



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 190**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) **C12P 21/08** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) **C07K 14/715** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02770179 .6**

96 Fecha de presentación : **30.08.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1449850**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54

Título: **Anticuerpos injertados con CDR humanos y fragmentos de anticuerpo de los mismos.**

30

Prioridad: **31.08.2001 JP 2001-265144**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.04.2011

73

Titular/es: **KYOWA HAKKO KIRIN Co., Ltd.**
1-6-1, Ohtemachi
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP

72

Inventor/es: **Shitara, Kenya;**
Nakamura, Kazuyasu;
Hosaka, Emi;
Shimizu, Akiko, y
Koike, Masamichi

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 356 190 T3

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

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con la región extracelular del receptor 4 humano de quimiocina CC (denominado en adelante "CCR4") pero no reacciona con una plaqueta de la sangre y al fragmento de anticuerpo del mismo. Además, la presente invención se refiere a un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con la región extracelular del CCR4 humano pero no tiene actividad inhibidora de un ligando de CCR4 tal como TARC o MDC que se une a CCR4 y al fragmento de anticuerpo del mismo. Por otra parte, la presente invención se refiere a un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con la región extracelular de CCR4, tiene actividad citotóxica y una actividad inhibidora de la producción de citocinas por los linfocitos Th2, y comprende una región determinante de complementariedad específica (denominada en adelante "CDR"), y el fragmento de anticuerpo del mismo. Además, la presente invención se refiere a un ADN que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo. Además, la presente invención se refiere a un vector que comprende el ADN, y a un transformante transformado con el vector. Por otra parte, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo utilizando el transformante, y a un medicamento tal como un agente terapéutico, un agente de diagnóstico y similares, para enfermedades inmunitarias mediadas por Th2 tales como las enfermedades alérgicas y similares, que comprende utilizar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo. Además, la presente invención se refiere a un medicamento, tal como un agente terapéutico, un agente de diagnóstico y similares, para cánceres tales como cánceres de la sangre, por ejemplo, leucemia y linfomatosis que comprende utilizar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Varios factores tales como los eosinófilos, mastocitos e IgE y similares, desempeñan una función en las enfermedades alérgicas tales como el asma bronquial. Los eosinófilos se infiltran en una zona inflamatoria y liberan proteínas citotóxicas básicas tales como MBP (proteína básica principal) o similares por desgranulación y dichas proteínas básicas citotóxicas dañan los tejidos circundantes. Los mastocitos están unidos a un complejo inmunitario antigénico con IgE que es producido por los linfocitos B y liberan histamina de modo que se provoca una reacción alérgica inmediata. La reacción alérgica es controlada por moléculas biológicamente funcionales tales como las citocinas, quimiocinas, y similares, que forman parte en la transducción de señal entre las células. La IL-5 produce diferenciación, supervivencia y desgranulación de eosinófilos. La IL-4 provoca la activación de linfocitos B y la producción de IgE. La IgE producida forma un complejo inmunitario con el antígeno y origina la desgranulación de los mastocitos. Se ha descubierto que IL-4, IL-13 y similares son también producidas por los mastocitos y contribuyen a la producción de IgE por los linfocitos B (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152, 2059 (1995), *Immunol. Today*, 15, 19 (1994)). De este modo, una red de citocina-quimiocina elaborada está presente entre las células inflamatorias y mantiene complicados equilibrios.

Las citocinas y las quimiocinas son producidas por los linfocitos T colaboradores que expresan CD4 en la superficie celular (en adelante denominadas "células CD4+Th"). Actualmente, se ha descubierto que la infiltración de linfocitos T colaboradores se encuentra en la zona de inflamación de las vías respiratorias de los pacientes de asma bronquial, en los que un número considerablemente grande de linfocitos T están activados y que la gravedad e hipersensibilidad de las vías respiratorias del paciente con asma se correlaciona con el número de linfocitos T activados, así como los linfocitos T activados aumentan también en la sangre periférica (*Am. Rev. Respir. Dis.*, 145, S22, (1992)).

Los linfocitos T colaboradores se clasifican en linfocitos Th1 y linfocitos Th2, dependiendo del tipo de citocina que produzcan (*Annu. Rev. Immunol.*, 7, 145 (1989)). Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-13 y similares. Las citocinas producidas por los linfocitos Th2 son citocinas Th2.

Se ha descubierto que un clon de linfocitos T específico para el antígeno aislado de un paciente de atopia libera citocinas Th2 cuando es estimulado *in vitro* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:4538, (1991)) y los linfocitos Th2 están presentes en el fluido de lavado bronquioalveolar (denominado en adelante "BAL") y la mucosa de las vías respiratorias de los pacientes con asma (*N. Engl. J. Med.*, 326, 298, (1992), (*Eur. J. Immunol.*, 23, 1445 (1993)). Los niveles de expresión de los ARNm en IL-4 e IL-5 de las citocinas Th2 aumentan cuando las expresiones del ARNm de varias citocinas en células en BAL se examinan utilizando un modelo de animal con inflamación alérgica (*Clin Immunol. Immunopathol.*, 75, 75, (1995)). Además, cuando los linfocitos Th2 se administran por vía intravenosa o intranasal a ratones, se provoca inflamación asmática en los pulmones de manera específica para el antígeno (*J. Exp. Med.*, 186, 1737 (1997), *J. Immunol.*, 160, 1378 (1998)) y se observa eosinofilia (*J. Immunol.*, 161, 3128 (1998)). La expresión de IL-5 se observa en la mucosa de las vías respiratorias de pacientes con asma y lesiones en la piel en pacientes con dermatitis atópica (*J. Clin. Invest.*, 87, 1541, (1991), *J. Exp. Med.*, 173, 775 (1991)), y el nivel de expresión de IL-5 en la mucosa de rinitis alérgica crónica se correlaciona con el nivel de expresión de IL-13, y con las cantidades de IgE total en el suero e IgE específica del antígeno (*Therapeutics*, 32, 19, (1998)).

Quimiocina es un vocablo general para las proteínas básicas que se unen a la heparina que provoca quimiotaxia y activación de leucocitos, y se clasifica en subfamilias de CXC, CC, C y CX₃C dependiendo de la posición de los restos de cisteína en la estructura primaria. Hasta ahora se han identificado 16 de los receptores de

quimiocina (*Curr. Opi. Immunol.*, 11, 626, (1999)), y se ha demostrado que la expresión de cada receptor de quimiocina es diferente entre los leucocitos tales como los linfocitos Th1, linfocitos Th2 o similares (*Cell Engineering*, 17, 1022 (1998)).

5 El CCR4 humano es un receptor transmembranario con siete dominios acoplado a la proteína G clonado como K5-5 procedente de una estirpe celular humana KU-812 basófila e inmadura. Las zonas transmembranarias de CCR4 se considera que son las posiciones 40 a 67, las posiciones 78 a 97, las posiciones 113 a 133, las posiciones 151 a 175, las posiciones 207 a 226, las posiciones 243 a 270 y las posiciones 285 a 308 en la secuencia de aminoácidos, las regiones extracelulares se consideran que son las posiciones 1 a 39, las posiciones 98 a 112, las posiciones 176 a 206 y las posiciones 271 a 284 en la secuencia de aminoácidos, y las regiones intracelulares son las posiciones 68 a 77, las posiciones 134 a 150, las posiciones 227 a 242 y las posiciones 309 a 360 en la secuencia de aminoácidos (*J. Biol. Chem.*, 270, 19495 (1995)). En primer lugar, se dio cuenta de que el ligando de CCR4 es MIP-1 α (proteína 1 α inflamatoria de macrófago), RANTES (regulado en activación de linfocitos T normales expresado y segregados) o MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos) (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218, 337, (1996), documento WO 96/23068). Sin embargo, se ha descubierto que TARC (quimiocina regulada y activada del timo) producida a partir de células mononucleares de la sangre periférica humana (en adelante denominadas "PBMC") y de las células del timo (*J. Biol. Chem.*, 271, 21514 (1996)) se une específicamente a CCR4 (*J. Biol. Chem.*, 272, 15036 (1997)). Se ha publicado también que la MDC (quimiocina derivada de macrófagos) aislada del macrófagos (*J. Exp. Med.*, 185,1595 (1997)) conocida también como STCP-1 (proteína 1 quimiotáctica de linfocitos T estimulados) (*J. Biol. Chem.*, 272, 25229 (1997)), se une a CCR4 más fuertemente que TARC (*J. Biol. Chem.*, 273, 1764 (1998)).

25 Se ha demostrado que CCR4 se expresa en linfocitos CD4+ Th que producen citocina y/o quimiocina (*J. Biol. Chem.*, 272, 15036 (1997)), y se ha publicado que CCR4 se expresa selectivamente en linfocitos Th2 entre los linfocitos CD4+ Th (*J. Exp. Med.*, 187,129 (1998), *J. Immunol.*, 161, 5111 (1998)). Además, las células CCR4+ se han descubierto en linfocitos T efectoras/de memoria (CD4+/CD45RO+), y cuando se estimulaban las células CCR4+, se producían IL-4 e IL-5 pero no se producía IFN- γ (*Int. Immunol.*, 11, 81 (1999)). Además, se ha publicado que las células CCR4+ pertenecen a un CLA (antígeno asociado al linfocito cutáneo)-positivo y el grupo negativo para integrina $\alpha 4\beta 8$ entre los linfocitos T de memoria, y CCR4 se expresa en los linfocitos T de memoria, no relacionados con la inmunidad del intestino sino con la inmunidad general de la piel y similares (*Nature* 400, 776 (1999)). Estos resultados sugieren sólidamente que cuando se provoca inflamación, los linfocitos T de memoria se activan para expresar CCR4 y migran a la zona inflamatoria por MDC y TARC de los ligandos de CCR4, y aceleran la activación de otras células inflamatorias.

35 Se ha descubierto recientemente que CCR4 se expresa también en las células destructoras naturales (*Journal of Immunology*, 164, 4048-4054 (2000), *Blood*, 97, 367-375, (2001)) y en las plaquetas (*Thrombosis Research*, 101, 279-289 (2001), *Blood*, 96, 4046-4054, (2000), *Blood*, 97, 937-945, (2001)) en seres humanos.

Es conocido que un antagonista de TARC o de MDC como ligando de CCR4, es decir un antagonista de CCR4, inhibe la acumulación de plaquetas (documento WO 99/15666). Es conocido que dicho agente que modula la función de CCR4 también afecta a las funciones plaquetarias.

40 La expresión de CCR4 se encuentra en las plaquetas. Por ejemplo, Adrian *et al.* (*Blood*, 97, 937-945, (2001)) y Abi-Younes *et al.* (*Thrombosis Research*, 101, 279-289 (2001), documento WO 00/42074 y documento WO 00/41724) han detectado la expresión de CCR4 en las plaquetas humanas utilizando anticuerpos anti-CCR4. No se ha conocido hasta la fecha un anticuerpo que presente reactividad con CCR4 pero no pueda unirse a las plaquetas humanas.

45 Además, es conocido que cuando se produce un autoanticuerpo capaz de unirse a las plaquetas, se provoca trombopenia autoinmunitaria (*Blood*, 70, 428-431 (1987), *Transfusion Science*, 19, 245-251, (1988)). Los agentes que influyen en la trombocitopenia y en las funciones plaquetarias no son generalmente deseables como medicamentos porque con frecuencia producen efectos secundarios graves, tales como hemorragias y formación de trombos. Particularmente, dado que los anticuerpos tienen una vida media prolongada en la sangre, un anticuerpo que afecta a las funciones plaquetarias es difícil de desarrollar como medicamento. Por ejemplo, el desarrollo de anticuerpos anti-CD40 del ligando que habían sido desarrollados como agentes para el tratamiento de enfermedades inmunitarias ha sido suspendido debido a la generación de efectos secundarios que se considera que se deben al reconocimiento del antígeno expresado en las plaquetas activadas (*Nature Medicine*, 6, 114 (2000), *BioCentury*, A8 de 18 (2002.06.20)).

55 Es conocido que las proteínas se someten a varias reacciones de modificación tras la traducción. Una de las reacciones de modificación conocidas es una reacción de sulfatación de restos de tirosina. Se ha publicado que muchas proteínas se sulfatan en restos de tirosina (*Chemistry and Biology*, 7, R57-R61 (2000)). El resto de tirosina que está sulfatado tiene de característico que muchos restos de aminoácidos están presentes en su proximidad, y se ha sugerido una proteína que tiene posibilidad de ser sulfatada y su región (*Cell*, 96, 667-676 (1999)). En cuanto a CCR4, 4 restos de tirosina están presentes próximos al terminal N, pero no existen publicaciones que muestren que los restos de tirosina están sulfatados.

60 En cuanto al procedimiento actual para tratar enfermedades inmunitarias mediadas por Th2, se han

desarrollado los siguientes: (1) antagonistas para citocinas y quimiocinas tales como el anticuerpo humanizado anti-IL-5 (SB-240563: Smith Kline Beecham, Sch-55700 (CDP-835): Shehling Plough/Celltech), un anticuerpo IL-4 humanizado (patente US nº 5.914.110), un receptor de quimiocina soluble (*J. Immunol.*, 160, 624, (1998)), etc.; (2) inhibidores de la producción de citocina/quimiocina tales como un inhibidor de la producción de IL-5 (solicitud de patente japonesa no examinada y publicada nº 53355/96), un antagonista retinoide (WO 99/24024), tosilato de splatast (IPD-1151T, preparado por Taiho Pharmaceutical), etc.; (3) agentes que actúan sobre eosinófilos, mastocitos y similares como células inflamatorias finales, tales como el anticuerpo humanizado receptor de IL-5 (WO 97/10354), un antagonista del receptor 3 de quimiocina CC (CCR3) (solicitud de patente japonesa sin examinar publicada nº 147872/99), etc.; (4) inhibidores moleculares inflamatorios tales como un anticuerpo anti-IgE humanizado (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, 1429 (1998)), etc.; y similares. Pero inhiben solamente una parte de la red elaborada entre citocinas, quimiocinas y células inflamatorias. Las enfermedades inmunitarias mediadas por Th2, no serían ser curadas por estos agentes. Los anticuerpos anti-CD4 tienen actividad para controlar los linfocitos T, y tienen efectos sobre el asma grave dependiente de esteroides. Sin embargo, ya que la molécula CD4 está ampliamente expresada en varios inmunocitos, carecen de especificidad y adolecen del inconveniente de acompañar el efecto inmunosupresor acusado (*Int. Arch. Aller. Immunol.*, 118, 133 (1999)).

Por tanto, para inhibir todos ellos, se necesita controlar específicamente corriente arriba de la reacción alérgica problemática, es decir los linfocitos Th2.

El procedimiento normal utilizado actualmente para tratar pacientes de enfermedades inmunitarias graves mediadas por Th2, es la administración de esteroides, pero los efectos secundarios por los esteroides no pueden evitarse. Además, se encuentran los inconvenientes de que las condiciones de cada paciente vuelven al estado anterior cuando se suspende la administración de esteroides, y esta resistencia a los fármacos se adquiere cuando se administra esteroides durante un período prolongado.

Hasta la fecha, se ha demostrado que ningún anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo que puede detectar células que expresan CCR4 y también tiene citotoxicidad contra las células que expresan CCR4. Además, hasta ahora no se ha conocido ningún agente terapéutico que puede inhibir la producción de citocina Th2.

Aunque se ha publicado que CCR4 se expresa también en las células cancerosas de pacientes con leucemia (*Blood*, 96, 685, (2000)), no se ha conocido ningún agente terapéutico que elimine las células de leucemia.

Es sabido en general que cuando un anticuerpo procedente de un animal no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se administra a un ser humano, es reconocido como una sustancia extraña y produce un anticuerpo humano contra el anticuerpo de ratón (anticuerpo humano antirratón: denominado en adelante "HAMA") en el cuerpo humano. Es conocido que el HAMA reacciona con el anticuerpo de ratón suministrado para producir efectos secundarios (*J. Clin. Oncol.*, 2, 881, (1984), *Blood*, 65, 1349, (1985), *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 932, (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1242 (1985)), para acelerar la desaparición del anticuerpo de ratón administrado en el cuerpo (*J. Nucl. Med.*, 26, 1011, (1985), *Blood*, 65, 1349, (1985), *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 937, (1988)), y para reducir los efectos terapéuticos del anticuerpo de ratón (*J. Immunol.*, 135, 1530, (1985), *Cancer Res.*, 46, 6489, (1986)).

Para resolver estos problemas, se ha intentado convertir un anticuerpo procedente de un animal no humano en un anticuerpo humano injertado con CDR utilizando técnicas de ingeniería genética.

El anticuerpo humano injertado con CDR es un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de CDR en la región variable (denominada en adelante "región V") procedente de un anticuerpo de animal no humano se injerta en una posición apropiada de un anticuerpo humano (*Nature*, 321, 522 (1986)). En comparación con los anticuerpos procedentes de animales no humanos tales como los anticuerpos de ratón y similares, estos anticuerpos injertados con CDR adolecen de varios inconvenientes para aplicaciones clínicas a seres humanos. Por ejemplo, se ha publicado que se redujo su inmunogenicidad y su vida media en la sangre llegó a ser prolongada en comparación con un anticuerpo de ratón utilizando un mono (*Cancer Res.*, 56, 1118, (1996), *Immunol.*, 85, 668, (1995)). Por tanto, es de esperar que los anticuerpos humanos injertados con CDR adolezcan de menos efectos secundarios en los seres humanos y sus efectos terapéuticos continúen durante un periodo más largo que los anticuerpos procedentes de animales no humanos.

Además, como el anticuerpo humano injertado con CDR se prepara utilizando la técnica de ingeniería genética, pueden prepararse moléculas de varias formas. Por ejemplo, cuando se utiliza la subclase $\gamma 1$ como cadena pesada (denominada en adelante "cadena H") la región constante (denominada en adelante "región C") (la región C de la cadena H se denomina "CH") de un anticuerpo humano, puede prepararse un anticuerpo humanizado que tiene una función efectora elevada tal como una actividad citotóxica mediada por células dependientes de anticuerpos (denominada en adelante "ADCC") (*Cancer Res.*, 56, 1118, (1996)), y cabe esperar una vida media prolongada en la sangre en comparación con un anticuerpo de ratón (*Immunol.*, 85, 668, (1995)). Además, en el tratamiento particularmente para reducir el número de células que expresan CCR4, actividades citotóxicas mayores tales como la actividad citotóxica dependiente del complemento (denominada en adelante "actividad CDC") y actividad ADCC a través de la región Fc (la región en y después de la región bisagra de una

cadena pesada de anticuerpo) de un anticuerpo son importantes por los efectos terapéuticos. Por consiguiente, estos resultados demuestran claramente que los anticuerpos humanos injertados con CDR son preferidos a los anticuerpos procedentes de animales no humanos tales como los anticuerpos de ratón.

Además, según los recientes avances en ingeniería de proteínas y en ingeniería genética, los fragmentos de anticuerpos que tienen un peso molecular más pequeño tales como Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario (denominado en adelante "scFv") (*Science*, 242, 423 (1988)), un fragmento dimerizado de la región V (denominado en adelante "Diacuerpo") (*Nature Biotechnol.*, 15, 629 (1997)), un fragmento de la región V estabilizado con disulfuro (denominado en adelante "dsFv") (*Molecular Immunol.*, 32, 249, (1995)), un péptido que contiene CDR (*J. Biol. Chem.*; 271, 2966 (1996)) y similares pueden prepararse como anticuerpos injertados con CDR. Los fragmentos de anticuerpo son excelentes en la actividad de la transición en los tejidos diana en comparación con las moléculas de anticuerpo completas (*Cancer Res.*, 52, 3402, (1992)).

Se considera que éstos fragmentos procedentes de anticuerpos humanos injertados con CDR y los fragmentos de anticuerpos de los mismos son más deseables que los procedentes de los anticuerpos procedentes de animales no humanos tales como los anticuerpos de ratón, cuando se utilizan en aplicaciones clínicas a seres humanos.

Tal como se describió anteriormente, cabe esperar efectos de diagnóstico y terapéuticos de los anticuerpos humanos injertados con CDR y de los fragmentos de anticuerpos de los mismos cuando se utilizan solos, pero se ha intentado mejorar más los efectos utilizando otras moléculas en combinación. Por ejemplo, puede utilizarse citocina como una de dichas moléculas. La citocina es un término general para varios factores solubles que controlan funciones intercelulares mutuas en reacciones inmunitarias. La actividad CDC y la actividad ADCC, por ejemplo, se conocen como actividades citotóxicas de los anticuerpos, y la actividad ADCC es controlada por células efectoras que tienen receptores de Fc en la superficie celular tales como monocitos, macrófagos, células NK y similares (*J. Immunol.*, 138, 1992, (1987)). Dado que varias citocinas activan estas células efectoras, pueden administrarse en combinación con un anticuerpo con objeto de mejorar la actividad ADCC del anticuerpo.

EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

La presente invención comprende las formas de realización siguientes.

