector de secuenciación, utilizando los sitios de restricción SfuI y BsiWI, creando el plásmido pMRR10(544cL). El ADN de cadena pesada se amplificó por la PCR utilizando un cebador 5' para introducir un péptido señal, ya que no se obtuvo éste en la estrategia de clonación - se empleó un anticuerpo líder de cadena pesada de ratón a partir de un hibridoma diferente interno (denominado 162). El cebador 5' tenía la siguiente secuencia:

5' GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCCTGGC
ACTCATTCTCAAGGGAGTGCAGTGTGAGGTGCAGCTCGTTCGAGTCTGG' (SEQ
ID NO:51).

El cebador inverso era idéntico al utilizado en la clonación del gen V_H original. El producto resultante de la PCR se digirió con enzimas HindIII y ApaI, se sub-clonó, y se confirmó su secuencia de ADN, creando el plásmido pMRR14(544cH). La co-transfección transitoria de ambos vectores de expresión en células CHO generó el anticuerpo c5/44 quimérico. Este se consiguió utilizando el reactivo de lipofectamina según los protocolos del fabricante (InVitrogen:Life Technology, Groningen, The Netherlands. Catalogue no. 11668-027).

Eliminación del sitio de glicosilación y de la lisina reactiva

Se observó en la CDR-H2 una secuencia del sitio potencial de glicosilación unido por N, que tiene la secuencia de aminoácidos N-Y-T (Figura 3). La SDS-PAGE, la transferencia Western y la tinción por carbohidrato de geles de 5/44 y sus fragmentos (incluyendo Fab) indicaron que este sitio estaba ciertamente glicosilado (no se muestra). En adición, se observó un residuo de lisina en una posición expuesta dentro de CDR-H2, que tenía el potencial de reducir la afinidad de unión del anticuerpo proporcionando un sitio adicional para la conjugación con un agente con el que se pueda conjugar el anticuerpo.

Se utilizó una estrategia de PCR para introducir sustituciones de aminoácidos en la secuencia de CDR-H2 en un intento de eliminar el sitio de glicosilación y/o la lisina reactiva, como se muestra en la Figura 4. Se utilizaron cebadores directos que codifican las mutaciones N55Q, T57A o T57V para eliminar el sitio de glicosilación (Figura 4) y se generó un cuarto cebador directo que contenía la sustitución K60R, para eliminar el residuo de lisina reactiva (Figura 4). Se utilizó un cebador inverso marco 4 en cada una de estas amplificaciones de la PCR. Los productos de la PCR se digirieron con las enzimas XbaI y ApaI y se insertaron en pMRR14(544cH) (también se escindieron con XbaI y ApaI) para generar plásmidos de expresión que codifican estos mutantes. Las mutaciones N55Q, T57A y T57V cortan el sitio de glicosilación mediante el cambio de la secuencia de aminoácidos fuera del consenso N-X-T/S mientras que la mutación K60R reemplaza la lisina potencialmente reactiva con el residuo de arginina cargado positivamente de forma similar. Los plásmidos de variante cH resultantes se co-transfectaron con el plásmido cL para generar variantes del anticuerpo quimérico expresado.

Evaluación de las actividades de los genes quiméricos

Las actividades de los genes quiméricos se evaluaron después de la transfección transitoria en células CHO.

c) Determinación de las constantes de afinidad por análisis BiaCore.

Las afinidades del 5/44 quimérico o sus variantes, en los que se han eliminado sus sitios de glicosilación o sus lisinas reactivas, se investigaron utilizando tecnología BIA para la unión a construcciones CD22-mFc. Los resultados se presentan en la Figura 8. Todas las medidas de unión se realizaron en el instrumento BIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). El ensayo se llevó a cabo mediante la captura de CD22mFc a través del Fc anti-ratón inmovilizado. El anticuerpo estaba en la fase soluble. Se inyectaron las muestras, el patrón, y los controles (50 ul) sobre el Fc anti-ratón inmovilizado seguido por el anticuerpo en la fase soluble. Después de cada ciclo, se regeneró la superficie con 50 ul de HCl 40 mM a 30 ul/min. Se realizó el análisis cinético utilizando el programa informático BIAevaluation 3.1 (Pharmacia).

La eliminación del sitio de glicosilación en la construcción T57A dio como resultado una constante de asociación ligeramente más rápida y una constante de disociación significativamente más lenta en comparación con el 5/44 quimérico, dando una mejora de la afinidad de aproximadamente 5 veces. La mutación N55Q no tuvo ningún efecto sobre la afinidad. Este resultado fue inesperado ya que da a entender que la eliminación del propio carbohidrato aparentemente no tuvo ningún efecto sobre la unión (como con el cambio de N55Q). Se observó mejor afinidad solamente con el cambio de T57A. Una posible explicación es que, a pesar de la presencia de carbohidrato, la treonina en la posición 57 ejerce un efecto negativo sobre la unión que es eliminado en la conversión de treonina a alanina. La hipótesis de que el pequeño tamaño de la alanina es importante, y que el efecto negativo de la treonina está relacionado con su tamaño, se basa en el resultado obtenido utilizando la mutación T57V: el reemplazamiento con valina en la posición 57 no es beneficioso (no se muestran los resultados).

La eliminación de la lisina por la mutación K60R tuvo un efecto neutro sobre la afinidad, esto es, la introducción de arginina elimina un sitio reactivo potencial sin comprometer la afinidad.

Las mutaciones para la eliminación del sitio de glicosilación y para la eliminación de la lisina reactiva fueron por tanto incluidas ambas en el diseño de humanización.

Ejemplo 2

Injerto de CDR del 5/44

La clonación molecular de genes de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo 5/44 y su uso para producir anticuerpos 5/44 quiméricos (de ratón/humano) han sido descritos anteriormente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los dominios V_L y V_H de 5/44 de ratón se muestran en las figuras 2 y 3 (SEQ ID NOS:7 y 8), respectivamente. Este ejemplo describe el injerto de CDR del anticuerpo 5/44 sobre marcos humanos para reducir la inmunogenicidad potencial en los seres humanos, según el método de Adair *et al.*, (WO91/09967).

Injerto de CDR de la cadena ligera de 5/44

El alineamiento de la secuencia proteínica con las secuencias de consenso de la región V de cadena ligera kappa del sub-grupo I humano indicó una identidad de la secuencia del 64 %. En consecuencia, para construir la cadena ligera injertada con CDR, las regiones marco del aceptor elegidas corresponden a las de la secuencia 012,DPK9 de la línea germinal del sub-grupo I humano VK. La secuencia del marco 4 del aceptor se derivó de la secuencia de la línea germinal de la región J humana JK1.

Una comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones marco de 5/44 murino y la secuencia del aceptor se da en la Figura 5 y muestra que hay 27 diferencias entre las cadenas del donante y del aceptor. En cada posición, se hizo un análisis del potencial del residuo murino para contribuir a la unión al antígeno, ya sea directa o indirectamente, mediante efectos sobre el empaquetado o en la interfase V_H/V_L . Cuando un residuo murino fue considerado importante y suficientemente diferente del residuo humano en términos de tamaño, polaridad o carga, entonces se retuvo dicho residuo murino. Basándose en este análisis, se construyeron dos versiones de la cadena ligera injertada con CDR, que tienen las secuencias dadas en la SEQ ID NO:19 y la SEQ ID NO:20 (Figura 5).

Injerto de CDR de la cadena pesada del 5/44

El injerto de CDR de la cadena pesada del 5/44 se llevó a cabo utilizando la misma estrategia que se ha descrito para la cadena ligera. Se encontró que el dominio V de la cadena pesada del 5/44 era homólogo a las cadenas pesadas humanas que pertenecen al sub-grupo I (70 % de identidad de secuencia) y por tanto se utilizó la secuencia VH1-3,DP7 del marco de la línea germinal del sub-grupo I humano como un marco del aceptor. Las secuencias del marco 4 del aceptor se derivaron de la secuencia de la línea germinal de la región J humana JH4.

Una comparación de la cadena pesada del 5/44 con las regiones marco se muestra en la Figura 6 en la que se puede ver que la cadena pesada de 5/44 difiere de la secuencia del aceptor en 22 posiciones. El análisis de la contribución que cualquiera de éstas puede hacer a la unión del antígeno lleva a 5 versiones de las cadenas pesadas injertadas con CDR a ser construidas, que tienen las secuencias dadas en las SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27 (Figura 6).

Construcción de genes para secuencias injertadas.