- (1) Un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con una región extracelular del receptor 4 humano de la quimiocina CC (CCR4) pero no reacciona con una plaqueta humana, que comprende
 - (a) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 4 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 8;
 - (b) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 4 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 12;
 - (c) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 4 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 14;
 - (d) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 9 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 12;
 - (e) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 9 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 14;
 - (f) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 10 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 12;
 - (g) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 10 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada

por la SEC. ID. nº 14;

- 5 (h) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 11 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 12; o
- (i) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 11 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 14;
- 10 o el fragmento de anticuerpo de la misma seleccionado de entre el grupo constituido por Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario (scFv), un fragmento (Diacuerpo) de la región variable (región V) dimerizado y un fragmento de la región V estabilizado con disulfuro (dsFv).
- (2) Un anticuerpo humano injertado con CDR que tiene actividad citotóxica contra una célula que expresa a CCR4, o el fragmento de anticuerpo del mismo.
- 15 (3) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, en el que la región extracelular es una región extracelular de las posiciones 1 a 39 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.
- (4) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, en el que la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 2 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.
- 20 (5) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, en el que la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 13 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.
- (6) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, en el que la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 13 a 25 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.
- 25 (7) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, que tiene mayor actividad citotóxica contra una célula que expresa a CCR4 que un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma de animal no humano.
- (8) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, en el que la actividad citotóxica es una actividad citotóxica mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC).
- 30 (9) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según el apartado (8), en el que la actividad ADCC es una actividad de inducción de apoptosis de una célula que expresa CCR4.
- (10) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, que tiene una actividad de eliminación de una célula que expresa a CCR4.
- 35 (11) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, en el que la célula que expresa CCR4 es un linfocito Th2.
- (12) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, que tiene actividad de inhibición de la producción de citocinas de un linfocito Th2.
- 40 (13) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según el apartado (12), en el que la citocina es IL-4, IL-5 o IL.13.
- (14) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, que pertenece a un anticuerpo IgG humano.
- 45 (15) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, que comprende la región determinante de complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID. nº 1, nº 2 y nº 3, respectivamente.
- 50 (16) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, que comprende la región determinante de complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID. nº 5, nº 6 y nº 7, respectivamente.

- 5 (17) El anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, que comprende la región determinante de complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID. nº 1, nº 2 y nº 3, respectivamente, y las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que tiene las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID. nº 5, nº 6 y nº 7, respectivamente.
- 10 (18) Un anticuerpo humano injertado con CDR, que es producido por un transformante KM8759 (FERM BP-8129) o KM8760 (FERM BP-8130) o el fragmento de anticuerpo del mismo.
- (19) Un transformante que produce el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores.
- (20) El transformante según el apartado (19), en el que el transformante es KM8759 (FERM BP-8129) o KM8760 (FERM BP-8130).
- 15 (21) Un procedimiento para producir un anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores, que comprende cultivar el transformante según los apartados (19) o (20) en un medio para formar y acumular el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo en el cultivo; y recuperar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del cultivo.
- 20 (22) Un anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo en el que el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados anteriores está conjugado química o genéticamente con un radioisótopo, una proteína o un agente.
- (23) Un ADN que codifica el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- (24) Un vector recombinante que comprende el ADN según el apartado (23).
- 25 (25) Un transformante que puede obtenerse introduciendo el vector recombinante según el apartado (24) en una célula hospedadora.
- (26) Un medicamento que comprende por lo menos el seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados (1) a (18) y (22) como principio activo.
- 30 (27) Un agente terapéutico para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con CCR4, que comprende por lo menos el seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados (1) a (18) y (22) como principio activo.
- (28) El agente terapéutico según el apartado (27), en el que la enfermedad relacionada con CCR4 es un cáncer o enfermedades inflamatorias.
- 35 (29) El agente terapéutico según el apartado (28), en el que el cáncer es un cáncer sanguíneo.
- (30) El agente terapéutico según el apartado (29), en el que el cáncer sanguíneo es la leucemia o la linfomatosis.
- (31) El agente terapéutico según el apartado (28), en el que la enfermedad inflamatoria es la hipersensibilidad crónica de las vías respiratorias o el asma bronquial, la atopía cutánea, la rinitis alérgica o la polenosis.
- 40 (32) Un agente de diagnóstico para la enfermedad relacionada con CCR4, que comprende por lo menos el seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados (1) a (18) y (22) como principio activo.
- (33) El agente de diagnóstico según el apartado (32), en el que la enfermedad relacionada con CCR4 es un cáncer o una enfermedad inflamatoria.
- 45 (34) El agente de diagnóstico según el apartado (33), en el que el cáncer es un cáncer sanguíneo.
- (35) El agente de diagnóstico según el apartado (33), en el que el cáncer sanguíneo es la leucemia o la linfomatosis.
- 50 (36) El agente de diagnóstico según el apartado (33), en el que la enfermedad inflamatoria es el asma con hipersensibilidad crónica de las vías respiratorias, el asma bronquial, la atopía cutánea, la rinitis alérgica o la polenosis.

(37) Un agente de diagnóstico para las enfermedades inmunitarias mediadas por Th2, que comprende por lo menos el seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de los apartados (1) a (18) y (22) como principio activo.

5 (38) El agente de diagnóstico según el apartado (37), en el que la enfermedad inmunitaria mediada por Th2 es el asma con hipersensibilidad crónica de las vías respiratorias, el asma bronquial, la atopia cutánea, la rinitis alérgica o la polenosis.

En la presente invención, las enfermedades relacionadas con CCR4 incluyen cánceres, enfermedades inflamatorias y similares.

10 En la presente invención los cánceres incluyen, cánceres sanguíneos, particularmente leucemia, linfomatosis y similares.

En la presente invención, las enfermedades inflamatorias incluyen la hipersensibilidad aguda o crónica de las vías respiratorias o el asma bronquial; las atopias cutáneas tales como la dermatitis atópica; la rinitis alérgica; la polenosis; y similares.

15 En la presente invención, las enfermedades inmunitarias mediadas por Th2 pueden ser alguna de las enfermedades inmunitarias con las que los linfocitos Th2 están relacionados, e incluyen la hipersensibilidad crónica de las vías respiratorias o el asma bronquial; las atopias cutáneas tales como la dermatitis atópica; rinitis alérgica; polenosis; neumonía intersticial; fibrosis pulmonar; enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus eritematoso diseminado; y similares.

20 El anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con CCR4 (anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR) y un fragmento de anticuerpo del mismo de la presente invención (en adelante, ambos se denominan generalmente el anticuerpo de la presente invención en algunos casos) no están limitados, con tal que sea un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con la región extracelular del CCR4 humano pero no reacciona con una plaqueta humana o un fragmento de anticuerpo de la misma. La expresión "no reacciona con una plaqueta humana" significa que el anticuerpo no presenta sustancialmente ninguna actividad de unión a una plaqueta humana. Específicamente, significa que la actividad de unión no se presenta cuando se mide con un citómetro de flujo.

25 Además, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que reacciona específicamente con la región extracelular del CCR4 humano y tiene una actividad citotóxica para las células que expresan a CCR4.

La actividad citotóxica incluye la actividad CDC y la actividad ADCC.

30 Además, el anticuerpo de la presente invención incluye los anticuerpos que reaccionan específicamente preferentemente con una región que comprende las posiciones 1 a 39, 98 a 112, 176 a 206 ó 271 a 284 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 48, más preferentemente una región que comprende las posiciones 2 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 48, (SEC. ID. nº 36), aún más preferentemente una región que comprende las posiciones 12 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48 (SEC. ID. nº 37), y aún más preferentemente una región que comprende las posiciones 12 a 25 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.

35 El anticuerpo humano injertado con CDR representa un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la CDR de VH y de VL en un anticuerpo procedente de un animal no humano está injertada en las posiciones apropiadas de VH y de VL de un anticuerpo humano.

40 El anticuerpo humano injertado con CDR de la presente invención puede producirse construyendo los ADNc que codifican las regiones V en los que las secuencias de aminoácidos de la CDR de la VH y VL en un anticuerpo precedente de una animal no humano, que reacciona específicamente con CCR4, se injertan a FR de VH y de VL en un anticuerpo humano, insertándolas respectivamente en un vector de expresión para la célula del animal que tiene ADN que codifica CH y la región C de la cadena H (denominada en adelante "CL") de un anticuerpo humano para construir un vector de expresión del anticuerpo humano injertado con CDR, y a continuación introducirlo en una célula animal para expresar el anticuerpo humano injertado con CDR.

45 Como procedimiento para seleccionar las secuencias de aminoácidos FR de VH y VL de un anticuerpo humano, puede utilizarse cualquier procedimiento, con tal que procedan de anticuerpos humanos. Los ejemplos incluyen las secuencias de aminoácidos de FR de VH y de VL en los anticuerpos humanos registrados en las bases de datos tal como el Protein Data Bank y similares, por las secuencias de aminoácidos comunes en cada subgrupo de FR de VH y VL en anticuerpos humanos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991).

50 Puede utilizarse cualquier CH en el anticuerpo de la presente invención, con tal que pertenezca a la inmunoglobulina humana (denominada en adelante "hlg"). Preferentemente puede utilizarse una clase de hlgG, y cualquiera de las subclases $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$ que pertenecen a la clase hlgG. Además, puede utilizarse cualquier CL en el anticuerpo injertado CDR, con tal que pertenezca a la hlg, y pueden utilizarse las de clase κ o de clase λ .

55

El anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos humanos injertados con CDR o los fragmentos anticuerpo de los mismos que comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de la HV del anticuerpo que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 1, nº 2 y nº 3, respectivamente, y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID. nº 5, nº 6 y nº 7, respectivamente.

Los ejemplos preferidos incluyen los anticuerpos humanos injertados con CDR en los que la VH en el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 4 o nº 38, y/o la VL comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 8.

Los ejemplos más preferidos incluyen:

un anticuerpo humano injertado con CDR que comprende VH del anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un resto de aminoácido seleccionado de entre Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44, Lys en la posición 76 y Ala en posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 4 se sustituye con otro resto de aminoácido,

un anticuerpo humano injertado con CDR que comprende VH en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un resto de aminoácido seleccionado de entre Thr en la posición 28 y Ala en posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 38 se sustituye con otro resto de aminoácido,

un anticuerpo humano injertado con CDR que comprende VL en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un resto de aminoácido seleccionado de entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 8 se sustituye con otro resto de aminoácido,

un anticuerpo humano injertado con CDR que comprende VH en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un resto de aminoácido seleccionado de entre Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44, Lys en la posición 76 y Ala en posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 4 se sustituye con otro resto de aminoácido; y VL en el anticuerpo VL que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un resto de aminoácido seleccionado de entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 8 se sustituye con otro resto de aminoácido,

un anticuerpo humano injertado con CDR que comprende VH en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un resto de aminoácido seleccionado de entre Thr en la posición 28 y Ala en posición 97 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 38 se sustituye con otro resto de aminoácido; y VL en el anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que por lo menos un resto de aminoácido seleccionado de entre Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en posición 88 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 8 se sustituye con otro resto de aminoácido,

y similares.

La presente invención incluye anticuerpos que comprenden la secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos se elimina, sustituye, inserta o añade y reaccionan específicamente con CCR4 tal como se describió anteriormente, y los fragmentos de anticuerpo de los mismos.

En la presente invención, una o más eliminaciones, sustituciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos significa que uno o más aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden a una o varias posiciones en la secuencia de aminoácidos. La eliminación, sustitución, inserción y/o adición, puede ser producida en la misma secuencia de aminoácidos simultáneamente. Además, el resto de aminoácido sustituido, insertado o añadido puede ser natural o artificial. El resto de aminoácido natural incluye L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, L-cisteína y similares.

A continuación, se muestran los ejemplos preferidos de restos de aminoácidos que se sustituyen entre sí. Los restos de aminoácidos en el mismo grupo pueden sustituirse entre sí.

Grupo A:

leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, O-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina, ciclohexilalanina;

Grupo B:

ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido 2-aminosubérico;

Grupo C:

asparagina, glutamina;

5

Grupo D:

lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico;

Grupo E:

prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina;

Grupo F:

10

serina, treonina, homoserina;

Grupo G:

fenilalanina, tirosina.

El fragmento de anticuerpo de la presente invención incluye Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Diacuerpo, dsFv, un péptido que comprende CDR y similares.

15

Un Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, en el que aproximadamente la mitad del lado del terminal N de la cadena H y toda la cadena L entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína (cortan un resto de aminoácido en la posición 224 de la cadena H), están unidos mediante un enlace disulfuro.

20

El Fab de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo humano injertado con CDR de la presente invención que reacciona específicamente con CCR4, con una proteasa, papaína. Además, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab del anticuerpo en un vector de expresión para procariontas o en un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procarionta o eucariota para expresar el Fab.

25

Un F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión al antígeno, que es ligeramente más largo que el enlace de Fab mediante un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, pepsina.

El F(ab')₂ de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con CCR4, con una proteasa, pepsina, además, el F(ab')₂ puede producirse uniendo el Fab' descrito a continuación mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

30

Un Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro en la región bisagra del F(ab')₂.

El Fab' de la presente invención puede obtenerse tratando el F(ab')₂ que reacciona específicamente con CCR4 con un agente reductor, ditiotreitól. Además, el Fab' de la presente invención puede producirse insertando el ADN que codifica un Fab' del anticuerpo humano injertado con CDR de la presente invención que reacciona específicamente con CCR4 en un vector de expresión para procariontas o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procarionta o eucariota para expresar el Fab'.

35

Un scFv es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH en el que una cadena VH y una cadena VL se unen utilizando un enlazador peptídico (P) apropiado de 12 o más restos y que tiene una actividad de unión al antígeno.

40

El scFv de la presente invención puede producirse obteniendo los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con CCR4 de la presente invención, construyendo el ADN que codifica el scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariontas o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo a continuación el vector de expresión en un procarionta o eucariota para expresar el scFv.

45

Un diacuerpo es un fragmento de anticuerpo en el que los scFv que tienen la misma o diferente especificidad de unión al antígeno forman un dímero, y tiene una actividad de unión al antígeno divalente al mismo antígeno o actividad de unión al antígeno específico para antígenos diferentes.

El diacuerpo de la presente invención, por ejemplo, un diacuerpo divalente que reacciona específicamente con CCR4, puede producirse obteniendo los ADNc que codifican a VH y VL del anticuerpo que reacciona específicamente con CCR4, construyendo el ADN que codifica el scFv que tiene un enlazador polipeptídico de 3 a

10 restos, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas y a continuación introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el anticuerpo.

5 Un dsFv se obtiene uniendo los polipéptidos en los que un resto de aminoácido de cada uno de VH y VL se sustituye con un resto de cisteína mediante un enlace disulfuro entre los restos de cisteína. El resto de aminoácido que se sustituye con un resto de cisteína puede seleccionarse basándose en una estimación de la estructura tridimensional del anticuerpo según el procedimiento presentado por Reiter *et al.*, (*Protein Engineering*, 7, 697, (1994)).

10 El dsFv de la presente invención puede producirse obteniendo los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con CCR4 de la presente invención, construyendo el ADN que codifica el dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, y a continuación introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el dsFv.

15 Un péptido que comprende la CDR se constituye incluyendo por lo menos una región de las CDR de la cadena H y de la cadena L. Varias CDR pueden unirse directamente o mediante un enlazador peptídico apropiado.

20 El péptido que comprende la CDR de la presente invención puede producirse obteniendo el ADNc que codifica VH y VL de un anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con CCR4, construyendo el ADN que codifica la CDR, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo a continuación el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el péptido. Además, el péptido que comprende la CDR puede producirse también por un procedimiento de síntesis química tal como un procedimiento de Fmoc (procedimiento de fluorenilmetoxicarbonilo), un procedimiento de tBoc (procedimiento de t-butiloxicarbonilo), o similares.

25 El anticuerpo de la presente invención incluye derivados de anticuerpos en los que un radioisótopo, una proteína, un agente o similares está conjugado química o genéticamente al anticuerpo de la presente invención.

30 Los derivados del anticuerpo de la presente invención pueden producirse conjugando químicamente un radioisótopo, una proteína o un agente con el lado del terminal N o el lado del terminal C de una cadena H o de una cadena L de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo que reacciona específicamente con CCR4, con un grupo sustituyente apropiado o la cadena lateral del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo o con una cadena de azúcar en el anticuerpo o en el fragmento de anticuerpo (*Antibody Engineering Handbook*, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan, (1994)).

35 Además, puede ser producido genéticamente uniendo un ADN que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención que reacciona específicamente con CCR4 a otro ADN que codifica una proteína que debe unirse, insertando el ADN en el vector de expresión e introduciendo el vector de expresión en una célula hospedadora.

40 El radioisótopo incluye ^{131}I , ^{125}I y similares, y puede conjugarse con el anticuerpo, por ejemplo, por un procedimiento de cloramina T.

45 El agente preferentemente es un compuesto de bajo peso molecular. Los ejemplos incluyen agentes anticancerosos tales como los agentes alquilantes (por ejemplo, mostaza de nitrógeno, ciclofosfamida), antagonistas metabólicos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, metotrexato), antibióticos (por ejemplo, daunomicina, bleomicina, mitomicina C, daunorrubicina, doxorubicina), alcaloides vegetales (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina), fármacos hormonales (por ejemplo, tamoxifeno, dexametasona) y similares (*Clinical Oncology*, editado por Japanese Society of Clinical Oncology, publicado por Cancer and Chemotherapy (1996)); agentes anti-inflamatorios tales como los agentes esteroides (por ejemplo, hidrocortisona, prednisona), fármacos no esteroideos (por ejemplo, aspirina, indometacina), inmunomoduladores (por ejemplo, auriotiomalato, penicilamina), agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclofosfamida, azatioprina) y agentes antihistamínicos (por ejemplo, maleato de clorfeniramina, clemastina) (*Inflammation and Antiinflammatory Therapy*, Ishiyaku Shuppan (1982)) y similares. El procedimiento para conjugar la daunomicina con un antibiótico incluye un procedimiento en el que la daunomicina y un grupo amino de un anticuerpo se conjugan mediante glutaraldehído, un procedimiento en el que un grupo amino de la daunomicina y un grupo carboxilo de un anticuerpo se conjugan mediante una carbodiimida soluble en agua y similares.

50 La proteína es preferentemente citocina que activa inmunocitos.

55 Los ejemplos incluyen la interleucina 2 humana (denominada en adelante "hIL-2") el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (denominado en adelante "hGM-CSF"), el factor estimulante de colonias de macrófagos humano (denominado en adelante "hM-CSF"), la interleucina 12 humana (denominada en adelante "hIL-12") y similares. Además, con el fin de inhibir células cancerosas directamente, puede utilizarse una toxina tal como ricino, la toxina de la difteria y similares. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo de fusión con una proteína uniendo un ADNc que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con otro ADNc que codifica la proteína, construyendo el ADN que codifica el anticuerpo de fusión, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, y a continuación introduciendo en un procariota o

eucariota para expresar el anticuerpo de fusión.

Los procedimientos para producir el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo que reaccionan específicamente con CCR4, los procedimientos para evaluar la actividad del mismo y los métodos para utilizarlos se explican a continuación.

5 1. Preparación de anticuerpo humano injertado con CDR

(1) Construcción del vector de expresión de anticuerpo humanizado

Un vector de expresión de anticuerpo humanizado es un vector de expresión para células animales en las que se han insertado los genes que codifican la CH y la CL de un anticuerpo humano, y se construye clonando cada CH y CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para células animales.

10 La región C de un anticuerpo humano puede ser la CH y la CL de cualquier anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen la CH de subclase γ y la CL de clase κ de un anticuerpo humano, y similares. También, puede utilizarse ADNc. Como vector de expresión para células animales, puede utilizarse cualquier vector de expresión, con tal que pueda insertarse y expresarse una región C de un anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen pAGE107 (15 *Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), pAGE103 (*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)), pHSG274 (*Gene*, 27, 223 (1984)), pKCR (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 1527 (1981)), pSGI β d2-4 (*Cytotechnology*, 4, 173 (1990)), pSEIUK1Sed1-3 (*Cytotechnology*, 13, 79 (1993)) y similares. Un activador y potenciador utilizado para un vector de expresión para células animales incluye un activador y potenciador precoz SV40 (*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)), un activador y potenciador del virus LTR de la leucemia de ratón de Moloney (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 960, (1987)), un activador de la cadena H de inmunoglobulina (*Cell*, 41, 479 (1985)) y potenciador (*Cell*, 33, 717 (1983)) y similares.

20 El vector de expresión del anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que existe un gen que codifica una cadena H de anticuerpo y un gen que codifica una cadena L de anticuerpo en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). En cuanto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, es preferible la facilidad de introducción en las células animales, y el equilibrio entre las cantidades de expresión del anticuerpo H y las cadenas L en las células animales, un vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem (*J. Immunol. Methods.*, 167, 271 (1994)). El tipo tándem del vector de expresión del anticuerpo humanizado incluye pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 (25 *HYBRIDOMA*, 17, 559 (1998)) y similares.

30 El vector de expresión del anticuerpo humanizado construido puede utilizarse para la expresión de un anticuerpo humano injertado con CDR en células animales.

(2) Construcción del ADNc que codifica la región V del anticuerpo humano injertado con CDR

35 Los ADNc que codifican la VH y la VL de un anticuerpo humano injertado con CDR pueden obtenerse de la manera siguiente. En primer lugar, se seleccionan las secuencias de aminoácidos de las FR en VH y VL de un anticuerpo humano al que las secuencias de aminoácidos de las CDR en VH y VL de un anticuerpo procedente de un anticuerpo de animal no humano están injertadas. Pueden utilizarse algunas secuencias de aminoácidos de las FR en VH y VL de un anticuerpo humano, con tal que procedan de un ser humano. Los ejemplos incluyen secuencias de aminoácidos de las FR en VH y VL de anticuerpos humanos registradas en la base de datos tal como el Protein Data Bank (Banco de datos de proteínas) y similares, y las secuencias de aminoácidos comunes a los subgrupos de las FR en VH y VL de anticuerpos humanos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)) y similares. Para producir un anticuerpo humano injertado con CDR con potente actividad, se seleccionan preferentemente las secuencias de aminoácidos que tienen gran homología (por 40 lo menos 60% o más) con la secuencia de aminoácidos de las FR en VH y VL de un anticuerpo diana de un animal no humano.