Se diseñaron genes para codificar las secuencias injertadas gH1 y gL1, y se diseñaron y construyeron una serie de oligonucleótidos solapantes (Figura 9). Se empleó una técnica de ensamblaje por la PCR para construir los genes de la región V injertada con CDR. Se prepararon volúmenes de reacción de 100 μ l que contenían Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,001 %, cada desoxiribonucleósido-trifosfato a concentración 0,25 mM, 1 pmol de cada uno de los cebadores 'internos' (T1, T2, T3, B1, B2, B3), 10 pmol de cada uno de los cebadores 'externos' (F1, R1), y 1 unidad de Taq polimerasa (AmpliTaq, Applied BioSystems, catalogue no. N808-0171). Los parámetros del ciclo de la PCR fueron 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, durante 30 ciclos. Los productos de reacción se aplicaron entonces a un gel de agarosa al 1,5 %, se separaron y se recuperaron utilizando columnas giratorias QIAGEN (kit de extracción en gel QIAquick, cat no. 28706). El ADN se eluyó

en un volumen de 30 µl. Se clonaron entonces alícuotas (1 µl) del ADN de gH1 y gL1 en el vector de clonación pCR2.1 TOPO de InVitrogen TOPO TA (catálogo no. K4500-01) según las instrucciones del fabricante. Este vector de no expresión sirvió como un intermedio de clonación para facilitar la secuenciación de un gran número de clones. La secuenciación de ADN utilizando cebadores específicos del vector se utilizó para identificar los clones correctos que contienen gH1 y gL1, creando los plásmidos pCR2.1 (544gH1) y pCR2.1 (544gL1) (Figura 10).

Se utilizó un método de reemplazamiento de casete de oligonucleótido para crear los injertos humanizados gH4, 5, 6 y 7, y gL2. La Figura 11 presenta el diseño de las casetes de oligonucleótidos. Para construir cada variante, se cortó el vector (pCR2.1 (544gH1) o pCR2.1(544gL1)) con las enzimas de restricción mostradas (XmaI/SacII para la cadena pesada, XmaI/BstEII para la cadena ligera). El fragmento grande del vector se purificó en gel a partir de agarosa y se utilizó en ligamiento con la casete de oligonucleótido. Estas casetes se componen de 2 oligonucleótidos complementarios (mostrados en la Figura 11), mezclados a una concentración de 0,5 pmol/µl en un volumen de 200 µl de Tris-HCl 12,5 mM pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, NaCl 25 mM, ditioeritritol 0,25 mM. La hibridación se alcanzó calentando a 95 °C durante 3 minutos en un baño de agua (500 ml de volumen) dejando después que la reacción se enfriara lentamente hasta temperatura ambiente. La casete de oligonucleótido hibridada se diluyó entonces diez veces en agua antes del ligamiento con el vector cortado apropiadamente. La secuenciación del ADN se utilizó para confirmar la secuencia correcta, creando los plásmidos pCR2.1 (5/44-gH4-7) y pCR2.1 (5/44-gL2). Las secuencias injertadas verificadas se subclonaron entonces en los vectores de expresión pMRR14 (cadena pesada) y pMR10.1 (cadena ligera).

Actividad de unión a CD22 de las secuencias injertadas con CDR

Los vectores que codifican las variantes injertadas fueron co-transfectados a células CHO en una variedad de combinaciones, junto con las cadenas del anticuerpo quimérico original. La actividad de unión se comparó en un ensayo de competición, compitiendo la unión del anticuerpo 5/44 original de ratón por la unión a células Ramos (obtenidas de ATCC, una línea celular humana de linfoblastos de linfoma de Burkitt que expresan CD22 en la superficie). Este ensayo se consideró el mejor modo de comparar los injertos en cuanto a su capacidad para unirse a CD22 de la superficie celular. Los resultados se presentan en la Figura 8. Como se puede ver, hay muy poca diferencia entre cualquiera de los injertos, comportándose todos de manera más eficaz que el quimérico en la competición frente al original murino. La introducción de los 3 residuos humanos adicionales en el extremo de CDR-H3 (gH5 y gH7) no parece haber afectado a la unión.

Se seleccionó la combinación de injertos con el menor número de residuos murinos, gL1gH7. El injerto de cadena ligera gL1 tiene 6 residuos del donante. Los residuos V2, V4, L37 y Q45 son potencialmente importantes residuos de empaquetado. El residuo H38 está en la interfase V_H/V_L. El residuo D60 es un residuo de superficie próximo a la CDR-L2 y puede contribuir directamente a la unión del antígeno. De estos residuos, se han encontrado V2, L37, Q45 y D60 en las secuencias de las líneas germinales de los genes kappa humanos procedentes de otros sub-grupos. El injerto de cadena pesada gH7 tiene 4 residuos marco del donante (el residuo R28 se considera parte de CDR-H1 en la definición estructural usada en el injerto de CDR (véase Adair *et al.* (1991 WO91/09967))). Los residuos E1 y A71 son residuos de superficie próximos a las CDR. El residuo 148 es un residuo potencial de empaquetado. El residuo T93 está presente en la interfase V_H/V_L. De estos residuos, E1 y A71 se encuentran en otros genes de las líneas germinales del sub-grupo I humano. El residuo 148 se encuentra en el sub-grupo 4 de la línea germinal humana, y el T73 se encuentra en el sub-grupo 3 de la línea germinal humana.

Las secuencias completas de ADN y proteína tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluyendo la posición aproximada de intrones dentro de los genes de la región constante proporcionados por los vectores, se muestran en la Figura 13 y se dan en las SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:28 respectivamente para la cadena ligera y en las SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO:30 respectivamente para la cadena pesada.

El ADN que codifica estos genes de cadena ligera y pesada fue eliminado de estos vectores. El ADN de cadena pesada fue digerido en el sitio HindIII de 5', después se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* para crear un extremo romo en 5'. La escisión en el sitio EcoRI de 3' dio como resultado el fragmento de cadena pesada que se purificó en geles de agarosa. Del mismo modo, se produjo un fragmento de cadena ligera, redondeado en el sitio SfuI de 5' y con un sitio EcoRI de 3'. Se clonaron ambos fragmentos en vectores de expresión basados en DHFR y se usaron para generar líneas celulares estables en células CHO.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Celltech R&D Limited

<120> PRODUCTOS BIOLÓGICOS

<160> 51

<170> SeqWin99, versión 1.02

<210> 1

<211> 5

<212> PRT
 <213> ratón
 <220>
 <221> CDR-H1 de 5/44 monoclonal de ratón
 5 <400> 1

 Asn Tyr Trp Ile His
 1 5

 10 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ratón
 <220>
 15 <221> CDR-H2 de 5/44 monoclonal de ratón

 <900> 2

 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15

 Gly
 20
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ratón
 25 <220>
 <221> CDR-H3 de 5/44 monoclonal de ratón

 <400> 3

 Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 30

 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 35 <213> ratón
 <220>
 <221> CDR-L1 de 5/44 monoclonal de ratón

 <400> 4
 40
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser
 1 5 10 15

 45 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ratón
 <220>
 50 <221> CDR-L2 de 5/44 monoclonal de ratón

 <400> 5

Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

5 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> ratón
<220>
10 <221> CDR-L3 de 5/44 monoclonal de ratón
<400> 6

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr
1 5

15

<210> 7
<211> 113
20 <212> PRT
<213> de ratón
<220>
<221> dominio VL de 5/44 monoclonal de ratón
25 <400> 7

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly
1 5 10 15

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

Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

30 <210> 8
<211> 121
<212> PRT
<213> ratón
<220>
<221> dominio VH de 5/44 monoclonal de ratón
35 <400> 8

ES 2 341 708 T7

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

5 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223>
 <220>
 <221> cH
 15 <400> 9

Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

20 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223>
 <220>
 <221> N55Q
 <400> 10

Gly Asn Gln Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10

30
 <210> 11
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223>
 <220>
 <221> T57A
 5 <400> 11
 Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10
 10 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223>
 <220>
 <221> T57V
 <400> 12
 20 Gly Asn Asn Tyr Val Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10
 <210> 13
 25 <211> 17
 <212> PRT
 <213>
 <220>
 <221> CDR-H2 (T57A) H'
 30 <400> 13
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223>
 <220>
 <221> K60R
 45 <400> 14
 Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys Gly
 1 5 10
 50 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213>
 <220>

<221> CDR-H2 (K60R) H"

<400> 15

Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys
1 5 10 15

5 Gly

<210> 16

<211> 17

10 <212> PRT

<213>

<220>

<221> CDR-H2 (T57A K60R) H"

15 <400> 16

Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys
1 5 10 15

Gly

20 <210> 17

<211> 70

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <221> DPK9

<400> 17

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
65 70

30

<210> 18

<211> 11

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> JK1

40 <400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

5 <210> 19
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>
10 <220>
<221> gL1

<400> 19

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

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

Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

15

<210> 20
<211> 113
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>
<220>
25 <221> gL2

<400> 20

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

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

Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

ES 2 341 708 T7

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95
Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 21
<211> 80
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<220>
<221> DP7

<400> 21

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

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<220>
<221> JH4

<400> 22

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>
<220>

ES 2 341 708 T7

<221> gH1

<400> 23

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

5

<210> 24

<211> 121

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<220>

15 <221> gH4

<400> 24

ES 2 341 708 T7

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

115

120

<210> 25
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>
 <220>
 <221> gH5
 <400> 25

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

15

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223>
 <220>
 <221> gH6
 10 <400> 26

 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 15 <210> 27
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223>
 <220>
 <221> gH7
 25 <400> 27

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

- 5 <210> 28
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>
 10 <220>
 <221> Secuencia completa de cadena ligera injertada
 <400> 28

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

<210> 29
 <211> 781
 5 <212> ADN
 <213>
 <220>
 <221> Secuencia completa de ADN de cadena ligera injertada

10 <400> 29

ES 2 341 708 T7

```

ttcgaagccg ccaccatgaa gttgcctggt aggctgttgg tgcttctggt gttctggatt 60
cctgcttccc ggggtgacgt tcaagtgacc cagagcccat ccagcctgag cgcactctgta 120
ggagaccggg tcaccatcac ttgtagatcc agtcagagtc ttgcaaacag ttatgggaac 180
acctttttgt cttggtatct gcacaaacca ggtaaagccc cacaattgct catctacgga 240
atctctaaca gatttagtgg tgtaccagac aggttcagcg gttccggaag tggtagtgat 300
ttcacccctca cgatctcgtc tctccagcca gaagatttcg ccacttatta ctgtttacaa 360
ggtacacatc agcogtacac attcggtcag ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta 420

gcggcccat ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc 480
tctgttggtg gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg 540
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac 600
agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa 660
gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac 720
aggggagaggt gtttagagggg gaagtgcgcc cacctgctcc tcagttccag cctgggaatt 780
c

```

<210> 30

5 <211> 467

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

10 <220>

<221> Secuencia completa de cadena pesada injertada

<400> 30

ES 2 341 708 T7

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

Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	225	230	235	240
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	245	250	255	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	260	265	270	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	275	280	285	
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	290	295	300	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	305	310	315	320
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	325	330	335	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	340	345	350	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	355	360	365	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	370	375	380	
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	385	390	395	400
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	405	410	415	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	420	425	430	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	435	440	445	
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	450	455	460	
Leu	Gly	Lys														465			

<210> 31

<211> 2160

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<220>

10 <221> Secuencia completa de ADN de cadena pesada injertada

<400> 31

ES 2 341 708 T7

aagcttgccg	ccaccatgga	cttcggatct	tctctcgtgt	tcctggcact	cattctcaag	60
ggagtgcagt	gtgaggtgca	attggtccag	tcaggagcag	aggtaagaa	gcctgggtgct	120
tccgtcaaag	tttcgtgtaa	ggctagcggc	tacaggttca	caaattattg	gattcattgg	180
gtcaggcagg	ctccgggaca	aggcctggaa	tggatcgggtg	gcattaatcc	cgggaataac	240
tacgctacat	ataggagaaa	attccagggc	agagttacga	tgaccgcgga	cacctccaca	300
agcactgtct	acatggagct	gtcatctctg	agatccgagg	acaccgcagt	gtactattgt	360
actagagaag	gctacggtaa	ttacggagcc	tggttcgcct	actggggcca	gggtacccta	420
gtcacagtct	cctcagcttc	tacaaagggc	ccatccgtct	tccccctggc	gccctgctcc	480
aggagcacct	ccgagagcac	agccgccctg	ggctgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaa	540
ccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcaggcgcc	ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttccccggt	600
gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcagc	660
ttgggcacga	agacctacac	ctgcaacgta	gatcacaagc	ccagcaacac	caaggtggac	720
aagagagtgt	gtgagaggcc	agcacaggga	gggaggggtg	ctgctggaag	ccaggctcag	780
ccctcctgcc	tggacgcacc	ccggctgtgc	agccccagcc	cagggcagca	aggcatgccc	840
catctgtctc	ctcaccggga	ggcctctgac	caccccactc	atgcccaggg	agaggggtctt	900
ctggattttt	ccaccaggct	ccgggcagcc	acaggctgga	tgcccctacc	ccaggccctg	960
cgcatacagg	ggcaggtgct	gcgctcagac	ctgccaagag	ccatatccgg	gaggaccctg	1020
cccctgacct	aagccccacc	caaaggccaa	actctccact	ccctcagctc	agacaccttc	1080
tctcctccca	gatctgagta	actcccaatc	ttctctctgc	agagtccaaa	tatggtcccc	1140
catgccacc	atgcccagg	aagccaacc	aggcctcgcc	ctccagctca	aggcgggaca	1200
ggtgcccctag	agtagcctgc	atccagggac	aggccccagc	cgggtgctga	cgcateccacc	1260
tccatctctt	cctcagcacc	tgagttcctg	gggggaccat	cagtcttcct	gttcccccca	1320
aaacccaagg	acactctcat	gatctcccgg	acccctgagg	tcacgtgcgt	ggtggtggac	1380
gtgagccagg	aagacccga	ggtccagttc	aactggtacg	tggatggcgt	ggaggtgcat	1440
aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	ttcaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	1500
ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaac	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	1560
aaaggcctcc	cgctcctccat	cgagaaaacc	atctccaaa	ccaaagggtg	gacccacggg	1620
gtgagggggc	cacatggaca	gaggtcagct	cggccccacc	tctgccctgg	gagtgaccgc	1680
tgtgccaacc	tctgtcccta	cagggcagcc	ccgagagcca	caggtgtaca	ccctgcccc	1740
atcccaggag	gagatgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgccctggtca	aaggcttcta	1800
ccccagcgac	atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	1860
cacgcctccc	gtgctggact	ccgacggctc	cttcttctct	tacagcaggc	taaccgtgga	1920
caagagcagg	tggcaggagg	ggaatgtctt	ctcatgtctc	gtgatgcatg	aggctctgca	1980
caaccactac	acacagaaga	gcctctccct	gtctctgggt	aaatgagtgc	cagggccggc	2040
aagccccccg	tccccgggct	ctcggggctg	cgcgaggatg	cttggcacgt	accccgctcta	2100
catacttccc	aggcaccag	catggaata	aagcaccac	cactgccctg	gctcgaattc	2160

<210> 32

5 <211> 94

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>

10 <220>

<221> 544gH1 T1

<400> 32

agtgtgaggt	gcaattggct	cagtcaggag	cagagggttaa	gaagcctggg	gcttccgtca	60
aagtttcgtg	taaggctagc	ggctacaggt	tcac			94

15

<210> 33

<211> 96

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<220>

<221> 544gH1 T2

25

<400> 33

ES 2 341 708 T7

gtggcattaa tcccgggaat cagtacacta catataaaag aaatctaaag ggcagagcaa 60
cgctgaccgc ggacacctcc acaagcactg tctaca 96

<210> 34
<211> 95
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>
<220>
10 <221> 544gH1 T3
<400> 34

agagaaggct acggtaatta cggagcctgg ttgcctact ggggccaggg taccctagtc 60
acagtctcct cagcttctac aaagggccca agaaa 95

<210> 35
<211> 94
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>
<220>
<221> 544 gH1 B1
25 <400> 35

ggaccaattg cacctcacac tgcactccct tgagaatgag tgccaggaac acgagagaga 60
atccgaagtc catggtggcg gcaagctttt attc 94

<210> 36
<211> 97
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223>
<220>
<221> 544gH1 B2
40 <400> 36

gattcccggg attaatgcca ccgatccatt ccaggccttg tcccggagcc tgccctgaccc 60
aatgaatcca ataatttgtg aacctgtagc cgctagc 97

<210> 37
<211> 93
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
50 <223>
<220>
<221> 549gH1 B3
55 <4.00> 37

cgtaattacc gtagccttct ctagtacaat agtacactgc ggtgtcctcg gatctcagag 60
atgacagctc catgtagaca gtgcttgtgg agg 93

<210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223>
 <220>
 <221> 544gH1 F1
 10 <400> 38
 gaataaaagc ttggcgccac c 21
 <210> 39
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>
 20 <220>
 <221> 544gH1 R1
 <400> 39
 25 ttcttgggc ccttgtaga ag 22
 <210> 40
 <211> 87
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>
 <220>
 <221> 544 gL1 T1
 35 <400> 40
 gcttcccggtt gtagcgttca agtgaccag agcccatcca gcctgagcgc atctgtagga 60
 gaccgggttca ccatcacttg tagatcc 87
 40 <210> 41
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223>
 <220>
 <221> 544 gL1 T2
 50 <400> 41
 tatctgcaca aaccaggtaa agccccacaa ttgctcatct acggaatctc taacagattt 60
 agtggtgtac cagacagggt cagcgggttcc 90
 55 <210> 42
 <211> 91
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223>
 <220>
 <221> 544gL1 T3