45 A continuación, las secuencias de aminoácidos de las CDR en VH y VL del anticuerpo procedente de un animal no humano se injertan a las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las FR en VH y VL de un anticuerpo humano para diseñar secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo humano injertado con CDR. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN considerando la frecuencia de utilización del codón encontrada en las secuencias nucleotídicas de los genes de anticuerpos (*Sequence of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)), y se diseñan las secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo humano injertado con CDR. Se sintetizan varios ADN sintéticos que tienen una longitud de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos, y se lleva a cabo la PCR utilizándolas. En este caso, es preferible en cada VH y VL que se diseñen 4 ó 6 ADN sintéticos a la vista de la eficacia de la reacción de PCR y de las longitudes de los ADN que pueden sintetizarse. Además, pueden clonarse fácilmente en el vector de expresión de anticuerpo humanizado construido en el apartado 1 (1) 50 introduciendo la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada para el extremo 5' de los ADN sintéticos presentes en ambos extremos. Después de la PCR, se clona un producto ampliado en un plásmido tal como Bluescript SK(-) (preparado por Stratagene) o similar, y se determinan las secuencias nucleotídicas para obtener un plásmido que tiene secuencias de ADN que codifican VH y VL de un anticuerpo humano diseñado 55

inertado con CDR.

(3) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo humano inertado con CDR.

Es conocido que cuando un anticuerpo humano inertado con CDR, es producido simplemente inertando sólo las CDR en VH y VL de un anticuerpo procedente de un animal no humano en las FR en VH y VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión al antígeno es menor que la de un anticuerpo original procedente de un animal no humano (*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)). Como razón, se considera que varios restos de aminoácidos en no solamente las CDR sino también en las FR directa o indirectamente se relacionan con la actividad de unión al antígeno en VH y VL del anticuerpo original procedente de un animal no humano, y que se cambian a diferentes restos de aminoácidos de diferentes FR en VH y VL de un anticuerpo humano. Para resolver el problema, en los anticuerpos humanos inertados con CDR, entre las secuencias de aminoácidos de las FR en VH y VL de un anticuerpo humano, un resto de aminoácido que se relaciona directamente con la unión a un antígeno, o un resto de aminoácidos que se relaciona indirectamente con la unión a un antígeno interactuando con un resto de aminoácido en la CDR o manteniendo la estructura tridimensional de un anticuerpo se identifica y modifica a un resto de aminoácido que se encuentra en el anticuerpo animal no humano original para aumentar de este modo la actividad de unión al antígeno que ha disminuido (*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)). En la producción de un anticuerpo humano inertado con CDR, lo más importante es cómo identificar de manera eficaz los restos de aminoácidos relacionados con la actividad de unión al antígeno en FR, de modo que la estructura tridimensional de un anticuerpo se construye y analiza por cristalografía de rayos X (*J. Mol. Biol.*, 112, 535 (1977)), modelado informático (*Protein Engineering*, 7, 1501 (1994)) o similares. Aunque la información de la estructura tridimensional de los anticuerpos ha sido útil en la producción de un anticuerpo humano inertado con CDR, no se ha creado todavía ningún procedimiento para producir un anticuerpo humano inertado con CDR que puede aplicarse a algunos anticuerpos. Por consiguiente, varios intentos deben ser actualmente necesarios, por ejemplo, se producen varios anticuerpos modificados de cada anticuerpo y se examina la relación entre cada uno de los anticuerpos modificados y su actividad de unión al anticuerpo.

La modificación de la secuencia de aminoácidos seleccionada de las FR en VH y VL de un anticuerpo humano puede realizarse utilizando varios ADN sintéticos para la modificación según la PCR. Con respecto al producto ampliado obtenido por la PCR, la secuencia nucleotídica se determina según el procedimiento descrito en el apartado 1(2) de modo que se confirma si la modificación objetivo se ha llevado a cabo.

(4) Construcción del vector de expresión del anticuerpo humano inertado con CDR.

Un vector de expresión del anticuerpo humano inertado con CDR puede construirse clonando los ADNc que codifican VH y VL del anticuerpo humano inertado con CDR construido en los apartados 1(2) y 1(3) corriente arriba de los genes que codifican VH y VL del anticuerpo humano en el vector de expresión del anticuerpo humanizado como se describe en el apartado 1(1). Por ejemplo, cuando las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción apropiadas se introducen en el terminal 5' de los ADN sintéticos colocados a ambos extremos entre los ADN sintéticos utilizados en la construcción de VH y VL del anticuerpo humano inertado con CDR en los apartados 1(2) y (3), puede realizarse la clonación de modo que se expresan en una forma apropiada corriente arriba de los genes que codifican CH y CD del anticuerpo humano en el vector de expresión del anticuerpo humanizado como se describe en el apartado 1(1).

(5) Expresión temporal del anticuerpo humano inertado con CDR

Para evaluar eficazmente la actividad de unión al antígeno de varios anticuerpos humanos producidos inertados con CDR, los anticuerpos humanos inertados con CDR pueden expresarse temporalmente utilizando el vector de expresión del anticuerpo humano inertado con CDR tal como se describe en el apartado 1(4) o el vector de expresión modificado del mismo. Puede utilizarse cualquier célula como célula hospedadora, con tal que la célula hospedadora pueda expresar un anticuerpo humano inertado con CDR. Generalmente, se utiliza la célula COS-7 (ATCC CRL1651) a la vista de su gran cantidad de expresión (*Methods in Nucleic. Acids Res.*, CRC Press, pág. 283 (1991)). El procedimiento para introducir el vector de expresión en la célula COS-7 incluye un procedimiento de DEAE-dextrano (*Methods in Nucleic. Acids Res.*, CRC Press, pág. 283 (1991)), un procedimiento de lipofección (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 7413 (1987)) y similares.

Tras la introducción del vector de expresión, puede determinarse la cantidad de expresión y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo humano inertado con CDR en el sobrenadante del cultivo mediante el inmunoanálisis enzimático (ELISA); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cap. 14 (1988), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1996)) y similares.

(6) Expresión estable del anticuerpo humano inertado con CDR

Un transformante que produce un anticuerpo humano inertado con CDR de manera estable puede obtenerse introduciendo en una célula hospedadora apropiada el vector de expresión del anticuerpo humano inertado con CDR descrito en el apartado 1(4).

El procedimiento para la introducción del vector de expresión en una célula hospedadora incluye la electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)) y similares.

Cualquier célula puede utilizarse como célula hospedadora en la que el vector de expresión del anticuerpo humano injertado con CDR debe ser introducido, con tal que pueda expresar un anticuerpo humano injertado con CDR. Los ejemplos incluyen las células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL 1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL 1580), células CHO en las que el gen (*dhfr*) para la dihidrofolato reductasa es detectivo (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77, 4216 (1980)), las células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (células YB2/0; ATCC CRL 1662) y similares.

Después de la introducción del vector de expresión, los transformantes que expresan un anticuerpo humano injertado con CDR de forma estable se seleccionan cultivando en un medio para cultivo de células animales que contienen como agente tal como G418 sulfato (G418; preparado por Sigma) o similar (*J. Immunol. Methods*, 167, 271, (1994)). El medio para el cultivo de células animales incluye medio PRMI1640 (preparado por Nissui Pharmaceutical), medio GIT (preparado por Nissui Pharmaceutical), medio EXCELL302 (JRH), medio IMDM (preparado por GIBCO BRL), medio hibridoma-SFM (preparado por GIBCO BRL), medios obtenidos añadiendo varios aditivos tales como FBS a estos medios, y similares. El anticuerpo humano injertado con CDR puede producirse y acumularse en un medio de cultivo cultivando los transformantes seleccionados en un medio. La cantidad de expresión y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado en el sobrenadante del cultivo puede medirse por ELISA o similar. Además, en el transformante, la expresión cantidad de anticuerpo humano injertado con CDR puede aumentarse utilizando el sistema de ampliación *dhfr* o similar (*J. Immunol. Methods*, 167, 271, (1994)).

El anticuerpo humano injertado con CDR puede purificarse en el sobrenadante del cultivo del transformante utilizando la columna Protein A (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cap. 8 (1988), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)). Pueden utilizarse cualesquiera otros procedimientos convencionales para la purificación de proteínas. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede purificarse mediante una combinación de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración y similares. El peso molecular de la cadena H o de la cadena L del anticuerpo humanizado purificado o la molécula de anticuerpo completa se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; *Nature*, 227, 680 (1970)), Inmunotransferencia Western (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cap. 12 (1988), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) y similares.

2. Preparación de un fragmento de anticuerpo

El fragmento de anticuerpo puede prepararse basándose en el anticuerpo humanizado descrito en el apartado 1 utilizando ingeniería genética o ingeniería de proteínas. El fragmento de anticuerpo incluye Fab, F(ab')₂, Fab', sdFv, diacuerpo, dsFv, un péptido que comprende la CDR y similares.

(1) Preparación de Fab

Fab puede prepararse tratando IgG con una enzima proteolítica papaína. Después del tratamiento con papaína, cuando el anticuerpo original es una subclase de IgG que tiene una actividad de unión a la proteína A, puede recuperarse Fab uniforme separándolo de las moléculas de IgG y de los fragmentos Fc haciéndolo pasar a través de una columna con proteína A (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición (1995)). Cuando el anticuerpo original es un anticuerpo de subclase IgG que no tiene actividad de unión a la proteína A, puede recuperarse el Fab por cromatografía de intercambio iónico en una fracción eluida a baja concentración salina (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición (1995)). Además, Fab puede prepararse también por técnicas de ingeniería genética utilizando *Escherichia coli*. Por ejemplo, un vector para la expresión de Fab puede prepararse clonando el ADN que codifica la región V del anticuerpo descrita en los apartados 1(2) y 1(3) en un vector para la expresión de Fab. Como vector para la expresión de Fab puede utilizarse cualquier vector, con tal que pueda insertarse y expresarse un ADN para Fab. Los ejemplos incluyen pIT106 (*Science*, 240, 1041 (1988)) y similares. Fab puede formarse y acumularse en un cuerpo de inclusión o espacio periplásmico introduciendo el vector de expresión Fab en una *Escherichia coli* apropiada. Puede obtenerse Fab activo procedente del cuerpo de inclusión por un procedimiento de replegamiento generalmente utilizado para las proteínas y para cuando se expresa en el espacio periplásmico, el Fab activo fuga en el sobrenadante del cultivo. El Fab uniforme puede purificarse después del replegamiento o del sobrenadante del cultivo utilizando una columna con anticuerpo ligado (Antibody Engineering. A Practical Guide, W. H. Freeman and Company (1992)).

(2) Preparación de F(ab')₂

Puede prepararse F(ab')₂ tratando IgG con una enzima proteolítica papaína. Después del tratamiento con papaína, puede recuperarse como F(ab')₂ uniforme por un procedimiento de purificación similar al caso de Fab (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición Academic Press (1995)). Además, puede prepararse también por el procedimiento descrito en el apartado 2(3) en el que Fab' se trata con maleimida tal como o-PDM, bismaleimida hexano o similar para formar un enlace tioéter, o un procedimiento en el que se trata con DTNB para formar un enlace S-S (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996)).

(3) Preparación de Fab'

El Fab' puede prepararse por técnicas de ingeniería genética utilizando *Escherichia coli*. Por ejemplo, un vector para la expresión de Fab' puede construirse clonando el ADN que codifica la región V del anticuerpo descrita en los apartados 1(2) y (3) en un vector para la expresión de Fab'. Como vector para la expresión de Fab' puede utilizarse cualquier vector, siempre que pueda insertarse y expresarse un ADN para Fab'. Los ejemplos incluyen pAK19 (*Bio/Technology*, 10, 163 (1992)) y similares. Fab' puede formarse y acumularse en un cuerpo de inclusión o en el espacio periplásmico introduciendo el vector para la expresión de Fab' en una *Escherichia coli* apropiada. Puede obtenerse Fab' activo del cuerpo de inclusión por un procedimiento de replegamiento utilizado para proteínas y cuando se expresa en el espacio periplásmico, puede recuperarse en el resto extracelular destruyendo las células con un tratamiento tal como digestión parcial con lisozima, choque de presión osmótica, tratamiento con ultrasonidos o similares. El Fab' uniforme puede purificarse después del replegamiento o en la suspensión de células rotas utilizando una columna con proteína G o similar (*Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL PRESS (1996)).

(4) Preparación de scFv

Puede prepararse scFv utilizando un fago o *Escherichia coli* por técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, un ADN que codifica scFv se produce ligando los ADN que codifican la VH y VL del anticuerpo descritas en los apartados 1(2) y (3) mediante un ADN que codifica un enlazador polipeptídico que comprende una secuencia de aminoácidos de 12 restos o más. Un vector para la expresión de scFv puede construirse clonando el ADN resultante en un vector para la expresión de scFv. Como vector para la expresión de scFv puede utilizarse cualquier vector, con tal que pueda insertarse y expresarse un ADN para scFv. Los ejemplos incluyen pCANTAB5E (preparado por Pharmacia), Phfa (*Hum. Antibody Hybridoma*, 5, 48 (1994)) y similares. Se introdujo el vector para la expresión de scFv en una *Escherichia coli* apropiada y se infectó con un fago colaborador para obtener de este modo un fago que expresa scFv en la superficie del fago en forma fusionada con la proteína de la superficie del fago. Además, el scFv puede formarse y acumularse en el cuerpo de inclusión o en el espacio periplásmico de *Escherichia coli* en la que se introduce el vector para la expresión de scFv. Puede obtenerse scFv activo del cuerpo de inclusión por un procedimiento de replegamiento utilizado generalmente para las proteínas, y cuando se expresa en el espacio periplásmico, puede recuperarse extracelularmente destruyendo las células con un tratamiento tal como digestión parcial con lisozima, choque de presión osmótica, tratamiento con ultrasonidos o similares. El scFv uniforme puede purificarse después del replegamiento y en la suspensión de células rotas por cromatografía de intercambio catiónico o similar (*Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL PRESS (1996)).

(5) Preparación del diacuerpo

El diacuerpo puede prepararse cambiando el tamaño del enlazador de polipéptidos para preparar scFv a aproximadamente 3 a 10 restos. Un diacuerpo divalente puede prepararse cuando se utiliza VH y VL de una especie de anticuerpo, y un diacuerpo que tiene dos especificidades diferentes cuando se utilizan VH y VL de dos especies de anticuerpo (*FEBS Letters*, 453, 164 (1999), *Int. J. Cancer*, 77, 763 (1998)).

(6) Preparación de dsFv

El dsFv puede prepararse utilizando *Escherichia coli* por técnicas de ingeniería genética. En primer lugar, se producen los ADN en los que un resto de aminoácido codificado se sustituye por un resto de cisteína introduciendo la mutación en las posiciones apropiadas de los ADN que codifican los VH y VL del anticuerpo descritos en los apartados 1(2) y 1(3). Los vectores para la expresión de VH y VL pueden producirse clonando cada uno de los ADN resultantes en un vector para la expresión de dsFv. Como vector para la expresión de dsFv, puede utilizarse cualquier vector, con tal que pueda insertarse y expresarse un ADN para dsFv. Los ejemplos incluyen pULI9 (*Protein Engineering*, 7, 697, (1994)) y similares. Los vectores para la expresión de VH y VL se introducen en una *Escherichia coli* apropiada para formar y acumular de este modo el VH y VL en el cuerpo de inclusión o en el espacio periplásmico. El VH y el VL se obtienen a partir del cuerpo de inclusión o del espacio periplásmico y se mezclan, y el dsFv activo puede obtenerse por un procedimiento de replegamiento utilizado generalmente para las proteínas. Después del replegamiento, puede purificarse más por cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel o similares (*Protein Engineering*, 7, 697, (1994)).

(7) Preparación del péptido que contiene CDR

Un péptido que contiene CDR puede prepararse por un procedimiento de síntesis química tal como Fmoc, tBoc o similares. Además, se prepara un ADN que codifica un péptido que contiene CDR, y el ADN resultante se clona en un vector apropiado para la expresión para preparar de este modo el péptido que contiene la CDR. Como vector de expresión, puede utilizarse cualquier vector, con tal que un ADN que codifica un péptido que contiene la CDR se inserte y exprese. Los ejemplos incluyen pLEX (preparado por Invitrogen), pAX4a+ (preparado por Invitrogen) y similares. El vector de expresión se introduce en una *Escherichia coli* apropiada de modo que el péptido que contiene la CDR pueda formarse y acumularse en el cuerpo de inclusión o en el espacio periplásmico. El péptido que contiene CDR puede obtenerse del cuerpo de inclusión o del espacio periplásmico, y puede purificarse más por cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel o similares (*Protein Engineering*, 7, 697, (1994)).

3. Evaluación de la actividad y propiedad del anticuerpo de la presente invención

(1) Evaluación de la actividad de unión al antígeno

5 Una actividad de unión al anticuerpo de la presente invención para un antígeno puede medirse mediante el ensayo inmunosorbente con enzima ligada (ELISA), la técnica del anticuerpo fluorescente (*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993)), la resonancia de plasmones superficiales utilizando BIAcore™ y similar. Específicamente, se produce un péptido sintético que comprende una secuencia parcial de CCR4 y se prepara un conjugado enlazándolo químicamente a una proteína portadora tal como la albúmina de suero bovino o similar. Una actividad de unión a CCR4 del anticuerpo de la presente invención puede medirse inmovilizando el conjugado en una placa de ELISA, permitiéndole reaccionar con el anticuerpo de la presente invención, permitiéndole además reaccionar con un anticuerpo marcado o un fragmento de fijación tal como un anticuerpo marcado con peroxidasa o biotina o un fragmento de fijación, y a continuación midiendo un color del colorante utilizando un fotómetro de absorción.

(2) Reactividad para las células que expresan CCR4

15 Para examinar la reactividad a las células que expresan CCR4, es preferible utilizar un procedimiento para detectar de manera eficaz el CCR4 expresado en la superficie celular. El procedimiento incluye la citometría de flujo utilizando la técnica de anticuerpos fluorescentes y similares. Además, cuando se examina la reactividad con las células del cuerpo vivo tales como las plaquetas y similares, es preferible realizar el examen en condiciones tan próximas como sea posible al cuerpo vivo. Por estas razones, cuando se examina la reactividad del anticuerpo anti-CCR4 de la presente invención, lo más deseable es realizar el examen por citometría de flujo utilizando la técnica de anticuerpos fluorescentes.

20 El anticuerpo utilizado en la técnica de anticuerpos fluorescentes puede ser bien un anticuerpo marcado con un material fluorescente tal como FITC, biotina o similares, o un anticuerpo no marcado. Dependiendo de la presencia o ausencia de una etiqueta del anticuerpo utilizado y su clase, se utilizan avidina marcada con fluorescencia, un anticuerpo de inmunoglobulina antihumano marcado con fluorescencia y similares. La reactividad puede evaluarse realizando la reacción añadiendo una cantidad suficiente de un anticuerpo anti-CCR4 (generalmente de 0,1 a 10 µg/ml como concentración final) contra una muestra analizada y comparando su reactividad con las de un anticuerpo de referencia negativa y un anticuerpo de referencia positiva.

(3) Actividad citotóxica

25 La actividad citotóxica para las células que expresan CCR4 puede evaluarse midiendo la actividad CDC, la actividad ADCC y similar (*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993)). Los cambios en la cantidad de citocina producida pueden medirse por el método ELISA, la técnica del anticuerpo fluorescente y similar utilizando un anticuerpo para citocina.

(4) Actividad de inhibición de la unión al ligando

35 Una actividad de inhibición del enlace al ligando del anticuerpo anti-CCR4 de la presente invención puede examinarse utilizando un marcador de TARC o MDC como ligando con actividad de unión a CCR4 y una célula que expresa CCR4 o una fracción de la membrana celular de la misma. TARC o MDC pueden marcarse por cualquier técnica que pueda detectarse, y los ejemplos incluyen el marcado por fluorescencia, marcado enzimático, marcado por radiación y similares. Ejemplos específicos incluyen el procedimiento midiendo la actividad de inhibición de enlace utilizando un marcador de radiación descrito en el documento WO 00/42074.

40 Además, una actividad de inhibición de la fijación al ligando del anticuerpo anti-CCR4 de la presente invención puede examinarse utilizando una respuesta celular inducida por la unión de un ligando a CCR4 como índice. La respuesta celular puede ser de cualquier tipo, con tal que se induzca poniendo en contacto un ligando con una célula para expresar CCR4, y los ejemplos incluyen cambios en la concentración del calcio intracelular, migración celular y similares. Ejemplos específicos incluyen el procedimiento que mide la inhibición de la migración de una célula que expresa a CCR4 inducida por un ligando de CCR4 descrito en el documento WO 00/42074.

(5) Examen de la secuencia de reconocimiento

45 Una secuencia de aminoácidos reconocible por el anticuerpo de la presente invención puede determinarse utilizando un péptido sintético diseñado basándose en la secuencia primaria de su correspondiente proteína antigénica.

50 Se diseña una secuencia primaria del péptido sintético basándose en la secuencia primaria de la proteína antigénica. Con objeto de preparar una proteína en la que el péptido sintético está reticulado con una proteína portadora, un resto de cisteína puede añadirse al terminal carboxilo o al terminal amino del péptido sintético. La proteína resultante puede utilizarse en el ELISA que será descrito después. Además, si es necesario el terminal N y el terminal C del péptido sintético puede acilarse y amidarse, respectivamente.

55 Un péptido puede sintetizarse por un procedimiento de síntesis de péptidos en fase líquida general o en

fase sólida, cualquier procedimiento combinado de los mismos o un procedimiento modificado de los mismos (*International Journal of Peptide Protein Research*, 35, 161-214 (1990), "Solid-Phase Peptide Synthesis", *Methods in Enzymology*, vol. 289, editado por Gregg B. Fields, Academic Press (1997), "Peptide Synthesis Protocols", *Methods in Molecular Biology*, vol. 35 editado por Michael W. Pennington y Ben M. Dunn, Humana Press (1994)).