<400> 42

agatttcgcc acttattact gtttacaagg tacacatcag ccgtacacat tcggtcaggg 60
tactaaagta gaaatcaaac gtacggcgtg c 91

5

<210> 43
<211> 88
<212> ADN
<213>
<220>
<221> 544gL1 B1

10

<400> 43

15 gaacgtcacc ccgggaagca ggaatccaga acaacagaag caccaacagc ctaacaggca 60
acttcatggt ggcggcttcg aatcatcc 88

<210> 44
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>
<220>
<221> 544gL1 B2

20

25

<400> 44

30 ctttacctgg tttgtgcaga taccaagaca aaaagggtgtt cccataactg tttgcaagac 60
tctgactgga tctacaagtg atggtgac 88

<210> 45
<211> 90
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>
<220>
<221> 544gL1 B3

35

40

<400> 45

45 aacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggagagacga gatcgtgagg gtgaaatcag 60
taccacttcc ggaaccgctg aacctgtctg 90

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>
<220>
<221> 544gL1 F1

50

55

<400> 46

ggatgattcg aagccgccac 20

<210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213>
 <220>
 <221> 544gL1 R1

 <400> 47
 10 gcacgccgta cgttgattt c 21

 <210> 48
 <211> 339
 15 <212> ADN
 <213> ratón
 <220>
 <221> Secuencia del ADN de VL de 5/44 monoclonal de ratón

 20 <400> 48

 gatgttgtgg tgactcaaac tccactctcc ctgcctgtca gctttggaga tcaagtttct 60
 atctcttgca ggtctagtca gagtcttgca aacagttatg ggaacacctt tttgtcttgg 120
 tacctgcaca agcctggcca gtctccacag ctccctcatct atgggatttc caacagattt 180
 tctgggggtgc cagacagggt cactggcagt gggttcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcacaataa agcctgagga cttgggaatg tattactgct tacaaggtag acatcagccg 300
 taçacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgt 339

 25 <210> 49
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> ratón
 <220>
 30 <221> Secuencia del ADN de VH de 5/44 monoclonal de ratón

 <400> 49

 gaggtccaac tgcagcagtc tgggactgta ctggcaaggc ctggggcttc cgtgaagatg 60
 tccctgcaagg cttctggcta caggtttacc aactactgga ttcactgggt aaaacagagg 120
 cctgggcagg gtctagaatg gattgggtgt attaatcctg gaaataatta tactacgtat 180
 aagaggaact tgaagggcaa ggccacactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240
 atggacctca gcagcctgac aagtgaggac tctgcggtct attactgtac aagagagggc 300
 tatggtaact acggggcctg gtttgcttac tggggccagg ggactctggt caccgtctcc 360
 tca 363

 35

 <210> 50
 <211> 9
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia dentro del cebador oligonucleótido

 <400> 50
 45 gccgccacc 9

 <210> 51
 50 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 341 708 T7

<223> Cebador oligonucleótido 5'

<400> 51

gcgcgcaagc	ttgccgccac	catggacttc	ggattctctc	tcgtgttcc	ggcactcatt	60
ctcaagggag	tgcagtgtga	ggtgcagctc	gtcgagtctg	g		101

5

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para el CD22 humano, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende la SEQ ID NO:1 para CDR-H1, la secuencia GINPGNNYATYRRKFQG de gH7 de la Figura 6 o la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO:13 o la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO:16 para CDR-H2, y la SEQ ID NO:3 para CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende la SEQ ID NO:4 para CDR-L1, la SEQ ID NO:5 para CDR-L2 y la SEQ ID NO:6 para CDR-L3.
2. La molécula de anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende la secuencia GINPGNNYATYRRKFQG de gH7 de la Figura 6 para CDR-H2.
3. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que es una molécula de anticuerpo injertada con CDR.
4. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 3, en la que el dominio variable comprende regiones marco del aceptor humano y las CDR del donante no humano.
5. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 4, en la que las regiones marco del aceptor humano del dominio variable de la cadena pesada se basan en las SEQ ID NOs: 21 y 22 y comprenden residuos del donante en las posiciones 1, 28, 48, 71 y 93, numeradas según Kabat, que corresponden a los residuos 1, 28, 48, 72 y 97, respectivamente, en la SEQ ID NO:8.
6. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente residuos del donante en las posiciones 67 y 69, numeradas según Kabat, que corresponden a los residuos 68 y 70, respectivamente, en la SEQ ID NO:8.
7. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que las regiones marco del aceptor humano del dominio variable de la cadena ligera se basan en las SEQ ID NOs: 17 y 18 y comprenden residuos del donante en las posiciones 2, 4, 37, 38, 45 y 60, numeradas según Kabat, que corresponden a los residuos 2, 4, 42, 43, 50 y 65, respectivamente, en la SEQ ID NO:7.
8. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente un residuo del donante en la posición 3, numerada según Kabat, que corresponde al residuo en dicha posición en la SEQ ID NO:7.
9. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para el CD22 humano, que comprende una cadena pesada según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, y una cadena ligera según la reivindicación 7 o la reivindicación 8.
10. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la SEQ ID NO:19 (la región variable de cadena ligera 5/44-gL1) y la SEQ ID NO:27 (la región variable de cadena pesada 5/44-gH7).
11. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para el CD22 humano, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:28 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO:30.
12. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para el CD22 humano, que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO:28 y una cadena pesada que consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO:30.
13. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal anti-CD22 murino 5/44, en el que el dominio variable de la cadena ligera tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de la cadena pesada tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8.
14. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que es una molécula de anticuerpo quimérico que comprende las secuencias de los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 18, citados en la SEQ ID NO:7 y en la SEQ ID NO:8 respectivamente.
15. Una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada de una molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Una secuencia de ADN que codifica la cadena ligera de una molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
17. Una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada y la cadena ligera de una molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

18. Un vector de clonación o de expresión que comprende una secuencia de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.

5 19. Una célula hospedante que comprende un vector de clonación o de expresión según la reivindicación 18.

10 20. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o una secuencia de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, para uso en terapia.

21. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o 20, que tiene especificidad para el CD22 humano, o una secuencia de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 o 20, para uso en el tratamiento de una patología mediada por células que expresan CD22.

15 22. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, 20 o 21, o una secuencia de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, 20 o 21, para uso en el tratamiento de un linfoma maligno.

20 23. La molécula de anticuerpo o la secuencia de ADN de la reivindicación 22, en la que el linfoma maligno es linfoma no Hodgkin.

25 24. El uso de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que tiene especificidad para el CD22 humano, o el uso de una secuencia de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología mediada por células que expresan CD22.

25 El uso de la reivindicación 24, en el que la patología es un linfoma maligno.

30 26. El uso de la reivindicación 25, en el que el linfoma maligno es un linfoma no Hodgkin.

27. Una composición terapéutica o para diagnóstico, que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o la secuencia de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.

35 28. Una composición terapéutica que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 donde la molécula de anticuerpo tiene una toxina unida a la misma mediante una estructura de puente covalente, y que comprende un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 29. Una composición terapéutica o para diagnóstico según la reivindicación 27, que comprende adicionalmente anticuerpos anti-células T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos tales como las xantinas.

45 30. Un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende el cultivo de una célula hospedante según la reivindicación 19, en condiciones adecuadas para llevar a la expresión de una proteína a partir de ADN que codifica dicha molécula de anticuerpo y al aislamiento de dicha molécula de anticuerpo.

50 31. Un procedimiento para la preparación de una composición terapéutica o para diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, que comprende la mezcla de una molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1: Secuencia de las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 5/44

H1	NYWIIH	(SEQ ID NO:1)
H2	GINPGNNYTTYKRNLKG	(SEQ ID NO:2)
H3	EGYGNYGAWFAY	(SEQ ID NO:3)
L1	RSSQSLANSYGNTFLS	(SEQ ID NO:4)
L2	GISNRFS	(SEQ ID NO:5)
L3	LQGTHQPYT	(SEQ ID NO:6)

Figura 2: **Secuencia de ADN/Proteína de 5/44 V_L**

10	20	30	40	50	
GAT GTT GTG GTG ACT CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGC TTT GGA GAT CAA GTT					
CTA CAA CAC CAC TGA GTT TGA GGT GAG AGG GAC GGA CAG TCG AAA CCT CTA GTT CAA					
D V V V T Q T P L S L P V S F G D Q V>					
60	70	80	90	100	110
TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT GGG AAC ACC TTT TTG					
AGA TAG AGA ACG TCC AGA TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA CCC TTG TGG AAA AAC					
S I S C R S S Q S L A N S Y G N T F L>					
120	130	140	150	160	170
TCT TGG TAC CTG CAC AAG CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC					
AGA ACC ATG GAC GTG TTC GGA CCG GTC AGA GGT GTC GAG GAG TAG ATA CCC TAA AGG					
S W Y L H K P G Q S P Q L L I Y G I S>					
180	190	200	210	220	
AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC					
TTG TCT AAA AGA CCC CAC GGT CTG TCC AAG TGA CCG TCA CCA AGT CCC TGT CTA AAG					
N R F S G V P D R F T G S G S G T D F>					
230	240	250	260	270	280
ACA CTC AAG ATC AGC ACA ATA AAG CCT GAG GAC TTG GGA ATG TAT TAC TGC TTA CAA					
TGT GAG TTC TAG TCG TGT TAT TTC GGA CTC CTG AAC CCT TAC ATA ATG ACG AAT GTT					
T L K I S T I K P E D L G M Y Y C L Q>					
290	300	310	320	330	
GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGT					
CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGC AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCA					
G T H Q F Y T F G G G T K L E I K R>					

Figura 3: **Secuencia de ADN/Proteína de 5/44 V_H**

10	20	30	40	50	
GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGG ACT GTA CTG GCA AGG CCT GGG GCT TCC GTG AAG					
CTC CAG GTT GAC GTC GTC AGA CCC TGA CAT GAC CGT TCC GGA CCC CGA AGG CAC TTC					
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K>					
60	70	80	90	100	110
ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATT CAC TGG GTA AAA					
TAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TCC AAA TGG TTG ATG ACC TAA GTG ACC CAT TTT					
M S C K A S G Y R F T N Y W I H W V K>					
120	130	140	150	160	170
CAG AGG CCT GGG CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GGT ATT AAT CCT GGA AAT AAT TAT					
GTC TCC GGA CCC GTC CCA GAT CTT ACC TAA CCA CCA TAA TTA GGA CCT TTA TTA ATA					
Q R P G Q G L E W I G G I N P G N N Y>					
180	190	200	210	220	
ACT ACG TAT AAG AGG AAC TTG AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC					
TGA TGC ATA TTC TCC TTG AAC TTC CCG TTC CGG TGT GAC TGA CGT CAG TGT AGG CGG					
T T Y K R N L K G K A T L T A V T S A>					
230	240	250	260	270	280
AGC ACT GCC TAC ATG GAC CTC AGC AGC CTG ACA AGT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC					
TCG TGA CGG ATG TAC CTG GAG TCG TCG GAC TGT TCA CTC CTG AGA CGC CAG ATA ATG					
S T A Y M D L S S L T S E D S A V Y Y>					
290	300	310	320	330	340
TGT ACA AGA GAG GGC TAT GGT AAC TAC GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGG					
ACA TGT TCT CTC CCG ATA CCA TTG ATG CCC CGG ACC AAA CGA ATG ACC CCG GTC CCC					
C T R E G Y G N Y G A W F A Y W G Q G>					
350	360				
ACT CTG GTC ACC GTC TCC TCA					
TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT					
T L V T V S S>					

Figura 4: Eliminación del sitio de glicosilación y de la lisina reactiva

Estrategia de la PCR para mutar la CDR-H2 en el vector cH

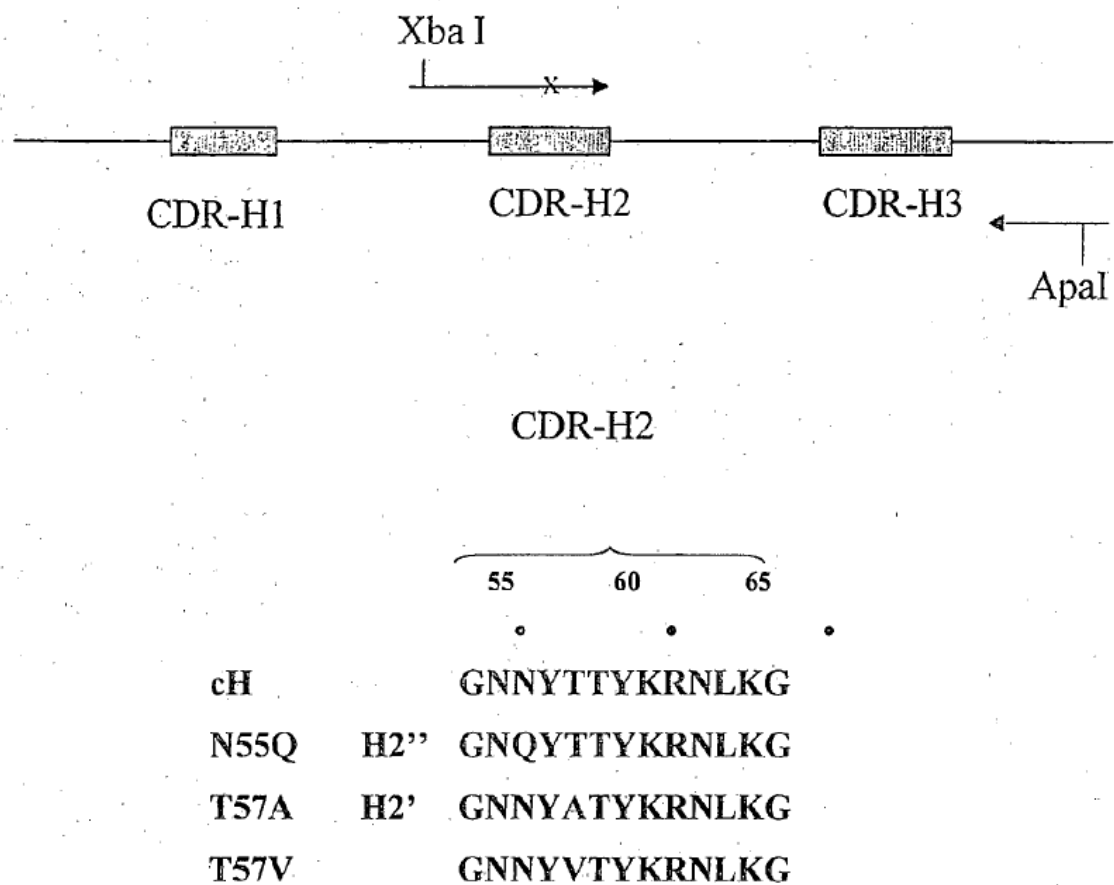


Figura 5: Diseño de injerto para la secuencia de cadena ligera 5/44

	10	20	40	
V _L	DVVVTQTPLSLPVSEFGDQVSISC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGQSPQLLIY	
DPK9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		WYQQKPGKAPKLLIY	
gL1	DVQVTQSPSSLSASVGDRVTITC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGKAPQLLIY	
gL2	DVVVTQSPSSLSASVGDRVTITC	RSSQSLANSYGNTFLS	WYLHKPGKAPQLLIY	
	60	70	80	90
V _L	GISNRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYC	LQGTHQPYT	
DPK9		GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC		
gL1	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	LQGTHQPYT	
gL2	GISNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	LQGTHQPYT	
	100			
V _L	FGGGTKLEIKR			
JK1	FGQGTKVEIKR			
gL1	FGQGTKVEIKR			
gL2	FGQGTKVEIKR			

DPK-9 es la secuencia marco de la línea germinal del aceptor humano.

Las líneas verticales indican diferencias entre los residuos de ratón y humanos.

Las secuencias subrayadas indican residuos del donante que han sido retenidos en el injerto.

Las CDR se indican en azul (no se muestran para DPK-9).

El injerto gL1 tiene 6 residuos marco del donante, el gL2 tiene 7.