5 Además, puede utilizarse también un sintetizador de péptidos automático. La síntesis de un péptido mediante un sintetizador de péptidos puede realizarse mediante un sintetizador de péptidos disponible en el mercado tal como el sintetizador de péptidos fabricado por Shimadzu Corp., el sintetizador de péptidos fabricado por Advanced Chem. Tech. Inc., USA (denominado en adelante "ACT") o similar, utilizando N^α-Fmoc-aminoácidos, N^α-Boc-aminoácidos o similares, cuyas cadenas laterales están protegidas apropiadamente y de acuerdo con los programas de síntesis respectivos: Los aminoácidos protegidos utilizados como material y resinas portadoras puede adquirirse en ABI Inc., Shimadzu Corp., Kokusan Kagaku K. K., NovaBiochem, Watanabe Kagaku K. K., ACT, AnaSpec Inc., Peptide Research Institut y similares.

10 Como procedimiento para la determinación de una secuencia de aminoácidos reconocible por el anticuerpo de la presente invención utilizando el péptido sintético, puede utilizarse cualquier técnica, con tal que sea un procedimiento que pueda detectar la unión del péptido sintético al anticuerpo. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos reconocible por el anticuerpo puede determinarse marcando el péptido sintético con un material fluorescente, un material radioactivo o similar y examinando la actividad de unión del péptido marcado resultante contra el anticuerpo. Además, puede realizarse reticulando el péptido sintético con una proteína tal como la albúmina de suero bovino (BSA) o similar y evaluando la reactividad de la proteína resultante con un anticuerpo por ELISA o similar. Además, una secuencia de aminoácidos reconocible por el anticuerpo de la presente invención puede determinarse también utilizando una sustancia ya confirmada de que el anticuerpo se une a éste, tal como una proteína de anticuerpo, y examinando un péptido sintético que inhibe la unión del anticuerpo a la sustancia.

(4) Procedimiento para detectar y cuantificar CCR4 utilizando anticuerpo anti-CCR4

15 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar y determinar inmunológicamente CCR4 o un CCR4 que se expresa en la célula sobre la superficie de la misma utilizando el anticuerpo de la presente invención.

20 Los procedimientos para detectar inmunológicamente y determinar CCR4 o una célula que expresa CCR4 sobre la superficie de la misma utilizando el anticuerpo de la presente invención incluyen un procedimiento inmunofluorescente, un ensayo inmunosorbente con enzima ligada (ELISA), un inmunoanálisis marcado con material radioactivo (RIA), un procedimiento de tinción inmunohistoquímica tal como un procedimiento de tinción de inmunocitos, un procedimiento de tinción de inmunotejidos, o similar (método ABC, método CSA, etc.), el inmunoanálisis enzimático anterior, un sándwich de ELISA (*Monoclonal Antibody Experiment Manual* (publicado por Kodansha Scientific, 1987), *Second Series Biochemical Experiment Course*, Vol. 5, *Immunobiochemistry Research Method*, publicado por Tokyo Kagaku Dojin (1986)).

25 El método inmunofluorescente comprende hacer reaccionar una célula aislada, tejido o similares con el anticuerpo de la presente invención, haciendo reaccionar el reactante con un anticuerpo antiinmunoglobina o uniendo el fragmento marcado con una sustancia fluorescente tal como fluoresceína o isotiocianato (FTCC) o similar, y a continuación midiendo la sustancia fluorescente con un citómetro de flujo.

30 El ensayo del inmunosorbente con enzima ligada (ELISA) comprende hacer reaccionar una célula aislada o un lisado celular de la misma, tejido o lisado tisular del mismo, sobrenadante del cultivo celular, semen, fluido pleural, fluido ascítico, fluido ocular o similares con el anticuerpo de la presente invención, haciendo reaccionar el reactante con un anticuerpo antiinmunoglobulina o uniendo el fragmento marcado con una enzima como peroxidasa, biotina, o similar, y a continuación midiendo el colorante desarrollado resultante con un fotómetro de absorción.

35 El inmunoanálisis marcado con material radioactivo (RIA) comprende hacer reaccionar una célula separada o una célula lisada, tejido o lisado de tejido, sobrenadante del cultivo celular, suero, fluido pleural, fluido ascítico, fluido ocular o similares con el anticuerpo de la presente invención, reaccionando además el reactivo con un anticuerpo antiinmunoglobulina o fijando el fragmento marcado con radioisótopo, y a continuación midiendo la radioactividad con un contador de centelleo o similar.

40 Los métodos de tinción de inmunocitos y tinción de inmunotejidos comprenden hacer reaccionar una célula aislada, tejido o similar con el anticuerpo de la presente invención, reaccionando el reactante con un anticuerpo antiinmunoglobulina o uniendo el fragmento marcado con una sustancia fluorescente tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC) o similar o una enzima tal como peroxidasa, biotina o similar, y a continuación observando al microscopio la célula, tejido o similar.

45 El ELISA en sandwich es un procedimiento que comprende la adsorción, en una placa, de uno de los dos anticuerpos con un epítipo diferente entre los anticuerpos de la presente invención; marcando otro anticuerpo con una sustancia fluorescente tal como FITC o similar, o una enzima tal como peroxidasa, biotina o similar; haciendo reaccionar una célula aislada o un lisado celular, tejido o lisado de tejido, sobrenadante del cultivo celular, suero, líquido pleural, fluido ascítico, fluido ocular o similar con la placa de adsorción del anticuerpo y a continuación

haciéndolo reaccionar con el anticuerpo marcado para llevar a cabo una reacción según la sustancia marcada.

5. Procedimiento para utilizar el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo

5 Dado que el anticuerpo de la presente invención se une específicamente a CCR4 que se expresa en una estirpe celular cultivada y muestra actividad citotóxica tal como actividad CDC, actividad ADCC y similares, será útil en el diagnóstico y en el tratamiento de enfermedades relacionadas con CCR4 tales como las enfermedades mediadas por Th2 y similares. Además, como la proporción de secuencias de aminoácidos procedentes del anticuerpo humano es mayor que en anticuerpos de un animal no humano, cabe esperar que muestre fuerte actividad citotóxica en el cuerpo humano, no muestre inmunogenicidad y sus efectos continúen durante largo tiempo.

10 Además, la producción de citocinas Th2 que son producidas por las células tales como IL-4, IL-5, IL-13 y similares, puede inhibirse administrando el anticuerpo de la presente invención a células o tejidos de un paciente experimental.

15 En cuanto a la célula que expresa CCR4 en relación con la presente invención, se ilustran los linfocitos Th2 y similares. El linfocito Th2 utilizado en la presente invención es el linfocito Th2 preferentemente activado o el linfocito Th2 de la memoria. Los ejemplos incluyen las células que tienen propiedades de CD45RA- o CD45RO+ y CD4+.

20 Se generan actividades citotóxicas del anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, cuando el anticuerpo de la presente invención se une a las células que expresa CCR4 tales como un linfocito Th2 para producir de este modo apoptosis en la célula. Además, la célula puede obstruirse y eliminarse produciendo apoptosis.

Además, el procedimiento para diagnosticar enfermedades inmunitarias o cánceres mediados por Th2 incluye un procedimiento en el que la célula humana positiva a CCR4 existente en las células o tejidos de un paciente experimental se detecta inmunológicamente como se describió anteriormente.

25 Además, el anticuerpo de la presente invención puede utilizarse como agente de diagnóstico para las enfermedades relacionadas con CCR4 tales como las enfermedades inmunitarias o cánceres mediados por Th2 o las enfermedades en las que los estados mórbidos avanzan debido al aumento o disminución anormal de los linfocitos Th2.

30 Además, como el anticuerpo de la presente invención puede reducir o eliminar las células que expresan CCR4 por su actividad citotóxica, puede proporcionar un método de diagnóstico o un método terapéutico para las enfermedades relacionadas con CCR4 tales como las enfermedades inmunitarias o cánceres mediados por Th2, que utilizan el anticuerpo de la presente invención, y agentes terapéuticos y preventivos para las enfermedades relacionadas con CCR4 tales como las enfermedades inmunitarias o cánceres mediados por Th2, que comprenden el anticuerpo de la presente invención como principio activo.

35 Las enfermedades inmunitarias mediadas por Th2 incluyen, independientemente de las enfermedades inflamatorias leves o graves tales como la hipersensibilidad aguda o crónica de las vías respiratorias o el asma bronquial, atopias cutáneas que incluyen la dermatitis atópica, la rinitis alérgica, polenosis, y similares; enfermedades producidas por células de inflamación competentes tales como eosinófilos, mastocitos y similares que pueden propagarse o activarse por citocina y quimiocina liberadas de los linfocitos Th2, moléculas biológicamente funcionales tales como IgE y similares que son producidas por citocinas y quimiocinas liberadas en los linfocitos Th2 y similares; y enfermedades inmunitarias en las que los estados mórbidos avanzan debido a cambios anormales en los linfocitos Th2.

40 El anticuerpo de la presente invención puede administrarse solo, pero resulta generalmente preferido su suministro como una formulación farmacéutica producida mezclándolo con por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable según un procedimiento bien conocido en el campo técnico de los productos farmacéuticos.

45 Se prefiere seleccionar una vía de administración que sea la más eficaz en la realización del tratamiento deseado tal como la administración oral como la administración parenteral, por ejemplo, administración intrabucal, administración traqueal, administración rectal, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa y similares. Se prefiere la inyección intravenosa en una formulación de anticuerpos o péptidos.

50 La forma farmacéutica incluye atomizadores, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, tiras y similares.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares.

55 Pueden producirse preparaciones líquidas tales como emulsiones y jarabes, utilizando aditivos tales como agua, sacáridos, por ejemplo, sacarosa, sorbitol, fructosa; glicoles, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol;

aceites, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja; antisépticos, por ejemplo, p-hidroxibenzoato; y aromatizantes, por ejemplo, aromatizante de fresa, menta.

5 Pueden producirse cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares utilizando aditivos tales como cargas, por ejemplo, lactosa, glucosa, sacarosa, manitol; agentes disgregadores, por ejemplo, almidón, alginato de sodio; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco; aglutinantes, por ejemplo, alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa, gelatina; tensoactivos, por ejemplo, ésteres de ácido graso; y plastificantes, por ejemplo, glicerina.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen inyecciones, supositorios, atomizadores y similares.

10 Las inyecciones pueden prepararse utilizando un vehículo tal como una solución salina, una solución de glucosa o una mezcla de las mismas, o similares.

Los supositorios pueden prepararse utilizando un vehículo tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada, un ácido carboxílico o similares.

15 Además, pueden prepararse atomizadores a partir del propio anticuerpo o utilizando un vehículo o similar que no estimule las membranas de las mucosas bucales y de las vías respiratorias de los pacientes y pueda facilitar la absorción del anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo del mismo dispersándolo en partículas diminutas.

El vehículo incluye lactosa, glicerina y similares. Dependiendo de las propiedades del anticuerpo o del péptido y del vehículo que debe utilizarse, pueden producirse aerosoles, polvos anhidros y similares. Los aditivos a título de ejemplo en las preparaciones orales pueden añadirse también a las preparaciones parenterales.

20 La dosis y frecuencia de la administración varía dependiendo del efecto terapéutico pretendido, del método de administración, del período de tratamiento, de la edad, del peso corporal y similares, pero la dosis es generalmente de 0,01 mg/kg a 20 mg/kg al día por adulto.

En la presente invención se describe a continuación a partir de los ejemplos no limitativos de la misma siguientes.

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 representa las etapas de construcción de un plásmido pKM2160Gal0.

La figura 2 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKM2160Gal1. El símbolo * muestra la posición del codón de mutación genética que modifica un resto de aminoácido.

30 La figura 3 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKM2160Gal3. El símbolo * muestra la posición del codón de mutación genética que modifica un resto de aminoácido.

La figura 4 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKM2160LV0.

La figura 5 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKM2160LV1. El símbolo * muestra la posición del codón de mutación genética que modifica un resto de aminoácido.

35 La figura 6 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKANTEX2160LV0 y del plásmido pKANTEX2160Gal0LV0.

La figura 7 muestra la reactividad de un sobrenadante del cultivo obtenido expresando temporalmente un vector de expresión de cada anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR en la célula COS-7, con un péptido CCR4 parcial según ELISA.

40 La figura 8 muestra la reactividad de un sobrenadante del cultivo obtenido expresando temporalmente un vector de expresión de cada anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR preparado utilizando otros FR en la célula COS-7, con un péptido CCR4 parcial según ELISA.

La figura 9 muestra la reactividad de un anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR con un péptido CCR4 parcial.

45 La figura 10 muestra la reactividad de un anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR con una célula de alta expresión en CCR4 (CCR4/EL-4).

La figura 11 muestra la afinidad de un anticuerpo anti-CCR4 purificado injertado con CDR con un péptido parcial de CCR4 medida utilizando un detector de resonancia de plasmones superficiales.

La figura 12 muestra la citotoxicidad según la actividad ADCC contra la célula CCR4/EL-4.

La figura 13 muestra el efecto sobre la inhibición de IL-4, IL-13 e IFN- γ de PBMC humanas.

La figura 14 muestra la actividad de unión de cada anticuerpo a una plaqueta humana.

La figura 15 muestra las etapas de construcción de los plásmidos pKM2160VH41 y pKM2160VL61.

La figura 16 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKANTEX2160H.

5

La figura 17 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKANTEX2160.

MEJOR MODO DE PONER EN PRÁCTICA LA INVENCÓN

EJEMPLO 1

Producción de anticuerpo humano injertado con CDR para CCR4

1. Diseño del ADNc que codifica VH y VL del anticuerpo humano injertado con CDR para CCR4

10

(1) Diseño de la secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo humano injertado con CDR para CCR4

En primer lugar, una secuencia de aminoácidos de la VH de un anticuerpo humano injertado con CDR para CCR4 (anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR) se diseñó de la manera siguiente. Una secuencia de aminoácidos de FR de VH de un anticuerpo humano se seleccionó para injertar secuencias de aminoácidos de CDR1, 2 y 3 de VH representadas por las SEC. ID. nº 1, nº 2 y nº 3 utilizando el anticuerpo KM2160 de ratón anti-CCR4 (*Int. Immunol.*, 11, 81 (1999)) creado en el Ejemplo 1 de Referencia. Los anticuerpos humanos que tienen gran homología con KM2160 se recuperaron de la bases de datos de secuencias de aminoácidos de las proteínas existentes por el método BLASTP (*Nucleic. Acids Res.*, 25, 3389 (1997)) utilizando el paquete GCG (elaborado por Genetics Computer Group) como un sistema analizador de secuencias. Al comparar la homología de la secuencia de aminoácidos existente con las puntuaciones de la homología, nº de registro P01781 de la base de datos SWISSPROT, la región Gal de la cadena pesada V-III de Ig (Hoppe. Seylers. Z., *Physiol. Chem.*, 354, 1505-1509 (1973), denominado en adelante "Gal") era un anticuerpo humano que presenta la mayor homología de 82,5%, de modo que la secuencia de aminoácidos de FR del anticuerpo se seleccionó. Sin embargo, las posiciones en las que los restos de aminoácidos no pueden determinarse únicamente (posiciones 28 y 30 a partir del terminal N de un anticuerpo secretor) y un resto de aminoácidos que tiene baja frecuencia de generación en las secuencias de anticuerpos humanos (Thr como resto final de la región V) se encontraron en la secuencia de aminoácidos de FR de Gal en la base de datos. Por consiguiente, Ile y Ser como restos encontrados en KM2160 de ratón se seleccionaron como las posiciones 28 y 30 y Thr como resto final de la región V se sustituyó con Ser. Dado que los restos de aminoácidos se encuentran a frecuencias elevadas en las secuencias de algunos anticuerpos humanos (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991), no se desvían de las secuencias de anticuerpos humanos.

30

La secuencia Gal0 de aminoácidos de VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR representada por la SEC. ID. nº 4, se diseñó injertando secuencias de aminoácidos de CDR1, 2 y 3 de VH del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 de ratón representada por las SEC. ID. nº 1, nº 2 y nº 3, respectivamente, a posiciones apropiadas en la secuencia de aminoácidos determinada del anticuerpo FR humano. Una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº 4 está representada por la SEC. ID. nº 49.

35

Además, una secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR se diseñó basándose en las secuencias comunes clasificadas por Kabat *et al.*

Kabat *et al.* han clasificado la VH de varios anticuerpos humanos ya conocidos en tres subgrupos (HSG I a III) basándose en la homología de sus secuencias de aminoácidos y las secuencias comunes publicadas en cada subgrupo (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991). Existe una posibilidad de que la inmunogenicidad de las secuencias comunes se reduzca en los seres humanos. Por consiguiente, para preparar un anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR que tiene grana actividad, entre las secuencias de aminoácidos de FR de las secuencias comunes de tres subgrupos de la VH del anticuerpo humano, una secuencia de aminoácidos de FR que tiene la mayor homología con la secuencia de aminoácidos de FR de VH de KM2160 se seleccionó en el diseño. La Tabla 1 presenta un resultado de la recuperación de homología entre las secuencias de aminoácidos de la FR y las secuencias comunes de cada subgrupo de la VH del anticuerpo humano y de la secuencia de aminoácidos de FR de la VH de KM2160. Como se muestra en la Tabla 1, la secuencia de aminoácidos de FR de la región VH de KM2160 presentó la mayor homología con el subgrupo III.

40

45

Tabla 1

HSG I	HSG II	HSG III
57,47%	50,58%	77,01%

Basándose en los resultados anteriores, la secuencia de aminoácidos HV0 de la VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR representado por la SEC. ID. nº 38 se diseñó injertando la secuencia de aminoácidos de CDR de VH del anticuerpo KM2160 de ratón anti-CCR4 a una posición apropiada de la secuencia de aminoácidos de FR de la especie común del subgrupo III de la VH del anticuerpo humano. Una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº 38 está representada por la SEC. ID. nº 57.

(2) Diseño de la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo humano injertado con CDR para CCR4

A continuación, se diseñó una secuencia de aminoácidos de la VL de un anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR de la manera siguiente. Se seleccionó una secuencia de aminoácidos de FR de VL de un anticuerpo humano para injertar la secuencia de aminoácidos de la CDR1, 2 y 3 de VL del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 de ratón, representado por las SEC. ID. nº 5, nº 6 y nº 7. Kabat *et al.* han clasificado la VL de varios anticuerpos humanos ya conocidos en cuatro subgrupos (HSG I a IV) basándose en la homología de sus secuencias de aminoácidos y de las secuencias comunes indicadas en cada subgrupo (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991). Por consiguiente, entre las secuencias de aminoácidos de FR de las secuencias comunes de cuatro subgrupos de la VL del anticuerpo humano, se seleccionó una secuencia de aminoácidos de FR que tiene la mayor homología con la secuencia de aminoácidos de FR de la VL de KM2160. La Tabla 2 presenta un resultado de la recuperación de la homología entre las secuencias de aminoácidos de FR de la secuencia común de cada subgrupo de la VL de anticuerpo humano y la secuencia de aminoácidos de FR de VL de KM2160. Tal como se muestra en la Tabla 2, la secuencia de aminoácidos de FR de la VL de KM2160 presentó la mayor homología con el subgrupo II.

Tabla 2

HSG I	HSG II	HSG III	HSG IV
65,00%	82,50%	65,00%	72,50%

Basándose en los resultados anteriores, se diseñó la secuencia de aminoácidos LV0 de VL del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR representada por la SEC. ID. nº 8 injertando la secuencia de aminoácidos de CDR1, 2 y 3 de VL del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 de ratón representado por la SEC. ID. nº 5, nº 6 y nº 7, respectivamente, a posiciones apropiadas en la secuencia de aminoácidos de FR de la secuencia común del subgrupo II de la VL de anticuerpo humano. Una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº 8 está representada por la SEC. ID. nº 53.

(3) Modificación de VH y VL del anticuerpo humano injertado con CDR para CCR4

Las secuencias de aminoácidos de VH Gal0 y HV0, y la secuencia de aminoácidos LV0 de VL del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR diseñadas anteriormente son anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de CDR del anticuerpo KM2160 de ratón anti-CCR4 sola se injerta a las secuencias de aminoácidos de FR seleccionadas del anticuerpo humano. Sin embargo, cuando se realiza el injerto solamente con la secuencia de aminoácidos de CDR de un anticuerpo de ratón, la actividad de un anticuerpo humano injertado con CDR frecuentemente disminuye de modo que, para evitar la disminución, determinados restos de aminoácidos entre los restos de aminoácidos de FR diferentes entre un anticuerpo humano y un anticuerpo de ratón, que se consideran que ejercen influencias en la actividad, se injertan generalmente junto con la secuencia de aminoácidos de CDR. Por consiguiente, en este ejemplo, se realizó un examen para identificar los restos de aminoácidos de FR considerados que tienen influencias sobre la actividad.