Figura 6: Diseño de injerto para la secuencia de cadena pesada 5/44

	10	20	30	40	50
V _H	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYRFT	NYWIIH	WVKQRPQGQGLEWIG	GINP	
DP7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT		WVRQAPGQGLEWMG		
gH1	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFT</u>	NYWIIH	WVRQAPGQGLEWIG	GINP	
gH4,5,6,7	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFT</u>	NYWIIH	WVRQAPGQGLEWIG	GINP	
	60	70	80	90	100
V _H	GNNYTTYKRNLKG	KATLTAVTSASTAYMDLSSLTSEDSAVYYCTR	EGYGNYG		
DP7	KFQG	RVTMT	RDTSSTVYME	SSLRSEDTAVYYCAR	
gH1	GNNYTTYKRNLKG	<u>RATLT</u> ADTSTSTVYME	SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH4	GNNYATYRRNLKG	<u>RATLT</u> ADTSTSTVYME	SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH5	GNNYATYRRNLKG	RVTMTADTSTSTVYME	SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH6	GNNYATYRRKFQG	<u>RATLT</u> ADTSTSTVYME	SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH7	GNNYATYRRKFQG	RVTMTADTSTSTVYME	SSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
	110				
JH4	WGQGT	LVTVSS			
V _H	AWFAY	WGQGT	LVTVSS		
gH1	AWFAY	WGQGT	LVTVSS		
gH4,5,6,7	AWFAY	WGQGT	LVTVSS		

DPK-7 es la secuencia marco de la línea germinal del aceptor humano.

Las líneas verticales indican diferencias entre los residuos de ratón y humanos.

Las secuencias subrayadas indican residuos del donante que han sido retenidos en el injerto.

Las CDR se indican en azul (no se muestran para DP7).

Los injertos gH4 y gH16 tienen 6 residuos marco del donante. Los injertos gH5 y gH7 tienen 4.

Figura 7: Mapas de pMRR14 y pMRR10.1

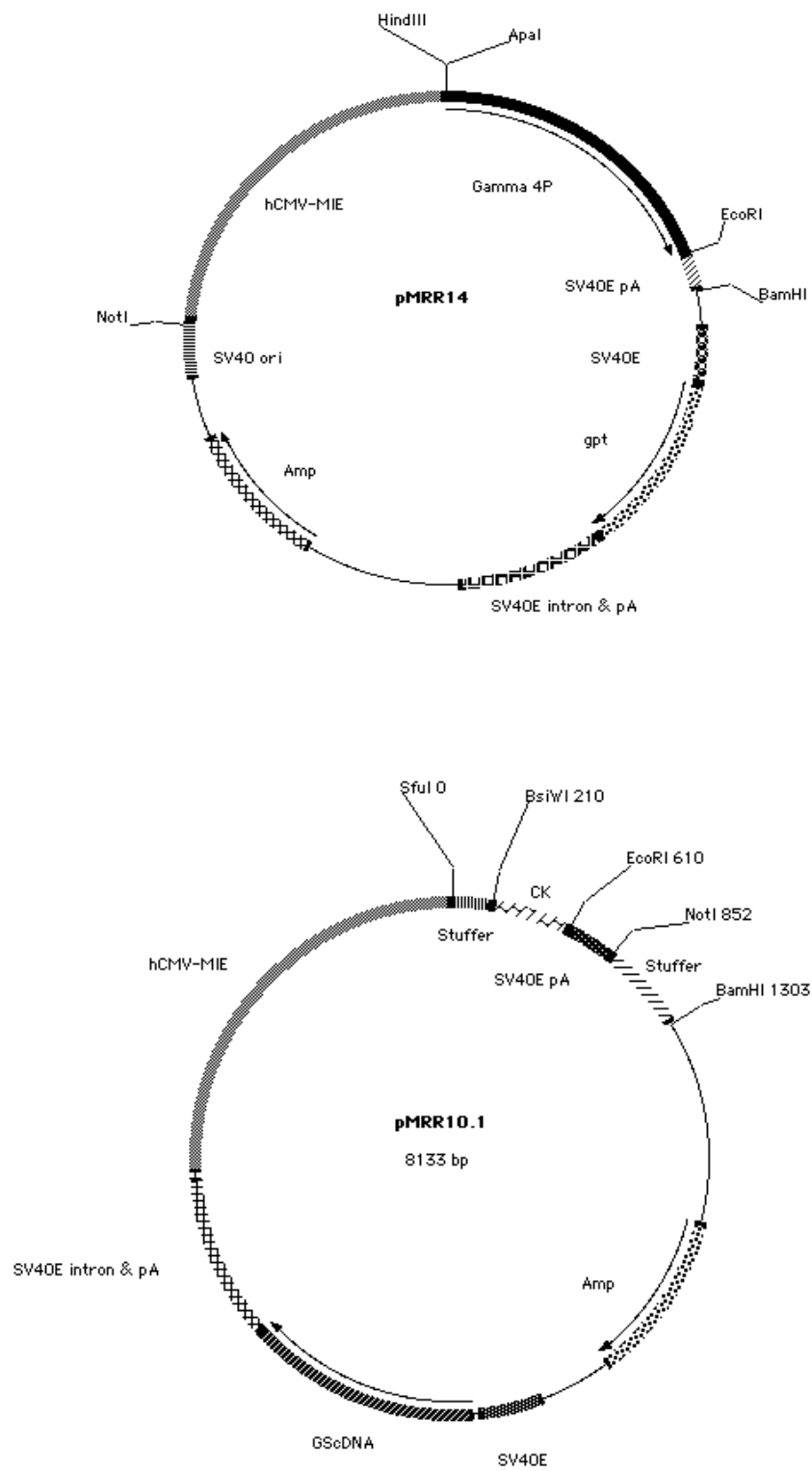


Figura 8: Ensayo Biacore de 5/44 quimérico y mutantes

5/44	Ka e⁵	Kd e⁻⁴	KD e⁻¹⁰	~KD nM
cLcH	2.9	1.14	3.93	0.4
N55Q	5.81	1.9	3.27	0.3
T57A	7.8	0.51	0.66	0.07
K60R	4.95	1.01	2.04	0.2

Figura 9: Oligonucleótidos para el ensamblaje de los genes 5/44 gH1 and gL1

Cadena pesada

544gH1 T1

AGTGTGAGGTGCAATTGGTCCAGTCAGGAGCAGAGGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCA
AAGTTTCGTGTAAGGCTAGCGGCTACAGGTTAC

544gH1 T2

GTGGCATTAAATCCCGGAATCAGTACACTACATATAAAAGAAATCTAAAGGGCAGAGCA
ACGCTGACCGCGGACACCTCCACAAGCACTGTCTACA

544gH1 T3

AGAGAAAGGCTACGGTAATTACGGAGCCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGTACCCTAGTC
ACAGTCTCCTCAGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

544 gH1 B1

GGACCAATTGCACCTCACACTGCACTCCCTTGAGAATGAGTGCCAGGAACACGAGAGAG
AATCCGAAGTCCATGGTGGCGGCAAGCTTTTATTC

544 gH1 B2

GATTCCCGGGATTAATGCCACCGATCCATTCCAGGCCTTGTCCTCGGAGCCTGCCTGACCC
AATGAATCCAATAATTTGTGAACCTGTAGCCGCTAGC

544gH1 B3

CGTAATTACCGTAGCCTTCTCTAGTACAATAGTACACTGCGGTGTCCTCGGATCTCAGAG
ATGACAGCTCCATGTAGACAGTGCTTGTGGAGG

544gH1 F1

GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

544gH1 R1

TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

Figura 9 cont.

Cadena ligera

544 gL1 T1

GCTTCCCGGGGTGACGTTCAAGTGACCCAGAGCCCATCCAGCCTGAGCGCATCTGTAGGA
GACCGGGTCACCATCACTTGTAGATCC

544 gL1 T2

TATCTGCACAAACCAGGTAAAGCCCCACAATTGCTCATCTACGGAATCTCTAACAGATTT
AGTGGTGTACCAGACAGGTTCAAGCGGTTCC

544gL1 T3

AGATTTGCGCACTTATTACTGTTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACATTCGGTCAGGG
TACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC

544gL1 B1

GAACGTCACCCCGGAAGCAGGAATCCAGAACAACAGAAGCACCAACAGCCTAACAGG
CAACTTCATGGTGGCGGCTTCGAATCATCC

544gL1 B2

CTTTACCTGGTTTGTGCAGATACCAAGACAAAAAGGTGTTCCCATAACTGTTTGCAAGAC
TCTGACTGGATCTACAAGTGATGGTGAC

544gL1 B3

AACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGAGACGAGATCGTGAGGGTGAAATCA
GTACCACTTCCGGAACCGCTGAACCTGTCTG

544gL1 F1

GGATGATTCTGAAGCCGCCAC

544gL1 R1

GCACGCCGTACGTTTGATTTC

Figura 10: Mapas plasmídicos de los vectores intermedios pCR2.1 (544gH1) y pCR2.1(544gL1)

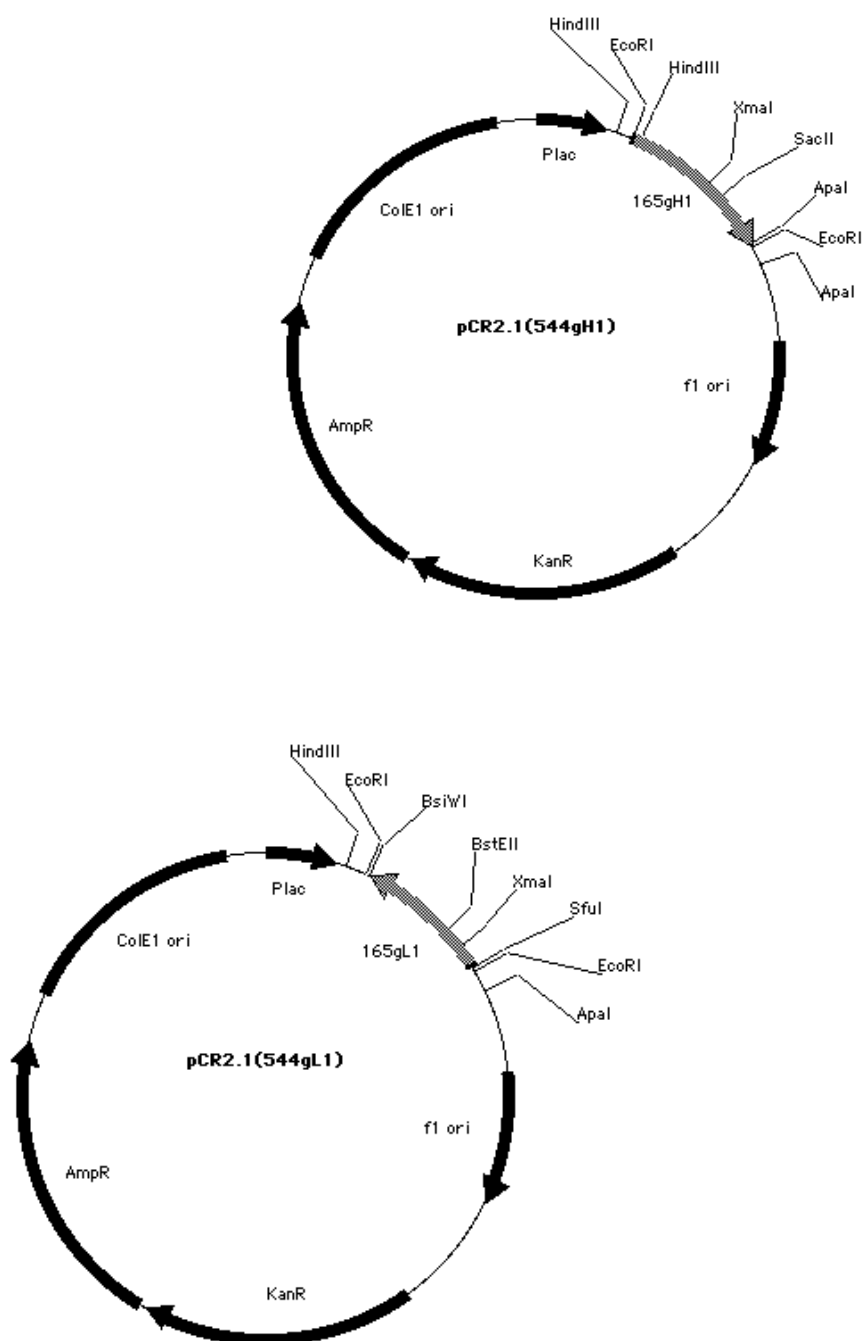


Figura 11: Casetes de oligonucleótidos utilizadas para preparar injertos adicionales**gH4**

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG						
P G N N Y A T Y R R N L K G R A T L T A						

gH5

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A						

gH6

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R A T L T A						

gH7

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	<u>SacII</u>
CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC						
C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG						
P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A						

gL2

<u>XmaI</u>	10	20	30	40	50	60	<u>BstEII</u>
C CGG GGT GAC GTT GTC GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG							
CCA CTG CAA CAG CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC CAG TG							
S R G D V V V T Q S P S S L S A S V G D R V T							

Figura 12: Ensayo de competición, entre la unión del anticuerpo de ratón 5/44 marcado fluorescentemente y la de las variantes injertadas.

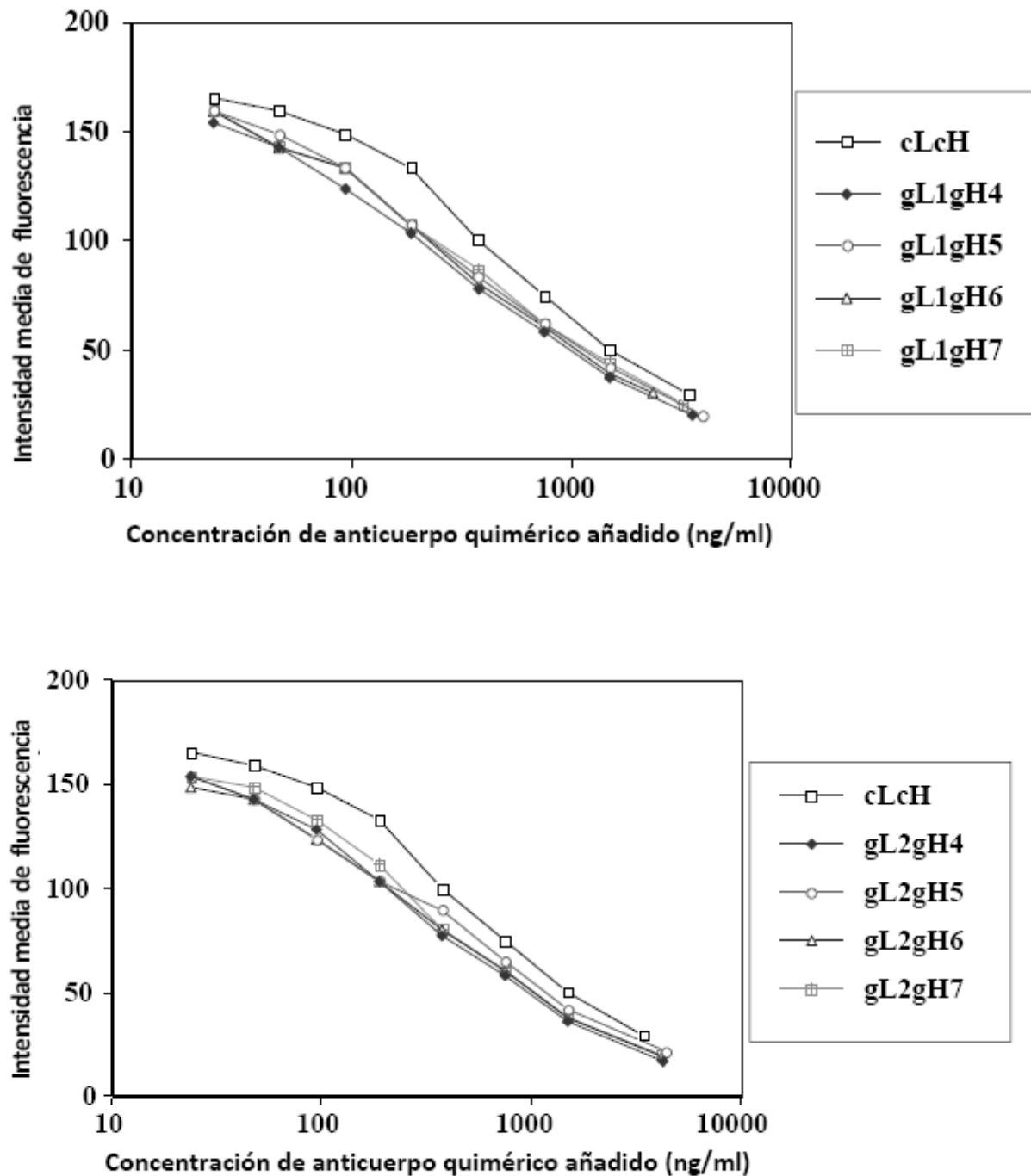


Figura 13: Secuencia completa de ADN de cadenas pesadas y ligeras injertadas**a) Cadena pesada**

```

      10      20      30      40      50      60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M   D   F   G   F   S   L   V   F   L   A   L   I   L   K>

      70      80      90      100     110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
G   V   Q   C   E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G>

120      130      140      150      160      170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   R   F   T   N   Y   W   I>

      180      190      200      210      220      230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
H   W   V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   G   I   N   P>

      240      250      260      270      280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
G   N   N   Y   A   T   Y   R   R   K   F   Q   G   R   V   T   M   T   A>

290      300      310      320      330      340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
D   T   S   T   S   T   V   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T>

      350      360      370      380      390      400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
A   V   Y   Y   C   T   R   E   G   Y   G   N   Y   G   A   W   F   A   Y>

      410      420      430      440      450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V>

460      470      480      490      500      510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
F   P   L   A   P   C   S   R   S   T   S   E   S   T   A   A   L   G   C>