En primer lugar, se construyeron las estructuras tridimensionales de las regiones V (Gal0LV0 y HV0LV0) del anticuerpo que comprenden las secuencias de aminoácidos Gal0 y HV0 de VH y la secuencia de aminoácidos LV0 de VL en el anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR diseñado anteriormente utilizando una técnica de modelado por ordenador. Se prepararon las coordenadas de la estructura tridimensional utilizando un programa informático AbM (preparado por Oxford Molecular), y la presentación de las estructuras tridimensionales utilizando un programa informático Pro-Explore (elaborado por Oxford Molecular) o RasMol (preparado por Glaxo) según las instrucciones respectivas del fabricante adjuntas. Además, de las regiones V del anticuerpo KM2160 de ratón anti-CCR4. Además, se construyeron de la misma manera modelos de estructuras tridimensionales que contenían secuencias de aminoácidos modificadas, en las que determinados restos de las secuencias de aminoácidos FR de VH y VL de Gal0LV0 o HV0LV0, diferentes del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 en ratón, se sustituyeron con otros restos hallados en posiciones correspondientes en el anticuerpo KM2160 anti-CCR4 en ratón, y las estructuras tridimensionales de las regiones V del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 en ratón, Gal0LV0 o HV0LV0, y se comparó el producto modificado.

Como resultado, se cambió la estructura tridimensional de la región de fijación al antígeno de modo que Ala en la posición 40, Gly en la posición 42, Lys en la posición 43, Gly en la posición 44 y Lys en la posición 76 y Ala en la posición 97 en Gal0, Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 para HV0 e Ile en la posición 2, Val en la posición 3, Gln en la posición 50 y Val en la posición 88 en LV0 se seleccionaron como restos que se considera que tienen influencia en la actividad del anticuerpo entre los restos de FR del aminoácido de Gal0LV0 o HV0LV0. Entre

estos restos de aminoácidos seleccionados, se modifica por lo menos un aminoácido en un(os) resto(s) de aminoácido(s) encontrado(s) en el anticuerpo KM2160 de ratón de modo que se diseñaron VH y VL del anticuerpo humano injertado con CDR que presentan varias modificaciones.

En primer lugar, con respecto a VH, por ejemplo, Gall representado por la SEC. ID. nº 9 en la que se modificó Ala en la posición 97 de Gal0, Gal2 representado por la SEC. ID. nº 10 en la que se modificaron Gly en la posición 42 y Gly en la posición 44 de Gal0, Gal3 representado por la SEC. ID. nº 11 en la que se modificaron Ala en la posición 97, Gly en la posición 42 y Gly en la posición 44 de Gal0, HV1 representado por la SEC. ID. nº 39 en la que se modificó Thr en la posición 28 de HV0, HV2 representado por la SEC. ID. nº 40 en la que se modificó Ala en la posición 97 de HV0, y HV3 representado por la SEC. ID. nº 41 en la que se modificaron y se diseñaron Thr en la posición 28 y Ala en la posición 97 de HV0. Además, con respecto a la VL, por ejemplo, la LV1 representada por la SEC. ID. nº 12 en la que se modificó Ile en la posición 2, LV2 representada por la SEC. ID. nº 13 en la que se modificó Val en la posición 3 y LV3 representada por la SEC. ID. nº 14 en la que se modificaron y se diseñaron Ile en la posición 2 y Val en la posición 3. Las secuencias nucleotídicas que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por SEC. ID. nº 9 a nº 11, nº 39 a nº 41 y nº 12 a nº 14 están representadas por las SEC. ID. nº 50 a nº 52, nº 58 a nº 60 y nº 54 a nº 56, respectivamente.

2. Construcción del ADNc que codifica el anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR

(1) Construcción del ADNc que codifica el VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR

El ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos Gal0 de VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR diseñado en 1(1) del Ejemplo 1 se construyó utilizando la PCR de la forma siguiente.

En primer lugar, se diseñó una secuencia completa de aminoácidos del anticuerpo ligando la secuencia de aminoácidos con la secuencia señal secretora de la cadena H del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 de ratón representada por la SEC. ID. nº 15. A continuación, la secuencia de aminoácidos se convirtió en codones genéticos. Cuando están presentes dos o más codones genéticos por cada resto de aminoácido, un codón genético correspondiente se determinaba teniendo en consideración la utilización del codón encontrada en secuencias nucleotídicas de genes de anticuerpo (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991). Una secuencia nucleotídica del ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo completa se diseñó ligando los codones genéticos determinados, y uniendo las secuencias nucleotídicas de los cebadores para la ampliación por PCR (incluyendo las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción para la clonación en un vector para la expresión del anticuerpo humanizado) se añadieron a su terminal 5' y al terminal 3'. La secuencia nucleotídica diseñada se dividió en un total de 6 secuencias nucleotídicas teniendo cada una aproximadamente 100 nucleótidos contando desde el terminal 5' (secuencias nucleotídicas adjuntas se diseñan de modo que tienen una secuencia complementaria de aproximadamente 20 nucleótidos en su terminal) y 6 oligonucleótidos sintéticos de las SEC. ID. nº 16, nº 17, nº 18, nº 19, nº 20 y nº 21, se sintetizaron en órdenes recíprocos de una cadena transcrita y de una cadena complementaria (preparada por GENSET).

Se realizó la PCR añadiendo cada oligonucleótido a la solución de reacción que contenía los NTPd 0,2 Mm y cloruro de magnesio 1 mM, para dar una concentración final de 0,1 µM, y ajustando el volumen total a 50 µl utilizando RV del cebador M13 0,4 µM (preparado por Takara Shuzo), M3 del cebador M13 0,4 µM (preparado por GENSET) y 2,5 unidades de KOD polimerasa (preparada por TOYOBO). La reacción se realizó en 30 ciclos, consistiendo cada ciclo en 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 74°C durante 60 segundos, y a continuación 1 ciclo de 74°C durante 10 minutos. La solución de reacción se purificó utilizando el kit de purificación de PCR QIA quick (fabricado por QIAGEN) y por último se disolvió en agua esterilizada. Se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora la solución de reacción utilizando 10 unidades una enzima de restricción *Apal* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de una enzima de restricción *NotI* (preparada por Takara Shuzo). La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa y se recuperó un fragmento *Apal-NotI* de aproximadamente 0,47 kb.

Después 3 µg del plásmido pBluescript II SK(-) (preparado por Stratagene) se dejaron reaccionar con el fragmento utilizando 10 unidades de enzima de restricción *Apal* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de una enzima de restricción *NotI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. Dicha solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa y se recuperó un fragmento *Apal-NotI* de aproximadamente 2,95 kb.

Después, el fragmento *Apal-NotI* resultante del producto de PCR de VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR y el fragmento *Apal-NotI* del plásmido pBluescript II SK(-) se ligaron utilizando solución I del kit de ligadura de ADN versión 2 (preparado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. DH5α de *Escherichia coli* (preparado por TOYOBO) se transformó utilizando la solución de plásmido ADN recombinante obtenida de esta manera, cada plásmido de ADN se preparó a partir de los clones de transformante y se analizaron las secuencias nucleotídicas utilizando el kit Big Dye Terminator versión 2 (preparado por Applied Biosystems). Como resultado de los análisis de la secuencia nucleotídica, se obtuvo un plásmido pKM2160Gal0 mostrado en la figura 1 que tiene la secuencia nucleotídica objetivo. *Escherichia coli* transformada con pKM2160Gal0, DH5α/pKM2160Gal0 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 22 de agosto de 2001, como FERM BP-7709 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

A continuación, los restos de aminoácidos de FR diseñados en 1(3) del Ejemplo 1 se modificaron de la forma siguiente. Los codones genéticos para los restos de aminoácidos después de la modificación, se modificaron para tener los codones genéticos encontrados en el anticuerpo KM2160 de ratón.

5 En la modificación de Ala en la posición 97 a Gly, se realizó la PCR utilizando 25 ng del plásmido pKM2160Gal0 preparado en este apartado como plantilla, en primer lugar calentando a 94°C durante 2 minutos y a continuación realizando 35 ciclos de la reacción consistiendo cada ciclo en 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 40 segundos, en 50 µl de un sistema de reacción preparado añadiendo cada uno de los ADN sintéticos para transferencia génica que comprende las secuencias nucleotídicas representadas por las SEC. ID. nº 22 y nº 23 (preparadas por GENSET) como cebadores para dar una concentración final de 0,4 µM y utilizando 2,5 unidades de KOD más polimerasa (preparada por TOYOBO) según las instrucciones del fabricante. La solución de reacción se purificó utilizando el kit de purificación por PCR QIA quick (fabricado por QIAGEN) y por último se disolvió en agua esterilizada. El volumen total se dejó reaccionar durante 1 hora a 37°C utilizando 10 unidades de una enzima de restricción *Pst*I (preparada por Takara Shuzo) y después se dejó reaccionar durante 1 hora a 37°C utilizando 10 unidades de una enzima de restricción *Dra*III (preparada por New England Biolabs). La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa y se recuperó un fragmento *Pst*I-*Dra*III de aproximadamente 0,58 kb.

20 A continuación, se dejaron reaccionar 3 µg del plásmido pKM2160Gal0 a 37°C durante 1 hora utilizando 10 unidades de una enzima de restricción *Pst*I (preparada por Takara Shuzo) y a continuación experimentar la reacción a 37°C durante 1 hora utilizando 10 unidades de una enzima de restricción *Dra*III (preparada por New England Biolabs). La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa y se recuperó un fragmento *Pst*I-*Dra*III de aproximadamente 2,7 kb.

25 A continuación, el fragmento *Pst*I-*Dra*III procedente del producto de la PCR y el fragmento *Pst*I-*Dra*III procedente del plásmido pKM2160Gal0 se ligaron utilizando solución I del kit de ligadura de ADN versión 2 (preparado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. DH5α de *Escherichia coli* (preparado por TOYOBO) se transformó utilizando la solución de plásmido ADN recombinante obtenida de esta manera, cada plásmido de ADN se preparó a partir de los clones de transformante y se analizaron las secuencias nucleotídicas utilizando el kit Big Dye Terminator versión 2 (preparado por Applied Biosystems). Como resultado de los análisis de la secuencia nucleotídica, se obtuvo un plásmido pKM2160Gal1 mostrado en la figura 2 que tiene la secuencia nucleotídica objetivo. *Escherichia coli* transformada con el plásmido pKM2160Gal1, DH5α/pKM2160Gal1 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 22 de agosto de 2001, como FERM BP-7710 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

35 En las modificaciones de Gly en la posición 42 a Asp y Gly en la posición 44 en Arg, se obtuvo un plásmido pKM2160Gal2 realizando el procedimiento básicamente similar al anterior, excepto que el ADN sintético para la transferencia génica que comprende la secuencia nucleotídica representadas por las SEC. ID. nº 24, (preparada por GENSET) y la RV del cebador M13 (Takara Shuzo) se utilizaron como cebadores de la PCR. *Escherichia coli* transformada con pKM2160Gal2, DH5α/pKM2160Gal2 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 22 de agosto de 2001, como FERM BP-7711 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

40 Además, se construyó la modificación de los tres restos anteriores de la manera siguiente. Aproximadamente 0,5 µg de cada uno de los plásmidos pKM2160Gal1 y pKM2160Gal2 obtenidos anteriormente se dejaron reaccionar a 37°C durante 1 hora utilizando 10 unidades de *Nhe*I (preparada por Takara Shuzo) y después se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora utilizando *Sc*I (preparada por Takara Shuzo). Se fraccionó la solución de reacción por electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron un fragmento *Nhe*I-*Sc*I de aproximadamente 1,3 kb procedente del plásmido pKM2160Gal1 y un fragmento de aproximadamente 2,0 kb procedente de pKM2160Gal2. Se ligaron los dos fragmentos resultantes utilizando solución I del kit de ligadura de ADN versión 2 (preparado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. DH5α de *Escherichia coli* (preparado por TOYOBO) se transformó utilizando la solución de plásmido ADN recombinante obtenida de esta manera, cada plásmido de ADN se preparó a partir de los clones de transformante y se analizaron las secuencias nucleotídicas utilizando el kit Big Dye Terminator versión 2 (preparado por Applied Biosystems). Como resultado de los análisis de la secuencia nucleotídica, se obtuvo un plásmido pKM2160Gal3 mostrado en la figura 3 que tiene la secuencia nucleotídica objetivo. *Escherichia coli* transformada con pKM2160Gal3, DH5α/pKM2160Gal3 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 22 de agosto de 2001, como FERM BP-7712 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

55 Después, se construyó un ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos HV0 de VH del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR diseñado en 1(1) del Ejemplo 1 utilizando la PCR de la forma siguiente.

60 En primer lugar, se diseñó una secuencia completa de aminoácidos del anticuerpo ligando la secuencia de aminoácidos con la secuencia señal secretora de la cadena H del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 en ratón representada por la SEC. ID. nº 15. A continuación, la secuencia de aminoácidos se convirtió en codones genéticos.

5 Cuando están presentes dos o más codones genéticos por cada resto de aminoácido, un codón genético correspondiente se determinaba teniendo en consideración la utilización del codón encontrada en secuencias nucleotídicas de genes de anticuerpo (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991). Los codones genéticos determinados se ligaron de manera que se diseñó una secuencia nucleotídica de ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la región V completa del anticuerpo, y añadiendo secuencias nucleotídicas de cebadores para la ampliación por la PCR (que incluyen secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción para la clonación en un vector para la utilización en la expresión del anticuerpo humanizado) se añadieron a su terminal 5' y al terminal 3'. La secuencia nucleotídica diseñada se dividió en un total de 6 secuencias nucleotídicas teniendo cada una aproximadamente 100 nucleótidos contando desde el terminal 5' (secuencias nucleotídicas adjuntas se diseñan de modo que tienen una secuencia complementaria de aproximadamente 20 nucleótidos en sus terminales) y 6 oligonucleótidos sintéticos de las SEC. ID. n° 16, n° 42, n° 43, n° 44, n° 45 y n° 21, se sintetizaron en órdenes recíprocos de una cadena transcrita y de una cadena complementaria (preparada por GENSET), y a continuación se obtuvo el pKM2160HV0 mediante el procedimiento similar a pKM2160Ga 10 descrito en este apartado. *Escherichia coli* transformada con el plásmido pKM2160HV0, DH5α/pKAG160HV0 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 27 de agosto de 2001, como FERM BP-7718 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

20 En la modificación de Thr en la posición 28 a Ile, se obtuvo un plásmido pKM2160HV1 que tiene la secuencia nucleotídica objetivo realizando la reacción similar a la construcción del plásmido pKM2160HV0 anterior, utilizando un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n° 69 en lugar de un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC ID n° 42, y utilizando un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica presentada por la SEC ID n° 46 en detrimento del oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n° 43. *Escherichia coli* transformada con pKM2160HV1, DH5α/pKM2160HV1 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 27 de agosto de 2001, como FERM BP-7719 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

30 En la modificación de Thr en la posición 28 a Ile y Ala en la posición 97 a Gly, se obtuvo un plásmido pKM2160HV3 que tiene la secuencia nucleotídica objetivo realizando la reacción similar a la construcción del plásmido pKM2160HV0 anterior, utilizando un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n° 69 en lugar de un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n° 42, utilizando un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n° 46 en lugar de un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n° 43 y utilizando un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n° 47 en lugar de un oligonucleótido que presenta la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. n° 45. *Escherichia coli* transformada con pKM2160HV3, DH5α/pKM2160HV3 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 27 de agosto de 2001, como FERM BP-7721 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

40 En la modificación de Ala en la posición 97 a Gly, se construyó el plásmido de la forma siguiente. Aproximadamente 0,5 µg de cada uno de los plásmidos pKM2160HV0 y pKM2160HV3 obtenidos se dejaron reaccionar a 37°C durante 1 hora utilizando 10 unidades de la enzima de restricción *NheI* (preparada por Takara Shuzo) y después se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora utilizando *Scal* (preparada por Takara Shuzo). Se fraccionó la solución de reacción por electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron un fragmento *NheI-Scal* de aproximadamente 1,3 kb procedente del plásmido pKM2160HV3 y un fragmento de aproximadamente 2,0 kb procedente de pKM2160HV0. Se ligaron los dos fragmentos resultantes utilizando solución I del kit de ligadura de ADN versión 2 (preparado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. DH5α de *Escherichia coli* (preparada por TOYOBO) se transformó utilizando la solución de plásmido ADN recombinante obtenida de esta manera, cada plásmido de ADN se preparó a partir de los clones de transformante y se analizaron las secuencias nucleotídicas utilizando el kit Big Dye Terminator versión 2 (preparado por Applied Biosystems). Como resultado de los análisis de la secuencia nucleotídica, se obtuvo un plásmido pKM2160HV2 que tiene la secuencia nucleotídica objetivo. *Escherichia coli* transformada con el plásmido pKM2160HV2, DH5α/pKM2160HV2 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 22 de agosto de 2001, como FERM BP-7720 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

(2) Construcción de ADNc que codifica la VL de anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR

60 Un ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos LV0 de VL del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR diseñado en 1(2) del Ejemplo 1 se construyó utilizando PCR similar al caso de VH de la forma siguiente. En este caso, la secuencia de la cadena L del anticuerpo KM2160 de ratón anti-CCR4 que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. n° 25, se utilizó como secuencia señal secretora.

En primer lugar, se sintetizaron 6 oligonucleótidos sintéticos que tienen las secuencias nucleotídicas descritas en las SEC. ID. n° 26, n° 27, n° 28, n° 29, n° 30 y n° 31 (preparados por GENSET). Se llevó a cabo la PCR

añadiendo cada oligonucleótido a 50 µl de una solución de reacción para dar una concentración final de 0,1 µM, y utilizando 0,4 µM de cebador RV de M13 (fabricado por Takara Shuzo) y 0,4 µM de cebador M4 de M13 (fabricado por Takara Shuzo) o cebador M3 de M13 (fabricados por GENSET) representado por la SEC. ID. nº 32 y 2,5 unidades de KOD polimerasa (preparadas por TOYOBO). La reacción se realizó en 30 ciclos, consistiendo cada ciclo en 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 74°C durante 60 segundos, y un ciclo posterior a 72°C durante 10 minutos. Se purificó la solución de reacción utilizando el kit de purificación de PCR QIA quick (fabricado por QIAGEN) y por último se disolvió en agua esterilizada. Se dejó reaccionar la solución de reacción utilizando 10 unidades de una enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de una enzima de restricción *XhoI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa y se recuperó un fragmento *EcoRI-XhoI* de aproximadamente 0,44 kb.

A continuación, 3 µg de plásmido pBluescript II SK(-) (preparado por Stratagene) se dejó reaccionar utilizando 15 unidades de una enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) y 15 unidades de una enzima de restricción *XhoI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa y se recuperó un fragmento *EcoRI-XhoI* de aproximadamente 2,95 kb.

A continuación, el fragmento *EcoRI-XhoI* procedente del producto de VL de la PCR del anticuerpo injertado con CDR anti-CCR4 y el fragmento *EcoRI-XhoI* procedente del plásmido pBluescript II SK(-) se ligaron utilizando solución I del kit de ligadura de ADN versión 2 (preparado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. DH5α de *Escherichia coli* (preparado por TOYOBO) se transformó utilizando la solución de ADN plásmido recombinante obtenida de esta manera, cada plásmido de ADN se preparó a partir de los clones de transformante y se analizaron las secuencias nucleotídicas utilizando el kit Big Dye Terminator versión 2 (preparado por Applied Biosystems). Como resultado de los análisis de la secuencia nucleotídica, se obtuvo un plásmido pKM2160LV4 representado en la figura 4 que tiene la secuencia nucleotídica objetivo. *Escherichia coli* transformada con el plásmido pKM2160LV0, DH5α/pKM2160LV0 de *Escherichia coli*, se ha depositado el 22 de agosto de 2001, como FERM BP-7713 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

A continuación, los restos de aminoácidos de FR diseñados en 1(3) del Ejemplo 1 se modificaron de la forma siguiente. Los codones genéticos para los restos de aminoácidos después de la modificación se modificaron para tener los codones genéticos encontrados en el anticuerpo KM2160 de ratón.

En la modificación de Ile en la posición 2 a Val, se obtuvo un plásmido pKM2160LV1 mostrado en la figura 5 que tiene la secuencia nucleotídica objetivo realizando la reacción similar a la construcción del plásmido pKM2160LV0 anterior, utilizando un oligonucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 33 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 27. *Escherichia coli* transformada con el plásmido pKM2160LV1, DH5α/pKM2160LV1 de *Escherichia coli* se ha depositado el 22 de agosto de 2001, como FERM BP-7714 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

De la misma manera, cada uno de los plásmidos objetivo pKM2160LV2 y pKM2160LV3, se obtuvo utilizando un oligonucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada por SEC. ID. nº 34 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. nº 27 cuando Val en la posición 3 se modificó en Leu, y utilizando un oligonucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. nº 35 en lugar del oligonucleótido que tiene la secuencia nucleotídica representada por la SEC. ID. nº 27 cuando se modifican aproximadamente los dos residuos. *Escherichia coli* transformada con el plásmido pKM2160LV2, DH5α/pKM2160LV2 de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* transformada con el plásmido pKM2160LV3, DH5α/pKM2160LV3 de *Escherichia coli* se ha depositado el 22 de agosto de 2001, como FERM BP-7715 y FERM BP-7716 respectivamente, en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

(3) Construcción del vector de expresión del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR

Se construyó un vector pKANTEX2160Gal0LV0 para la expresión del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR utilizando un vector para la expresión del anticuerpo humanizado pKANTEX93 (*Mol. Immunol.*, 37, 1035 (2000)) y los plásmidos pKM2160Gal0 y pKM2160LV0 obtenidos en 2(1) y (2) del Ejemplo 1 de la forma siguiente.

El plásmido pKM2160LV0 (3 µg) obtenido en el apartado 2(2) del Ejemplo 1 se dejó reaccionar con 10 unidades de una enzima de restricción *BsMFI* (preparada por New England Biolabs) a 55°C durante 1 hora y después con 10 unidades de una enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *BsMFI-EcoRI* de aproximadamente 0,44 kb.