```

Figura 13 cont.

```

520      530      540      550      560      570
CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG
GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L>

580      590      600      610      620      630
ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC
TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG
T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L>

640      650      660      670      680
AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC
TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG
S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N>

690      700      710      720      730      740
GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT G GTGAGAGGCC
CAT CTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCGG
V D H K P S N T K V D K R V>

750      760      770      780      790      800      810
AGCACAGGGA GGGAGGGTGT CTGCTGGAAG CCAGGCTCAG CCTCCTGCC TGGACGCACC CCGGCTGTGC
TCGTGTCCCT CCTCCACACA GACGACCTTC GGTCCGAGTC GGGAGGACGG ACCTGCGTGG GGCCGACACG

820      830      840      850      860      870      880
AGCCCCAGCC CAGGGCAGCA AGGCATGCCC CATCTGTCTC CTCACCCGGA GGCCTCTGAC CACCCCACTC
TCGGGGTCGG GTCCCGTCGT TCCGTACGGG GTAGACAGAG GAGTGGGCCT CCGGAGACTG GTGGGGTGAG

890      900      910      920      930      940      950
ATGCCAGGG AGAGGGTCTT CTGGATTTTT CCACGAGGCT CCGGGCAGCC ACAGGCTGGA TGCCCTTACC
TACGGGTCCC TCTCCAGAA GACCTAAAAA GGTGGTCCGA GGCCCGTCGG TGTCGACCT ACGGGGATGG

960      970      980      990      1000      1010      1020
CCAGGCCCTG CGCATACAGG GGCAGGTGCT GCGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG GAGGACCCCTG
GGTCCGGGAC GCGTATGTCC CGTCCACGA CCGAGTCTG GACGGTTCTC GGTATAGGCC CTCCTGGGAC

1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090
CCCCTGACCT AAGCCCAACC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCTCAGCTC AGACACCTTC TCTCCTCCCA
GGGACTGGA TTCGGGTGGG GTTCCGGTT TGAGAGGTGA GGGAGTCGAG TCTGTGGAAG AGAGGAGGGT

1100      1110      1120      1130      1140      1150
GATCTGAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA
CTAGACTCAT TGAGGGTTAG AAGAGAGACG T CTC AGG TTT ATA CCA GGG GGT ACG GGT GGT
E S K Y G P P C P P>

```

Figura 13 cont.

```

1160      1170      1180      1190      1200      1210      1220
TGC CCA GGT AAGCCAACCC AGGCCTCGCC CTCCAGCTCA AGGCGGGACA GGTGCCCTAG AGTAGCCTGC
ACG GGT CCA TTCGGTTGGG TCCGGAGCGG GAGGTCGAGT TCCGCCCTGT CCACGGGATC TCATCGGACG
C   P>

      1230      1240      1250      1260      1270      1280
ATCCAGGGAC AGGCCCCAGC CGGGTGCTGA CGCATCCACC TCCATCTCTT CCTCA GCA CCT GAG TTC
TAGGTCCCTG TCCGGGGTCG GCCACGACT GCGTAGGTGG AGGTAGAGAA GGAGT CGT GGA CTC AAG
                                     A   P   E   F>

1290      1300      1310      1320      1330      1340
CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
L   G   G   P   S   V   F   L   F   P   P   K   P   K   D   T   L   M   I>

      1350      1360      1370      1380      1390      1400
TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
S   R   T   P   E   V   T   C   V   V   V   D   V   S   Q   E   D   P   E>

      1410      1420      1430      1440      1450
GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC
V   Q   F   N   W   Y   V   D   G   V   E   V   H   N   A   K   T   K   P>

1460      1470      1480      1490      1500      1510
CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
R   E   E   Q   F   N   S   T   Y   R   V   V   S   V   L   T   V   L   H>

      1520      1530      1540      1550      1560      1570
CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
Q   D   W   L   N   G   K   E   Y   K   C   K   V   S   N   K   G   L   P>

      1580      1590      1600      1610      1620      1630
TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGG GACCCACGGG GTGCGAGGGG
AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCACC CTGGGTGCCC CACGCTCCCG
S   S   I   E   K   T   I   S   K   A   K>

      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
CACATGGACA GAGGTCAGCT CGGCCCCACC TCTGCCCTGG GAGTGACCGC TGTGCCAACC TCTGTCCCTA
GTGTACCTGT CTCCAGTCGA GCCGGGTGGG AGACGGGACC CTCACTGGCG ACACGGTTGG AGACAGGGAT

```

Figura 13 cont.

1710	1720	1730	1740	1750		
CA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG						
GT CCC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC						
G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M>						
1760	1770	1780	1790	1800	1810	
ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC						
TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG						
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I>						
1820	1830	1840	1850	1860	1870	
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC						
CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG						
A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P>						
1880	1890	1900	1910	1920		
GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC						
CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG						
V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S>						
1930	1940	1950	1960	1970	1980	
AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC						
TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG						
R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N>						
1990	2000	2010	2020	2030	2040	
CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA GTGC CAGGGCCGGC						
GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC CCA TTT ACT CACG GTCCCGGCCG						
H Y T Q K S L S L S L G K *>						
2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110
AAGCCCCCGC TCCCCGGGCT CTCGGGGTGG CGCGAGGATG CTTGGCACGT ACCCCGTCTA CATACTTCCC						
TTCGGGGGCG AGGGGCCCCGA GAGCCCCAGC GCGCTCCTAC GAACCGTGCA TGGGGCAGAT GTATGAAGGG						
2120	2130	2140	2150	2160		
AGGCACCCAG CATGGAATA AAGCACCCAC CACTGCCCTG GCTCGAATTC						
TCCGTGGGTC GTACCTTTAT TTCGTGGGTG GTGACGGGAC CGAGCTTAAG						

Figura 13 cont.

b) Cadena ligera

```

      10      20      30      40      50      60
TTCGAAGCCG CCACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT
AAGCTTCGGC GGTGG TAC TTC AAC GGA CAA TCC GAC AAC CAC GAA GAC AAC AAG ACC TAA
      M   K   L   P   V   R   L   L   V   L   L   L   F   W   I>

      70      80      90     100     110
CCT GCT TCC CGG GGT GAC GTT CAA GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT
GGA CGA AGG GCC CCA CTG CAA GTT CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA
P   A   S   R   G   D   V   Q   V   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S>

120      130      140      150      160      170
GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACT TGT AGA TCC AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT
CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGA ACA TCT AGG TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA
V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   S   S   Q   S   L   A   N   S   Y>

      180      190      200      210      220      230
GGG AAC ACC TTT TTG TCT TGG TAT CTG CAC AAA CCA GGT AAA GCC CCA CAA TTG CTC
CCC TTG TGG AAA AAC AGA ACC ATA GAC GTG TTT GGT CCA TTT CGG GGT GTT AAC GAG
G   N   T   F   L   S   W   Y   L   H   K   P   G   K   A   P   Q   L   L>

      240      250      260      270      280
ATC TAC GGA ATC TCT AAC AGA TTT AGT GGT GTA CCA GAC AGG TTC AGC GGT TCC GGA
TAG ATG CCT TAG AGA TTG TCT AAA TCA CCA CAT GGT CTG TCC AAG TCG CCA AGG CCT
I   Y   G   I   S   N   R   F   S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   G>

290      300      310      320      330      340
AGT GGT ACT GAT TTC ACC CTC ACG ATC TCG TCT CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT
TCA CCA TGA CTA AAG TGG GAG TGC TAG AGC AGA GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA
S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T>

      350      360      370      380      390      400
TAT TAC TGT TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA
ATA ATG ACA AAT GTT CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT
Y   Y   C   L   Q   G   T   H   Q   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   V>

      410      420      430      440      450
GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC
E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S   D   E>

460      470      480      490      500      510
CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT
Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R>

```

Figura 13 cont.

```

      520      530      540      550      560      570
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG
CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC
E  A  K  V  Q  W  K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E>

      580      590      600      610      620      630
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC
S  V  T  E  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T>

      640      650      660      670      680
CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC
L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V  Y  A  C  E  V  T  H  Q>

      690      700      710      720      730      740
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG AGGGA
CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TCCCT
G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  N  R  G  E  C  *>

      750      760      770      780
GAAGTGCCCC CACCTGCTCC TCAGTTCCAG CCTGGGAATT C
CTTCACGGGG GTGGACGAGG AGTCAAGGTC GGACCCTTAA G

```