A continuación, se dejaron reaccionar 3 µg del vector pKANTEX93 para la expresión del anticuerpo

humanizado con 10 unidades de una enzima de restricción *Bs*WI (preparada por New England Biolabs) a 55°C durante 1 hora y después con 10 unidades de una enzima de restricción *Eco*RI (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Bs*WI-*Eco*RI de aproximadamente 12,75 kb.

5 Después, el fragmento *Bs*WI-*Eco*RI resultante procedente del pKM2160LV0 y el fragmento *Bs*WI-*Eco*RI procedente del pKANTEX93 se ligaron utilizando la solución I del kit de ligadura de ADN versión 2 (preparada por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. DH5 α de *Escherichia coli* (preparada por TOYOBO) se transformó utilizando la solución de ADN plásmido recombinante obtenida de esta manera para de este modo obtener un plásmido pKANTEX2160LV0 mostrado en la figura 6.

10 A continuación, se dejaron reaccionar 3 μ g del plásmido pKM2160Gal0 obtenido en el apartado 2(1) del Ejemplo 1 con 10 unidades de una enzima de restricción *Ap*al (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y después con 10 unidades de una enzima de restricción *Not*I (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Ap*al-*Not*I de aproximadamente 0,47 kb.

15 A continuación, se dejaron reaccionar 3 μ g del plásmido pKANTEX2160LV0 obtenido en el anterior con 10 unidades de una enzima de restricción *Ap*al (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y después con 10 unidades de una enzima de restricción *Not*I (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa, y se recuperó un fragmento *Ap*al-*Not*I de aproximadamente 0,45 kb.

20 Después, el fragmento *Ap*al-*Not*I resultante procedente del pKM2160Gal0 y el fragmento *Ap*al-*Not*I procedente del plásmido pKANTEX2160LV0 se ligaron utilizando la solución I del kit de ligadura de ADN versión 2 (preparado por Takara Shuzo) según las instrucciones del fabricante. DH5 α de *Escherichia coli* (preparada por TOYOBO) se transformó utilizando la solución de ADN plásmido recombinante obtenida de esta manera, y cada ADN plásmido se preparó a partir de los clones transformados.

25 Como resultado de esto las secuencias nucleotídicas así obtenidas se analizaron utilizando el kit Big Dye Terminator versión 2 (preparado por Applied Biosystems), se confirmó que se obtuvo un vector de expresión pKANTEX2160Gal0LV0 mostrado en la figura 6 en el que el ADN objetivo se había clonado.

Además, se prepararon vectores de expresión utilizando el mismo procedimiento en la VH y VL en la que se modificaron los restos de aminoácidos de otra FR, incluyendo HV0.

30 Específicamente, se construyeron 22 vectores para expresión pKM2160Gal0LV0, pKM2160Gal0LV1, pKM2160Gal0LV2, pKM2160Gal0LV3, pKM2160Gal1LV1, pKM2160Gal1LV3, pKM2160Gal2LV1, pKM2160Gal2LV3, pKM2160Gal3LV1, pKM2160Gal3LV3, pKM2160HV0LV0, pKM2160HV0LV1, pKM2160HV0LV2, pKM2160HV0LV3, pKM2160HV1LV0, pKM2160HV1LV1, pKM2160HV1LV2, pKM2160HV1LV3, pKM2160HV2LV0, pKM2160HV2LV3, pKM2160HV3LV0 y pKM2160HV3LV3 combinando respectivamente pKM2160Gal0, pKM2160Gal1, pKM2160Gal2, pKM2160Gal3, pKM2160HV0, pKM2160HV1, pKM2160HV2 y pKM2160HV3
35 construidos en el apartado 2(1) del Ejemplo 1 con los pKM2160LV0, pKM2160LV1, pKM2160LV2 y pKM2160LV3 construidos en el apartado 2(2) del Ejemplo 1.

EJEMPLO 2

Expresión del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR en células animales:

40 1. Expresión temporal de un anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR utilizando células COS-7 (ATCC CRL 1651)

(1) Expresión temporal en células COS-7

45 En una placa de 6 pocillos (fabricada por Iwaki Glass), se distribuyeron 1 x 10⁵ células/ml de COS-7 a razón de 2 ml/pocillo utilizando medio DMEM (preparado por Gibco) que contenía FCS al 10% y se cultivó durante la noche a 37°C. Por cada 100 μ l de medio OPTIMEM (preparado por Gibco) se añadieron 3 μ l de reactivo FUGENETM 6 Transfer (preparado por Roche) y se añadieron además a esto 1 μ g de cada uno de los 22 vectores para la expresión del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR obtenidos en el artículo 2(3) del Ejemplo 1, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos para formar un complejo de ADN-liposoma. Se añadió gota a gota cada una de las soluciones de la reacción a las células COS-7 anteriores y se mezcló intensamente, seguido de cultivo a 37°C. Después del cultivo durante 72 horas, se recuperaron los sobrenadantes del cultivo y se evaluó la actividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR en los sobrenadantes.

50 (2) Evaluación de la reactividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR para CCR4 humano

La actividad de los sobrenadantes del cultivo resultantes de 22 anticuerpos se evaluó de la forma siguiente.

El Compuesto 1 (SEC. ID. nº 37) se seleccionó como un péptido CCR4 de la región extracelular humana

que puede reaccionar con el anticuerpo KM2760 anti-CCR4 híbrido producido por el transformante KM2760 (FERM BP-7054) preparado en el Ejemplo 2 de Referencia. Para utilizar el Compuesto 1 en la determinación de la actividad por ELISA, su conjugado con BSA (albúmina de suero bovino) (preparada por Nakalai Tesque) se preparó y se utilizó como antígeno. Es decir, se añadieron gota a gota 100 ml de 25 mg/ml de solución de SMCC (éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxílico) (preparado por Sigma)-DMSO a 900 ml de solución de PBS que contiene 10 mg de BSA en agitación fuerte y se agitó suavemente durante 30 minutos. A una columna de filtración en gel, tal como la columna NAP-10 o similar equilibrada con 25 ml de PBS, se aplicó 1 ml de la solución de reacción, y el eluido se eluyó con 1,5 ml de PBS y se utilizó como una solución de BSA-SMCC (se calculó la concentración de BSA por medición de la A_{280}). A continuación, se añadieron 250 ml de PBS a 0,5 mg de Compuesto 1 que se disolvió a continuación completamente añadiendo 250 ml de DMS, y a continuación la solución de BSA-SMCC (contenido en BSA:1,25 mg) se añadió en agitación fuerte y se agitó suavemente durante 3 horas. La solución de reacción se dializó durante la noche a 4°C frente a TBS, se añadió a ésta azida sódica para dar una concentración final de 0,05% y a continuación la mezcla resultante se filtró utilizando un filtro de 0,22 mm para dar una solución del Compuesto 1 en BSA.

En una placa ELISA de 96 pocillos (fabricada por Greiner), se distribuyeron 0,05 µg/ml del conjugado preparado a razón de 50 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4°C durante la noche para su adsorción. Después de lavar con PBS, PBS que contiene BSA al 1% (denominado en adelante "BSA al 1%-PBS") se añadió a ésta a razón de 100 µl/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los grupos activos restantes. Después de lavar cada pocillo con PBS que contiene Tween 20 al 0,05% (denominado en adelante "Tween-PBS"), se añadió un sobrenadante del cultivo del transformante a razón de 50 µl/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la reacción y posterior lavado de cada pocillo con Tween-PBS, se añadió una solución de anticuerpo anti IgG(γ) humana en cabra marcada con peroxidasa (preparada por American Qualex) diluida con 6.000 veces con BSA al 1%-PBS como solución secundaria de anticuerpo en fracciones de 50 µl/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción y posterior lavado con Tween-PBS, se añadió una solución del sustrato ABTS (una solución preparada disolviendo 0,55 g de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) amonio en 1 litro de tampón de citrato 0,1 M (pH 4,2) y añadiendo 1 µl/ml de peróxido de hidrógeno (justo antes de su utilización) a 50 µl/pocillo para desarrollar color, y la reacción se interrumpió 20 minutos después añadiendo solución de SDS al 5% a razón de 50 µl/pocillo. Después se midió la absorbancia a 415 nM.

Además, para comparar las concentraciones de un anticuerpo de IgG humana producido en los sobrenadantes del cultivo, se utilizó un anticuerpo de anti-IgG(γ) humana en cabra (preparado por American Qualex) diluido 2.000 veces con PBS se utilizó como antígeno.

Los resultados se presentan en la figura 7 y figura 8. Cada anticuerpo humano CCR4 injertado con CDR presentaba casi la misma actividad del anticuerpo KM2760 híbrido humano.

2. Expresión estable del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR utilizando células animales

Un anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR se expresó en células animales utilizando el vector de expresión del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR obtenido en el apartado 2(3) del Ejemplo 1 de la forma siguiente.

(1) Expresión estable en células YB2/0 de la estirpe celular del mieloma de rata (ATCC CRL 1581)

Cada plásmido para la expresión del anticuerpo humano injertado con CDR se construyó en estado lineal digiriéndolo con una enzima de restricción *Aat*I (preparada por TOYOBO), se introdujeron 10 µg del producto destilado en 4×10^6 células YB2/0 de la estirpe celular de mieloma de rata (ATCC CRL 1581) por electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), y a continuación las células se pusieron en suspensión en 40 ml de medio H-SFM (preparado por GIBCO-BRL) (enriquecido con 5% de suero bovino fetal (FBS)) y se distribuyeron a razón de 200 µl/pocillo en una placa de microvaloración de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Después de cultivar a 37°C durante 1 a 3 días en una incubadora con CO₂ al 5%, se añadió G418 (preparado por Nakalai Tesque) a ésta para dar una concentración de 1 mg/ml y se continuó el cultivo durante 1 a 2 semanas para obtener transformantes resistentes a G418.

Se recuperaron los sobrenadantes del cultivo procedentes de los pocillos en los que las colonias de los transformantes que presentan resistencia a G418 se volvieron confluentes, y se midieron las actividades de unión al antígeno de anticuerpos anti-CCR4 injertados con CDR humanos en los sobrenadantes del cultivo, se midieron por el ELISA presentado en el apartado 1(2) del Ejemplo 2.

A fin de aumentar la cantidad de expresión del anticuerpo utilizando un sistema de ampliación del gen dhfr, los transformantes en los pocillos en los que se encontró la expresión de un anticuerpo anti-CCR4 híbrido se pusieron en suspensión en los sobrenadantes del cultivo para dar una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml en medio H-SFM que contenía 1 mg/ml de G418 y metotrexato 50 nM (denominado en los sucesivos "MTX") que es un inhibidor de un producto génico dhfr dihidrofolato reductasa y se distribuyó en fracciones de 1 ml en una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Los transformantes que presentan resistencia al MTX 50 nM se produjeron cultivando a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con CO₂ al 5%. Cuando los transformantes se

volvieron confluentes en los pocillos, se midieron las actividades de fijación al antígeno de los anticuerpos anti-CCR4 humanos injertados con CDR en los sobrenadantes del cultivo por el ELISA mostrado en el apartado 1(2) del Ejemplo 2. Con respecto a los transformantes de los pocillos donde se encontró la expresión de los anticuerpos anti-CCR4 humanos injertados con CDR en los sobrenadantes del cultivo, se aumentó la concentración de MTX a 100 nM y a continuación a 200 nM por el procedimiento anterior, y se obtuvo finalmente un transformante que puede desarrollarse en el medio H-SFM que contenía 1 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y que puede también expresar en gran medida el anticuerpo anti-CCR4 humano injertado con CDR. Para el transformante obtenido de este modo, se llevó a cabo el aislamiento de una célula aislada (clonación) limitando el análisis por dilución para obtener un clon de la célula transformante que presenta la expresión más alta del anticuerpo anti-CCR4 humano injertado con CDR. Un anticuerpo que produce la célula KM8760 obtenido por transferencia génica de un vector de expresión pKANTEX2160Gal1LV3 y un anticuerpo que produce la célula KM8759 obtenida por transferencia génica de un vector de expresión pKANTEX2160Gal2LV3 se han depositado el 30 de julio de 2002, como FERM-BP-8130 y FERM-BP-8129, respectivamente, en la International Depository Authority en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

(2) Purificación del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR procedente del cultivo sobrenadante

Cuando aparecía un transformante que presentaba resistencia a G418 y se volvía confluyente, el medio se cambió de 300 a 1.100 ml de medio H-SFM que contenía GF21 de Daigo (preparado por Waco Pure Chemical Industries) a una concentración del 5%, seguido de cultivo durante 3 a 5 días. Cuando se volvió confluyente, se recuperó el sobrenadante del cultivo. Se obtuvo una proteína purificada purificando el anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR desde aproximadamente 300 a 1.100 ml de sobrenadante de cultivo utilizando la columna Prosep-A (preparada por Millipore) según las instrucciones adjuntas.

3. Evaluación de la actividad del anticuerpo anti-CCR4 purificado injertado con CDR

Se evaluó la actividad utilizando anticuerpos anti-CCR4 injertados con CDR procedentes de las células productoras de anticuerpos obtenidas introduciendo vectores para expresión de Gal0LV0, Gal0LV1, Gal0LV3, Gal1LV1, Gal1LV3, Gal2LV1, Gal2LV3, Gal3LV1 y Gal3LV3 en YB2/0 (denominados en adelante simplemente "Gal0LV0", "Gal0LV1", "Gal0LV3", "Gal1LV1", "Gal1LV3", "Gal2LV1", "Gal2LV3", "Gal3LV1" y "Gal3LV3", respectivamente).

(1) Determinación de la actividad de unión del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR para CCR4 humana (método ELISA)

La determinación se realizó de la misma manera que en el método descrito en artículo 1(2) del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la figura 9. Cada anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR presentaba casi la misma actividad que la del anticuerpo KM2760 híbrido humano.

(2) Reactividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR con la célula humana que expresa mucho a CCR4 (técnica del anticuerpo fluorescente)

En una placa de 96 pocillos, 2 x 10⁵ o más células CCR4/EL-4, se distribuyeron células con expresión elevada en CCR4 obtenidas en el Ejemplo 3 de Referencia. Se preparó una solución de anticuerpo diluyendo cada uno de los anticuerpos purificados y una inmunoglobulina humana (preparada por Welfide) para evitar que la tinción no específica dé concentraciones de 10 µg/ml y 3,75 mg/ml, respectivamente, con un tampón para FACS, y la solución de anticuerpo se añadió a razón de 100 µl/pocillo y se dejó reaccionar durante 30 minutos en hielo. Como referencia negativa, se utilizaron 10 µg/ml de un anticuerpo de la cadena del receptor IL-5 antihumano (documento WO 97/10354). Después de lavar dos veces con 200 µl/pocillo del tampón para FACS se añadió a razón de 50 µl/pocillo un anticuerpo anti-IgG humana marcado con PE (preparado por Coulter) diluido 100 veces. Después de la reacción en hielo a la sombra y posterior lavado tres veces con 200 µl/pocillo del tampón para FACS, el producto de la reacción se puso en suspensión en 500 µl del tampón para FACS y se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un citómetro de flujo. Los resultados se presentan en la figura 10. Todos los anticuerpos anti-CCR4 injertados con CDR presentaban casi la misma actividad que el anticuerpo KM2760 híbrido humano.

(3) Determinación de la actividad del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR para fijar el CCR4 humano (método BIAcore)

Para determinar la actividad de unión con mayor detalle, se determinó la actividad de unión de varios anticuerpos purificados utilizando BIAcore 2000 (preparado por BIACORE) de la forma siguiente. En este caso, se utilizó HBS-EP (preparado por BIACORE) como tampón para diluir las muestras y para la determinación. En primer lugar, se añadieron 5 µl de 0,05 µg/ml de la solución del Compuesto 1 como péptido parcial de CCR4 biotinilado a la punta de un detector SA (fabricado por BIACORE) a un caudal de 5 µl/minuto y se inmovilizó en la punta del detector.

A la punta del detector inmovilizado con el Compuesto 1 biotinilado preparado, se añadieron 20 µl de 4 µg/ml de solución de cada uno de los anticuerpos purificados a un caudal de 5 µl/minuto, y una vez terminada la adición, se controló la reacción de disociación durante 4 minutos y a continuación la superficie de la punta del

detector se regeneró añadiendo 5 µl de HCl 10 mM dos veces. De esta manera, se obtuvo una curva de la reacción de fijación (sensograma) para el Compuesto 1.

Los resultados se presentan en la figura 11. La ordenada representa una unidad de resonancia (RU) que significa un cambio de masa en la punta del detector. Por ejemplo, 1.000 UR corresponden a un cambio de masa de aproximadamente 1 ng/mm² de proteína. Se demostró que KM 2760 tiene una actividad de unión notablemente estable y elevada, porque presentaba una actividad de unión en función del tiempo para el Compuesto 1 y disociación de su enlace apenas se observó por la reacción de disociación. Por otra parte, cada uno de los anticuerpos anti-CCR4 injertados con CDR presentaban casi la misma reacción de disociación que el anticuerpo KM2760 híbrido humano, pero una ligera disminución de la actividad se encontró en la reacción del enlace al péptido parcial CCR4, Compuesto 1. El anticuerpo Gal0LV0 anti-CCR4 injertado con CDR en el que se injertó CDR sola presentaba la menor actividad de unión, y la actividad de unión aumentó mediante la modificación en el resto de aminoácido de FR. Los resultados demuestran que un anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR que mantiene la actividad de unión al antígeno y la especificidad de enlace de un anticuerpo de ratón puede prepararse injertando CDR del anticuerpo KM2160 de ratón a un anticuerpo FR humano apropiado, y que un anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR que tiene mayor actividad de unión puede prepararse identificando restos de aminoácidos de FR importantes para la actividad de unión basándose en la estructura tridimensional y similar de las regiones V del anticuerpo e injertándolas junto con la CDR. Cabe esperar que los anticuerpos anti-CCR4 injertados con CDR preparados en este ejemplo presenten gran actividad de unión a CCR4, tengan inmunogenicidad disminuida en seres humanos en comparación con la de los anticuerpos de ratón y también con la de los anticuerpos híbridos humanos, y tengan gran seguridad y efectos terapéuticos elevados.

2. Actividad citotóxica *in vitro* del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR (actividad ADCC)

Para evaluar la actividad citotóxica *in vitro* del anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR purificado obtenido en el apartado 2(2) del Ejemplo 2, se determinó su actividad ADCC de la forma siguiente.

(1) Preparación de la suspensión de células diana

Las células CCR4/EL-4 con expresión elevada en CCR4 humanas obtenidas en el Ejemplo 3 de Referencia se cultivaron en medio RPMI 1640 que contiene FCS al 10% (preparado por GIBCO) que contenía 0,5 mg/ml de G418 para dar una densidad de 1×10^6 células/0,5 ml, se añadieron a esto 1,85 MBq equivalentes de cromato sódico radioactivo (Na₂⁵¹CrO₄) (preparado por Daiichi Pure Chemicals) y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1,5 horas para las células marcadas con isótopos. Después de la reacción, se lavaron las células tres veces mediante su suspensión en medio RPMI 1640 y centrifugación, se volvieron a poner en suspensión en el medio y a continuación se incubaron en hielo a 4°C durante 30 minutos para liberar espontáneamente la sustancia radioactiva. Después de la centrifugación, se añadieron a esto 5 ml de medio RPMI 1640 que contenía 10% de FCS para dar una densidad de 2×10^5 células/ml como suspensión de células diana.

(2) Preparación de la suspensión de células efectoras

Se recolectó sangre periférica humana sana (60 ml) utilizando una jeringuilla que contenía 200 unidades (200 µl) de una inyección de heparina sódica (preparada por Takeda Pharmaceutical). Toda esta cantidad se rellenó hasta 120 ml diluyéndola dos veces con el mismo volumen de solución salina fisiológica (preparada por Otsuka Pharmaceutical). Se distribuyó Lymphoprep (preparada por NYCOMED) en 5 ml en 12 tubos de centrifugación de 15 ml de capacidad (fabricados por Sumitomo Bakelite), la sangre periférica diluida se estratificó sobre éstas a razón de 10 ml, y la mezcla se centrifugó a 800 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las fracciones de PBMC entre la capa de plasma sanguíneo y la capa de Lymphoprep se recolectaron en todos los tubos de centrifugación, se pusieron en suspensión en medio RPMI 1640 que contenía FCS al 1% (denominado en adelante "FCS al 1%-RPMI"), se lavó dos veces por centrifugación a 400 x g y 4°C durante 5 minutos y a continuación se volvió a poner en suspensión hasta dar una densidad de 5×10^6 células/ml que debe utilizarse como células efectoras.

(3) Determinación de la actividad ADCC

La suspensión de células diana preparada en (1) se distribuyó a razón de 50 µl (1×10^4 células/pocillo) en los pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U (fabricada por Falcon). A continuación, la suspensión de células efectoras preparadas en (2) se distribuyó a razón de 100 µl (5×10^5 células/pocillo, la relación de células efectoras a células diana fue de 50:1). A continuación, se añadió cada anticuerpo anti-CCR4 híbrido para dar una concentración final de 0,1 ng/ml hasta 10 µg/ml y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 4 horas. Después de la reacción, se centrifugó la placa y se midió con un contador de γ la cantidad de ⁵¹Cr en 100 µl del sobrenadante en cada pocillo. La cantidad de ⁵¹Cr disociado espontáneamente se calculó de la misma manera que anteriormente utilizando el medio solo en lugar de la suspensión de células efectoras y de la solución de anticuerpo y midiendo la cantidad de ⁵¹Cr en el sobrenadante. La cantidad de ⁵¹Cr total disociado se calculó de la misma manera que anteriormente añadiendo el medio solo en lugar de la solución de anticuerpo, y ácido clorhídrico 1 N en lugar de la suspensión de células efectoras, y midiendo la cantidad de ⁵¹Cr en el sobrenadante. Se calculó la actividad ADCC mediante la siguiente ecuación:

$$\text{actividad ADCC (\%)} = \frac{\begin{aligned} &(\text{cantidad de } ^{51}\text{Cr en el sobrenadante de la muestra}) \\ &-(\text{cantidad de } ^{51}\text{Cr liberado espontáneamente}) \end{aligned}}{\begin{aligned} &(\text{cantidad de } ^{51}\text{Cr total}) \\ &-(\text{cantidad de } ^{51}\text{Cr liberado espontáneamente}) \end{aligned}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la figura 12. Como se muestra en la figura 12, el anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR presentaba concentración de anticuerpos dependiente de la potente actividad citotóxica.

5. Efecto de la producción inhibitoria de citocina de la PBMC humana

Se examinó un efecto de producción de citocina inhibitoria utilizando un anticuerpo Gal1LV3 anti-CCR4 injertado con CDR y un anticuerpo híbrido KM2760. Se utilizó un anticuerpo anti-IL-5R como referencia negativa.

Se separó PBMC de la misma manera que en el apartado 4(2) del Ejemplo 2 y se distribuyó a razón de 1×10^6 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U, se añadió a ésta un anticuerpo para evaluación para proporcionar una concentración final de $1 \mu\text{g/ml}$, y el volumen total se ajustó a $200 \mu\text{l/pocillo}$. Se provocó la actividad ADCC cultivando conjuntamente a 37°C durante 24 horas en una corriente de CO_2 al 5%. Después del cultivo, se retiraron $100 \mu\text{l}$ de sobrenadante, se añadieron a éste $100 \mu\text{l}$ de un medio que contiene 100 ng/ml de PMA (miristato acetato de forbol) y $2 \mu\text{g/ml}$ de ionomicina (preparada por SIGMA) para dar una concentración final de 50 ng/ml de PMA y $1 \mu\text{g/ml}$ de ionomicina, y se estimularon las células para inducir la producción de citocina. Después de la introducción de cada estimulante, se realizó el cultivo durante 24 horas, se recuperaron los sobrenadantes del cultivo y se determinaron IL-4, IL-13 e interferón (IFN)- γ utilizando un kit para análisis de citocina (preparado por Biosource). Se calculó la relación de inhibición de la producción definiendo cada producción de citocina en ausencia de anticuerpo como relación de inhibición del 0%, y los resultados de presentan en la figura 13. Como se muestra en la figura 13, de manera similar al anticuerpo híbrido KM2760, el grupo Gal1LV3 añadido al anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR inhibió de manera significativa la producción de las citocinas IL-4 e IL-13 de Th2 pero tuvieron poca influencia sobre el IFN- γ y de la citocina del Th1.

Los resultados demuestran que cada anticuerpo anti-CCR4 injertado con CDR puede reducir o eliminar los linfocitos Th2 expresados en CCR4 activando células efectoras humanas de manera eficaz y, como resultado, tiene un efecto de inhibición de la producción de citocinas de Th2 procedentes de los linfocitos Th2 y por consiguiente sirve para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades inmunitarias humanas mediadas por Th2 tales como el asma bronquial, la dermatitis atópica y similares.

6. Análisis de reactividad para plaquetas humanas

(1) Separación de plaquetas humanas

Se añadió un volumen de 1/10 de citrato sódico al 3,2% a una muestra de sangre recogida de una persona sana y se mezcló intensamente. La sangre se distribuyó a razón de 5 ml en tubos de 15 ml de capacidad (fabricados por Greiner) y se centrifugó a $90 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron más a $1.950 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de descartar el sobrenadante, los sedimentos se pusieron en suspensión en un tampón para FACS y se centrifugó a $1.190 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente para lavar los sedimentos. Los sedimentos se volvieron a poner en suspensión en un tampón para FACS y se centrifugaron de la misma manera, y a continuación las plaquetas en forma de sedimento se ajustaron hasta dar una densidad de aproximadamente 1×10^7 sedimentos/ml utilizando el tampón para FACS.

(2) Tinción de plaquetas

Cada uno de los anticuerpos anti-CCR4 purificados injertados con CDR humana obtenidos en el apartado 3 en el Ejemplo 2 se añadió a $100 \mu\text{l}$ de la suspensión de plaquetas obtenida en el apartado 6(1) para proporcionar una concentración de $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Como referencias comparativas, cada uno de los anticuerpos KM2760 híbridos humanos anti-CCR4 y un anticuerpo 1G1 de anticuerpo antiirratón (preparado por Pharmingen) se dejó reaccionar con 100 ml de la suspensión de plaquetas a la misma concentración. Después de la reacción, se añadieron 2 ml del tampón para FACS a cada uno de los tubos de 15 ml de capacidad, y la mezcla se agitó y a continuación se lavó por centrifugación a $840 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . Después de descartar el sobrenadante, se realizó de nuevo la misma operación. Un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con PE (preparado por Coulter) diluido 50 veces con el tampón para FACS se añadió a $20 \mu\text{l}$ del tubo que contiene una muestra que se hizo reaccionar con cada uno de los anticuerpos humanos injertados con CDR y KM2760 y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Con respecto al tubo que contiene la muestra que reaccionó con el anticuerpo 1G1, se añadieron $20 \mu\text{l}$ más de un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con PE diluido 50 veces (preparado por DAKO) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad.

Después de la reacción, se añadieron 2 ml del tampón para FACS a cada tubo, seguido de agitación, y la

mezcla se lavó por centrifugación a 840 x g durante 5 minutos a 4°C. Después de descartar sobrenadante, se volvió a realizar la misma operación. Después de poner en suspensión el residuo en 500 µl del tampón para FACS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un citómetro de flujo EPICS XL-MCL (fabricado por Beckman Coulter).

5 Los resultados se muestran en la figura 14. El anticuerpo 1G1 como referencia comparativa, presentaba reactividad con las plaquetas, pero todos los anticuerpos humanos anti-CCR4 injertados con CDR no presentaban reactividad específica con las plaquetas humanas del mismo modo que el anticuerpo KM2760 híbrido humano anti-CCR4.

EJEMPLO 1 DE REFERENCIA

10 Preparación de célula de hibridoma que produce anticuerpo monoclonal anti-CCR4 de ratón:

Se produjeron células de hibridoma que producen anticuerpo M2160 monoclonal anti-CCR4 de ratón (*Int. Immunol.*, 11, 81 (1999)) según el siguiente procedimiento.

(1) Preparación del antígeno

15 La secuencia (SEC. ID. nº 48) de aminoácidos de la proteína CCR4 humana (denominada en adelante "hCCR4") se analizó utilizando Genetyx Mac y se seleccionó Compuesto 2 (SEC. ID. nº 36) como secuencia parcial considerada apropiada como antígeno entre las partes que tienen gran hidrofilia, terminal N y terminal C.

(2) Preparación de inmunógeno

20 El péptido parcial hCCR4 obtenido en (1) del Ejemplo 1 de Referencia se utilizó como inmunógeno después de preparar su conjugado con KLH (Calbiochem) por el siguiente procedimiento para aumentar su inmunogenicidad. Específicamente, KLH se disolvió en PBS hasta dar una concentración de 10 mg/ml, se añadió gota a gota a ésta 1/10 de volumen de 25 mg/ml de MBS (preparado por Nakalai Tesque) y la mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos. Se eliminó el MBS libre mediante una columna de filtración en gel tal como la columna Sephadex G-25 que se había equilibrado previamente con PBS o similar, y 2,5 mg del KLH-MB resultante se mezcló con 1 mg del péptido disuelto en tampón de fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de la reacción se dializó la mezcla frente a PBS.

(3) Inmunización de animal y producción de células productoras de anticuerpos

30 A ratones hembra de 5 semanas (Balb/c), se administraron 100 µg del conjugado péptido-KLH preparado en el apartado (2) del Ejemplo 1 de Referencia junto con 2 mg de gel de aluminio y 1×10^9 células de vacuna antiosferínica (preparada por Chiba Serum Institute) y 2 semanas después, se administraron 100 µg del conjugado una vez a la semana un total de 4 veces. Se extrajo una muestra de sangre de cada animal del plexo venoso del fondo del ojo, se examinó su valor en el suero por inmunoanálisis enzimático descrito a continuación, y se extirpó el bazo 3 días después de la inmunización final de un ratón que presentaba un valor de anticuerpos suficiente. Se extirpó el bazo de un ratón el 3^{er} día después de la administración final y se cortó en piezas en MEM (preparado por Nissui Pharmaceutical) y las células se desligaron utilizando un par de fórceps y se centrifugaron (1.200 rpm, 5 minutos), se eliminó el sobrenadante, seguido de tratamiento con 3 ml de un tampón de Tris-cloruro amónico (pH 7,65) durante 1 a 2 minutos para eliminar eritrocitos. Las células restantes se lavaron tres veces más con MEM y se utilizaron para la fusión celular.

(4) Preparación de célula de mieloma de ratón

40 Se cultivó una estirpe de células de mieloma de ratón resistente a 8-azaguanina, P3X63Ag8U.1 (ATCC CRL-1597, denominada en adelante "P3-U1") y se utilizó como línea original en la fusión celular.

(5) Preparación de células de hibridoma

45 Las células de bazo y las células de mieloma obtenidas en los apartados (3) y (4) en el Ejemplo 1 de referencia se mezclaron en un relación de 10:1, seguido de centrifugación (1.200 rpm, 5 minutos), para eliminar el sobrenadante, se agregaron 0,5 ml de una solución en polietilenglicol (solución que contenía 2 g de polietilenglicol-1000, 2 ml de MEM y 0,7 ml de DMSO) a las células precipitadas de este modo por 10^8 de esplenocitos a 37°C seguido de suspensión intensa. Después, 1 a 2 ml de MEM se añadieron varias veces a intervalos de 1 a 2 minutos y se ajustó el volumen final a 50 ml con MEM. Después de eliminar el sobrenadante por centrifugación (900 rpm, 5 minutos) el precipitado se puso en suspensión en 100 ml de medio HAT, se distribuyó en 100 µl/pocillo en una placa de microvaloración de 96 pocillos (preparada por Sumimoto Bakelite) seguido de cultivo en una incubadora con CO₂ al 5% a 37°C durante 10 a 14 días. Utilizando los pocillos en los que se observó la propagación de la célula fusionada, se determinó la actividad de unión al péptido parcial hCCR4 (Compuesto 2) en el sobrenadante del cultivo por ELISA (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cap. 14 (1988), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1966), etc.). Cada pocillo en el que se confirmó la actividad se clonó un total de 2 veces de la dilución limitativa, una vez cambiando el medio por el medio HT y a continuación cambiando el medio por el medio normal. De esta manera, se obtuvo una célula de hibridoma KM2160

55

que produce el anticuerpo KM2160 de ratón. KM2160 reaccionó específicamente con el péptido parcial hCCR4 (Compuesto 2).

EJEMPLO 2 DE REFERENCIA

Preparación del anticuerpo híbrido anti-CCR4:

5 1. Aislamiento y análisis de ADNc que codifica la región UV del anticuerpo anti-CCR4 de ratón:

(1) Preparación de ARNm de la célula de hibridoma que produce el anticuerpo anti-CCR4 de ratón

10 Se preparó un ARNm procedente de la célula KM2160 de hibridoma descrita en el Ejemplo 1 de Referencia. Se prepararon aproximadamente 48 µg de ARNm procedente de 8×10^7 células de la célula KM2160 de hibridoma utilizando un kit para preparación de ARNm, Fast Track mRNA Isolation Kit (preparado por Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

(2) Preparación de un banco de ADNc con cadena H y cadena L de anticuerpo anti-CCR4 de ratón

15 Se sintetizó ADNc con adaptadores *EcoRI-NotI* en ambos terminales procedente de 5 µg del ARNm del KM2160 obtenido en el apartado 1(1) del Ejemplo 2 de Referencia utilizando el kit para ADNc (preparado por Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante. El ADNc preparado de este modo se disolvió en 20 µl de agua esterilizada y se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa, y aproximadamente 1,5 kb de fragmentos de ADNc que corresponden a la cadena H del anticuerpo tipo IgG y aproximadamente 1,0 kb de fragmentos de ADNc correspondientes a la cadena L del tipo κ se recuperaron respectivamente utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (preparado por QIAGEN). A continuación, utilizando el kit tratado con λZaPII Predigested *EcoRI*-CIAP (preparado por Stratagene), cada 0,1 µg de los fragmentos de ADNc de aproximadamente 1,5 kg y 0,1 µg de los fragmentos de ADNc de aproximadamente 1,0 kb se ligaron a 1 µg del vector λZAPII que se había digerido con una enzima de restricción *EcoRI* y se desfosforiló el terminal con fosfatasa alcalina de intestino de vaca según las instrucciones del fabricante. Dentro del fago λ, 2,5 µl de cada solución de reacción después de la ligadura se encapsularon utilizando GigapackIII Gold Packaging Extract (preparado por Stratagene según las instrucciones del fabricante) y a continuación se infectó XL1-Blue de *Escherichia coli* (*Biotechniques*, 5, 376 (1987)) con una cantidad apropiada del fago para obtener $9,3 \times 10^4$ de clones de fago como el banco de ADNc con cadena H de KM2160 y $7,4 \times 10^4$ de clones de fago como banco de ADNc con cadena L. Después, cada fago se fijó en un filtro Hybond-N+ de membrana de nailon (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante.

(3) Clonación de los ADNc con cadena H y cadena L del anticuerpo anti-CCR4 de ratón

20 Utilizando el sistema de marcado y detección de ácido nucleico directo ECL (preparado por Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante, los clones en los filtros de membrana de nilón del banco de ADNc de cadena H KM2160 y el banco de ADNc de la cadena L preparado en el apartado 1(2) del Ejemplo 2 de Referencia se detectaron utilizando ADNc de la región C de un anticuerpo de ratón (la cadena H es un fragmento *BamHI-EcoRI* de ADNc de C γ de ratón (*EMBO J.*, 3, 2047 (1984)), la cadena L es un fragmento *HpaI-EcoRI* de ADNc de C κ (*Cell*, 22, 197 (1980)) como sonda, y los clones de fago unidos fuertemente a la sonda se obtuvieron como 10 clones para cada cadena H y cada cadena L. A continuación, se convirtió cada clon de fago en plásmido por el procedimiento de escisión *in vivo* utilizando el kit de clonación λZAPII según las instrucciones del fabricante (preparado por Stratagene), utilizando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (preparado por PE Biosystems), la secuencia nucleotídica del ADNc contenida en cada plásmido obtenido de esta manera se analizó con un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 del mismo fabricante según las instrucciones del fabricante. Como resultado, se obtuvo un plásmido pKM2160H4 que contiene un ADNc funcional completo de cadena H y un plásmido pKM2160L6 que contiene un ADNc funcional completo de cadena L, en el que está presente una secuencia ATG considerada que es el codón de iniciación en el terminal 5' del ADNc.

(4) Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo anti-CCR4 de ratón

25 Una secuencia de nucleótidos completa de la región V de la cadena H contenida en el plásmido pKM2160H4, una secuencia de aminoácidos completa de la región V de la cadena H deducida de ésta, una secuencia nucleotídica completa de la región V de la cadena L contenida en el plásmido pKM2160L6 en una secuencia de aminoácidos completa de la región V de la cadena L deducida de la misma están representadas por las SEC. ID. nº 61, nº 62, nº 63 y nº 64, respectivamente. Basándose en la comparación con los datos de las secuencias de conocidos anticuerpos de ratón (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991) y la comparación con los resultados del análisis de las secuencias de aminoácidos con terminal N de la cadena H y la cadena L del anticuerpo KM2160 de ratón anti-CCR4 purificado realizadas utilizando un secuenciador de proteínas (PPSQ-10, fabricado por Shimadzu), se descubrió que cada ADNc aislado de este modo es un ADNc completo que codifica el anticuerpo KM2160 anti-CCR4 de ratón que contiene secuencias señal secretoras que son aminoácidos de las posiciones 1 a 19 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 15 en la cadena H y en los aminoácidos de las posiciones 1 a 19 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 25 en la cadena L.

A continuación, se examinó la novedad de las secuencias de aminoácidos de las regiones V de la cadena H y la cadena L del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 de ratón. Utilizando el paquete GCG (versión 9.1, elaborado por Genetics Computer Group) como sistema analizador de secuencias, se buscaron las bases de datos de las secuencias de aminoácidos de conocidas proteínas por el método BLAST (*Nucleic. Acids Res.*, 25, 3389 (1997)). Como resultado, no se encontraron secuencias completamente coincidentes tanto para la cadena H como la cadena L, de modo que se confirmó que la región V de la cadena H y la región V de la cadena L del anticuerpo KM2160 de ratón anti-CCR4 son nuevas secuencias de aminoácidos.

Además, se identificaron las CDR de la región V de la cadena H y de la región V de la cadena L del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 de ratón por comparación con las secuencias de aminoácidos de anticuerpos conocidos. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 en la región V de la cadena H del anticuerpo KM2160 anti-CCR4 de ratón están representadas por las SEC. ID. nº 1, nº 2 y nº 3, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 en la región V de la cadena L por las SEC. ID. nº 5, nº 6 y nº 7, respectivamente.

2. Expresión estable del anticuerpo híbrido anti-CCR4 utilizando células animales

(1) Construcción del vector pKANTEX2160 para la expresión del anticuerpo anti-CCR4 híbrido

Se construyó un vector pKANTEX2160 para la expresión del anticuerpo anti-CCR4 híbrido de la forma siguiente, utilizando un vector pKANTEX93 para la expresión del anticuerpo humanizado que expresa una IgG1 humana y el anticuerpo tipo κ y los plásmidos pKM2160H4 y pKM2160L6 obtenidos en el apartado 1(3) del Ejemplo 2 de Referencia.

Un ADN sintético que tiene las secuencias nucleotídicas representadas por las SEC. ID. nº 65 y nº 66 se diseñó a fin de obtener el ADNc de la región V de la cadena H de KM2160 por PCR y otro ADN sintético que tiene las secuencias nucleotídicas representadas las SEC. ID. nº 67 y nº 68 para obtener el ADNc de la región V de la cadena L. Cada ADN sintético contiene una enzima de restricción que reconoce la secuencia en su terminal 5' para su clonación en pKANTEX93, y la síntesis del ADN se encomendó a Genset Inc. El plásmido pKM2160H4 (20 ng) obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2 de Referencia se añadió a un tampón que contenía 50 μ l del tampón nº 1 de PCR acoplado a la KOD ADN polimerasa (preparada por TOYOBO), las dNTP 0,2 mM, cloruro de magnesio 1 mM y 0,5 μ M del ADN sintético que tiene las secuencias nucleotídicas representadas por las SEC. ID. nº 11 y nº 12, y la mezcla se calentó a 94°C durante 3 minutos. Después se añadieron 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa (elaborada por TOYOBO), la mezcla se sometió a 25 ciclos de reacción consistiendo cada ciclo de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, a 58°C durante 30 segundos y a 74°C durante 1 minuto, utilizando un ciclador térmico de ADN GeneAmp PCR System 9600 (fabricado por PERKIN ELMER). De la misma manera, 20 ng del plásmido pKM2160L6 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2 de Referencia, se añadieron a un tampón que contenía 50 μ l de tampón nº 1 de PCR acoplado a la KOD ADN polimerasa (elaborada por TOYOBO), las dNTP 0,2 mM, cloruro de magnesio 1 mM y 0,5 μ M del ADN sintético que tiene las secuencias nucleotídicas representadas por las SEC. ID. nº 67 y nº 68, y se realizó la PCR de la misma manera descrita anteriormente. La solución de reacción (10 μ l) se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y a continuación un producto de PCR de la región V de la cadena H de aproximadamente 0,46 kb y un producto de PCR de la región V de la cadena L de aproximadamente 0,43 kb se recuperaron de cada uno utilizando el kit de extracción en gel de QIAquick (elaborado por QIAGEN).

A continuación, 0,1 μ g del ADN obtenido digiriendo un plásmido pBluescript SK(-) (preparado por Stratagene) con una enzima de restricción *Sma*I (preparada por Takara Shuzo) y aproximadamente 0,1 μ g de cada uno de los productos de la PCR obtenidos anteriormente se añadieron a agua esterilizada para dar un volumen final de 7,5 μ l, y 7,5 μ l de la solución I del kit de ligadura de ADN de TAKARA versión 2 (preparado por Takara Shuzo) y 0,3 μ l de la enzima de restricción *Sma*I se añadieron a ésta, y la mezcla se dejó reaccionar a 22°C durante la noche. Utilizando la solución del ADN plásmido recombinante resultante, se transformó DH5 α de *E. coli* (preparado por TOYOBO). Cada ADN plásmido se preparó a partir de los clones transformantes y se sometió a la reacción utilizando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (preparado por PE Biosystems), según las instrucciones del fabricante, y se analizó con un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 del mismo fabricante. De este modo, se obtuvieron los plásmidos pKM2160VH41 y pKM2160VL61 mostrados en la figura 15 con las secuencias nucleotídicas deseadas.

A continuación, 3 μ g del vector pKANTEX93 para expresión del anticuerpo humanizado y 3 μ g del pKM2160VH41 obtenidos anteriormente se añadieron a un tampón que contenía 30 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), cloruro de magnesio 10 mM y DTT 1 mM, 10 unidades de la enzima de restricción *Apal*I (preparada por Takara Shuzo) se añadieron a ésta, y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora. La solución de reacción se sometió a precipitación con etanol, y el precipitado resultante se añadió a un tampón que contenía 10 μ l de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), cloruro sódico 100 mM, cloruro de magnesio 10 mM, DTT 1 mM, 100 μ g de BSA y Triton X-100 al 0,01%. 10 unidades de la enzima de restricción *Not*I (preparada por Takara Shuzo) se añadieron a ésta, y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron aproximadamente 12,75 kb y aproximadamente 0,44 kb de fragmentos *Apal*-*Not*I de pKANTEX93 y pKM2160VH41, respectivamente. Los dos fragmentos obtenidos de este modo se ligaron utilizando kit de ligadura de ADN versión 2 de TAKARA según las instrucciones del fabricante y DH5 α de *E. coli* (elaborado por TOYOBO) se

transformó utilizando la solución de ADN del plásmido recombinante resultante. Cada ADN plásmido se preparó a partir de los clones transformantes y se confirmó por un tratamiento de la enzima de restricción para obtener de este modo un plásmido pKANTEX2160H mostrado en la figura 16, en la que se habían insertado aproximadamente 0,44 kb del fragmento *Apal-NoI* deseado.

5 A continuación, 3 µg del vector pKANTEX2160H y 3 µg del pKM2160VL61 obtenidos anteriormente se añadieron a un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), cloruro sódico 100 mM, cloruro de magnesio 10 mM, DTT 1 mM y 100 µg/ml de BSA, se ajustó la solución para dar un volumen total de 30 µl, se añadieron a ésta 10 unidades de una enzima de restricción *Bs*MI (preparada por New England Biolabs), y la mezcla se dejó reaccionar a 55°C durante 1 hora. A continuación, se añadió a ésta una enzima de restricción *Eco*RI (preparada por Takara Shuzo), y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se fraccionó por electroforesis en gel de agarosa, y se recuperaron aproximadamente 13,20 kb y aproximadamente 0,41 kb de fragmentos *Eco*RI-*Bs*MI de pKANTEX2160H y pKM2160VL61, respectivamente. Los dos fragmentos obtenidos de este modo se ligaron utilizando kit de ligadura de ADN versión 2 de TAKARA según las instrucciones del fabricante y DH5α de *E. coli* (elaborado por TOYOBO) se transformó utilizando la solución de ADN del plásmido recombinante resultante. Cada ADN plásmido se preparó a partir de los clones transformantes y se confirmó por un tratamiento de la enzima de restricción para obtener de este modo un plásmido pKANTEX2160 mostrado en la figura 17, en la que se habían insertado aproximadamente 0,41 kb del fragmento *Eco*RI-*Bs*MI deseado. Cuando el plásmido se sometió a la reacción utilizando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (preparado por PE Biosystems), según las instrucciones del fabricante, y se analizó la secuencia nucleotídica con un secuenciador de ADN ABI PRISM 377 del mismo fabricante, se confirmó que el plásmido deseado que se obtenía el plásmido deseado en el que se había clonado el ADNc que codifica las regiones V de la cadena H y de la cadena L de KM2160.

(2) Expresión estable del anticuerpo anti-CCR4 híbrido utilizando células animales

El anticuerpo anti-CCR4 híbrido se expresó en células animales como se describe a continuación utilizando el vector pKANTEX2160 para la expresión del anticuerpo anti-CCR4 híbrido obtenido en el apartado 2(1) del Ejemplo 2 de Referencia.

El plásmido pKANTEX2160 se convirtió en una forma lineal digiriendo con la enzima de restricción *Aat*II (preparada por TOYOBO) y 10 µg del mismo se introdujeron en 4×10^6 células de la estirpe YB2/0 de células de mieloma de rata (ATCC CRL 1662) por electroporación (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), y las células se pusieron en suspensión en 40 ml de medio H-SFM (preparado por GibCO-BRL) (enriquecido con FCS al 5%) y se distribuyó en 200 µl/pocillo en una placa de microvalorador de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Veinticuatro horas después de la incubación a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%, se añadió G418 para dar una concentración de 1 mg/ml, seguido de cultivo durante 1 a 2 semanas. Se recuperó un sobrenadante del cultivo procedente de un pocillo en el que apareció una colonia de transformante resistente a G418 y se volvió confluyente, y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo híbrido anti-CCR4 en el sobrenadante del cultivo, se midió por ELISA presentado en el apartado 2(3) del Ejemplo 2 de Referencia (se utilizó anticuerpo anti-IgG(γ) humana en cabra marcado con peroxidasa como anticuerpo secundario).

Con el fin de aumentar la cantidad expresada del anticuerpo utilizando un sistema de ampliación del gen *dhfr*, los transformantes en un pocillo en el que se encontró la expresión del anticuerpo anti-CCR4 híbrido se puso en suspensión en el sobrenadante del cultivo hasta dar una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml en medio H-SFM que contenía 1 mg/ml de G418 y metotrexato 50 nM (denominado en adelante "MTX" fabricado por Sigma) que es un inhibidor de un producto génico *dhfr* dihidrofolato reductasa, y la suspensión se distribuyó en fracciones de 1 ml en los pocillos de una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). La mezcla se cultivó a 37°C durante 1 a 2 semanas en una incubadora con CO₂ al 5%, de manera que se produjo un transformante que presenta una resistencia a MTX 50 nM. Cuando el transformante se volvió confluyente en un pocillo, se midió la actividad de unión al antígeno del anticuerpo híbrido anti-CCR4 en el sobrenadante del cultivo por el ELISA mostrado en el apartado 2(3) del Ejemplo 2 de Referencia. En cuanto a los transformantes de los pocillos donde se encontró la expresión del anticuerpo anti-CCR4 híbrido en el sobrenadante del cultivo, la concentración de MTX aumentó hasta 100 nM y a continuación a 200 nM por el mismo procedimiento para obter finalmente un transformante que puede desarrollarse en el medio H-SFM que contenía 1 mg/ml de G418 y MTX 200 nM y que puede también expresar en gran medida el anticuerpo anti-CCR4 híbrido. El transformante obtenido de este modo se se sometió a aislamiento de una célula aislada (clonación) en dos veces de análisis limitado por dilución, y un clon transformante que presenta la expresión más alta del anticuerpo anti-CCR4 híbrido se denominó KM2760. La cantidad expresada por KM2760 de anticuerpo híbrido anti-CCR4 fue aproximadamente de 5 µg/10⁶ células/24 horas. Además, la región C de la cadena H en el anticuerpo de KM2760 pertenece a la subclase de IgG1 humana. KM2760 se ha depositado internacionalmente como FERM-BP-7054 el 24 de febrero de 2000, en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industry (denominación actual: International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) (Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Prefectura de Ibaraki, Japón (dirección actual: AIST Tsukuba Central, 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón)).

EJEMPLO 3 DE REFERENCIA

Creación de la célula con elevada expresión de hCCR4

(1) Construcción del vector de expresión CAG-pcDNA3 para células animales

Se construyó un vector de expresión como se describe a continuación produciendo un vector de expresión (CAG-pcDNA3) en el que la región activadora de un vector de expresión para células animales, pcDNA3 (preparado por INVITROGEN), se cambió desde el activador del citomegalovirus (CMV) hasta el activador de CAG (activador AG (actina β de pollo modificada) con potenciador de CMV-IE) e insertando el gen para CCR4 en el vector.

Se dejó reaccionar el pcDNA3 (5 μ g) con una enzima de restricción *Nru*I (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora, y a continuación se recuperaron los fragmentos de ADN por precipitación en etanol. A continuación, se dejaron reaccionar con una enzima de restricción *Hind*III (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y a continuación se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa para recuperar un fragmento de ADN de aproximadamente 5,8 kb que no contenían ninguna región activadora de CMV. El plásmido CAG-pBluescript II KS(+) (3 μ g) con la región activadora de CAG (*Nuc. Acid Res.*, 23, 3816 (1995)) se dejó reaccionar con una enzima de restricción *Sa*I (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y a continuación se recuperaron los fragmentos de ADN por precipitación en etanol. Se truncaron los extremos con DNA Blunting Kit (fabricado por Takara Shuzo), se dejaron reaccionar más con *Hind*III a 37°C durante 1 hora, y a continuación se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa para recuperar un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb que contenía la región del activador CAG. Los fragmentos de ADN respectivos recuperados de este modo se ligaron utilizando el kit ligadura de ADN (fabricado por Takara Shuzo) y DH5 α de *E. coli* se transformó utilizando el ADN plásmido recombinante resultante para obtener el plásmido CAG-pcDNA3.

(2) Construcción del vector de expresión de hCCR4

Se construyó un vector de expresión de hCCR4 como se describe a continuación utilizando el CAG-pcDNA3 obtenido en el apartado 3(1) del Ejemplo 2 de Referencia y pcDNA3 con ADN insertado de hCCR4 (CCR4/pcDNA3). Tanto el CAG-pcDNA3 como CCR4/pcDNA3 se dejaron reaccionar con *Hind*III a 37°C durante 1 hora y se recuperaron los fragmentos de ADN por precipitación en etanol. Después, se dejaron reaccionar con *Bg*II (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora y a continuación se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa para recuperar el fragmento de ADN de aproximadamente 2,0 kb que contenía la región activadora CAG y un fragmento de ADN de aproximadamente 5,5 kb que contenía la región hCCR4 del gen. Después, se obtuvo el plásmido CAG-CCR4/pcDNA3 utilizando ambos fragmentos de ADN de la misma manera que en el apartado 3(1) del Ejemplo 2 de Referencia.

(3) Expresión hCCR4 en células animales

Se introdujo el plásmido en las células del animal por electroporación de la misma manera que la descrita en el apartado 2(2) del Ejemplo 2 de Referencia. Células EL-4 (ATCC TIB-39) se pusieron en suspensión en PBS(-) (preparado por GIBCO-BRL) hasta dar una densidad de 1×10^7 células/500 μ l, se añadieron a éstas 10 μ g del CAG-CCR4/pcDNA3 obtenido en el apartado 3(2) del Ejemplo 2 de Referencia, y la mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y a continuación se puso en una cubeta para uso exclusivo (fabricada por Bio-Rad) para llevar a cabo la introducción génica a 260 V y 500 μ FD. Después la mezcla se incubó más en hielo durante 10 minutos, se pusieron en suspensión las células en 200 ml de medio FCS-RPMI al 10% y se distribuyeron a razón de 200 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos para cultivo celular. Veinticuatro horas después del cultivo, se retiraron 100 μ l del sobrenadante del cultivo de cada pocillo, y medio FCS-RPMI al 10% que contenía 1 mg/ml de G418 se distribuyeron a razón de 100 μ l/pocillo hasta dar una concentración final de 0,5 mg/ml. Dos semanas después, se seleccionaron entre 10 y 100 clones aislados y se volvieron a cultivar.

(4) Selección de células que expresan en alto grado hCCR4

Se seleccionaron las células por un método inmunofluorescente utilizando KM2160 preparada en el apartado (5) del Ejemplo 1 de Referencia. En una placa de 96 pocillos en forma de U, se distribuyeron 2×10^5 células de cada una de las varias decenas seleccionadas de los clones introducidos en el gen. KM2160 marcada con biotina por un método conocido (Enzyme Antibody Method, publicado por Gakusai Kikaku) se diluyó hasta 5 μ g/ml con tampón para FACS (BSA al 1%-PBS, EDTA al 0,2%, NaN₃ al 0,05%, pH 7,4), IgG humana (preparada por Welfide) se diluyó hasta 3,75 mg/ml para evitar la tinción no específica de cada solución de anticuerpo diluida de este modo se distribuyó a razón de 200 μ l/pocillo, y la mezcla se dejó reaccionar en hielo durante 30 minutos. Como referencia negativa, se utilizó anticuerpo anti-IL-5R biotinilado (WO 97/10354) a la misma concentración. Después de lavar dos veces con 200 μ l/pocillo del tampón, se distribuyó estreptavidina-PE (preparada por Becton Dickinson Japan) a razón de 200 μ l/pocillo. Treinta minutos después de la reacción en hielo en la oscuridad, se lavaron las células tres veces con 200 μ l/pocillo y por último se pusieron en suspensión hasta 500 μ l, y se midió la intensidad de la fluorescencia con un citómetro de flujo para seleccionar una estirpe celular con la mayor intensidad de fluorescencia. La estirpe celular que presentaba la mayor intensidad de fluorescencia se utilizó como CCR4/E-4.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Como se expuso anteriormente, según la presente invención, se proporcionan un anticuerpo recombinante y un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une específicamente a CCR4 humano y contiene nuevas CDR para CCR4. El anticuerpo de la presente invención sirve para el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades

relacionadas con CCR4. Específicamente, sirve para la detección inmunológica de un linfocito Th2 humano por tinción de inmunocitos y para el diagnóstico o tratamiento de todas las enfermedades inmunitarias mediadas por Th2 incluyendo el asma bronquial y las atopias cutáneas, enfermedades en la que los estados mórbidos evolucionan debido al balance anormal de los linfocitos Th2 y los cánceres incluyendo los cánceres sanguíneos tales como la leucemia.

TEXTO LIBRE DE LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID nº:4-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:8-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:9-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

10 SEC ID nº:10-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:11-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:12-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:13-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:14-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 SEC ID nº:16-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:17-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:18-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:19-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:20-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

20 SEC ID nº:21-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:22-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:23-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:24-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:26-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

25 SEC ID nº:27-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:28-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:29-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:30-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:31-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

30 SEC ID nº:32-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:33-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:34-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:35-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:38-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 SEC ID nº:39-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:40-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:41-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

SEC ID nº:42-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº:43-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético

- SEC ID nº:44-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:45-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:46-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:47-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 5 SEC ID nº:49-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:50-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:51-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:52-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:53-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 10 SEC ID nº:54-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:55-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:56-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:57-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:58-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 15 SEC ID nº:59-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:60-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:65-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:66-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:67-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 20 SEC ID nº:68-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:69-Explicación de la secuencia artificial: ADN sintético
 SEC ID nº:70-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
 SEC ID nº:71-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
 SEC ID nº:72-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
 25 SEC ID nº:73-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
 SEC ID nº:74-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
 SEC ID nº:75-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
 SEC ID nº:76-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
 SEC ID nº:77-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético
 30 SEC ID nº:78-Explicación de la secuencia artificial: Péptido sintético

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Anticuerpo humano injertado con CDR y fragmento de anticuerpo del mismo

35 <130> P-41263

<150> JP 2001-265144

<151> 2001-08-31

<160> 78

<170> PatentIn Ver. 2. 1

<210> 1

<211> 6

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asn Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 2

10

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

20

His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

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

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

5

<213> Mus musculus

<400> 5

Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 6

<211> 7

10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

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

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 9

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

10

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 10

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

5

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Péptido sintético

<400> 11

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

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 12

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

10

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Péptido sintético

<400> 13

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

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 14

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

10

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 15

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 16

<211> 98

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 16

aacagctatg accatggcgg ccgcgacccc tcaccatgaa cctcgggctc agtttgáttt 60

tccttgcctt cattttaaaa ggtgtccagt gtgaggtg 98

10 <210> 17

<211> 97

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> ADN sintético

<400> 17

atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggacctcc caggctgtac caagtctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 18

20 <211> 98

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

25 <400> 18

tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggetcca 60

gggaaggggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtgc 98

<210> 19

<211> 98

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 19

acagggagtt cttggcattg tctctggaga tggatgaatcg tcccttcaca ctgtctggat 60
aataggaata agtgctagca ctactaatgg ttgcgacc 98

<210> 20

<211> 98

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 20

acaatgcaa gaactccctg tatctgcaga tgaacagcct gagagtcgag gacacggccc 60
tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98

10 <210> 21

<211> 96

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> ADN sintético

<400> 21

gtaaaacgac ggccagtggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60
ggccccaata accaaacgcg aagtttccat cgctat 96

<210> 22

<211> 17

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 22

25 gatggtcac gtagtgg 17

<210> 23

<211> 61

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> ADN sintético

<400> 23

ctgtatctgc agatgaacag cctgagagtc gaggacacgg ccctgtatta ctgtggaaga 60

c 61

<210> 24

<211> 56

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 24

gaataagtgc tagcactact aatggtgcg acccactcca gcctctgtc tggagc 56

10 <210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400>25

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

15 **Ser Ser Ser**

<210> 26

<211> 92

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 26

aacagctatg accatggaat tcgcctcttc aaaatgaagt tgctgttag gctgttggtg 60

ctgatgttct ggattcctgc ttccagcagt ga 92

25 <210> 27

<211> 94

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> ADN sintético

<400> 27

tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcaggag agtggagact 60

gagtcacac gatatactg ctggaagcag gaat 94

<210> 28

<211> 92

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> ADN sintético

<400> 28

ctccatctcc tgcagatcta gtcggaacat tgttcatatt aatggtgaca catatttaga 60
atggtacctg cagaagccag gccagctccc ac 92

<210> 29

<211> 93

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 29

tgtgcctgac ccaactgccac tgaacctgtc tgggacccca gaaaatcggc tggaaacttt 60
atagatcagg agctgtggag actggcctgg ctt 93

15

<210> 30

<211> 92

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ADN sintético

<400> 30

tggcagtggg tcaggcacag atttcacact gaaaatcagc agagtggagg ctgaggatgt 60
tggggtttat tactgcttc aaggttcaact tc 92

<210> 31

25

<211> 91

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

30

<400> 31

gtaaaacgac ggccagtctc gacgctacgt ttgatttcca ccttggctcc ttggccgaac 60
gtccacggaa gaagtgaacc ttgaaagcag t 91

<210> 32

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> ADN sintético

<400> 32

gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 33

<211> 94

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 33

tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60

15

gagtcacac aacatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 34

<211> 94

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> ADN sintético

<400> 34

tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60

gagtcacaa gatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 35

25

<211> 94

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

30

<400> 35

tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60

gagtcacaa aacatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 36

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
 1 5 10 15
 Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
 20 25

5 <210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
 1 5 10 15

10 Pro Cys

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 38

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

<210> 39

20 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 39

5

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

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 40

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

<210> 41

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 6 10 15

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

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

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42

10

<211> 97

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

15

<400> 42

gtgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggaccccc caggetgtac caagcctccc 60
ccagactcca ccagctgcaac ctcacactgg acacctt 97

<210> 43

<211> 98

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 43

tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60
gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc . 98

<210> 44

<211> 98

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 44

acagcgtggt cttggaattg tctctggaga tggatgaatc tcccttcaca ctgtctggat 60
aataggaata agtgcctagca ctactaatgg ttgagacc 98

10

<210> 45

<211> 98

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> ADN sintético

<400> 45

acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60
tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98

20

<210> 46

<211> 98

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

25

<400> 46

tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60
gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc 98

<210> 47

<211> 98

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 47

acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg.60
tgtattactg tggaagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 48

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
1 5 10 15

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
20 25 30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
35 40 45

Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu
50 55 60

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

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly
85 90 95

Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
100 105 110

Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
115 120 125

Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
130 135 140

Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
145 150 155 160

Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
165 170 175

5

Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
 180 185 190

Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
 195 200 205

Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
 210 215 220

Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
 225 230 235 240

Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
 245 250 255

Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
 260 265 270

Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
 275 280 285

Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
 290 295 300

Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
 305 310 315 320

Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
 325 330 335

Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
 340 345 350

Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
 355 360

<210> 49

<211> 357

<212> ADN .

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (357)

<223> ADN sintético

10 <400> 49

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 50

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (357)

<223> ADN sintético

10 <400> 50

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (357)

5

<223> ADN sintético

<400> 52

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 53

10

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

15

<222> (1).. (336)

<223> ADN sintético

<400> 53

gat atc gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 54

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (336)

<223> ADN sintético

10 <400> 54

gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 56

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (336)

<223> ADN sintético

10 <400> 55

gat atc ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 56

<211> 336

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (336)

<223> ADN sintético

<400> 66

gat gtt ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

5 tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 57

<211> 357

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (357)

<223> ADN sintético

15 <400> 57

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 58

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> ADN sintético

10 <400> 58

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 59
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(357)
- <223> ADN sintético
- <400> 59

5

```

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1           5           10           15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
          20           25           30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
          50           55           60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65           70           75           80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca                               357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

10

- <210> 60
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(367)
- <223> ADN sintético
- <400> 60

15

20

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 61

<211> 414

5

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (414)

10

<400> 61

atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48
 Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys
 20 25 30

<211> 396

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

5

<221> CDS

<222> (1).. (396)

<400> 63

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cgg aac att 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile
35 40 45

gtt cat att aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aga ccg 192
Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
50 55 60

ggc cag tct cca aag ctc cta atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg 384
Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
115 120 125

gaa atc aga cgg 396
Glu Ile Arg Arg
130

10

<210> 64

<211> 132

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 64

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

<210> 68

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> ADN sintético

<400> 68

agccaccgta cgctcgatt ccagcctggt g 31

<210> 69

10

<211> 97

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN sintético

15

<400> 69

atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 70

<211> 28

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 70

Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
1 5 10 15

Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
20 25

25

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Péptido sintético

<400> 71

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
1 5 10 15

Pro Cys

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 72

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro
1 5 10 15

Cys

<210> 73

10

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 73

Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 74

Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
1 5 10 15

25

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Péptido sintético

<400> 75

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Cys
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Péptido sintético

<400> 76

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Cys
1 5 10

<210> 77

<211> 12

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 77

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Cys
1 5 10

15

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 78

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Cys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo humano injertado con CDR que reacciona específicamente con una región extracelular del receptor 4 humano de la quimiocina CC (CCR4) pero no reacciona con una plaqueta humana, que comprende

- 5 (a) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 4 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 8;
- 10 (b) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 4 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 12;
- (c) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 4 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 14;
- (d) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 9 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 12;
- 15 (e) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 9 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 14;
- 20 (f) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 10 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 12;
- (g) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 10 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 14;
- 25 (h) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 11 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 12;
- 30 (i) una región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 11 y una región variable (región V) de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 14;

o su fragmento de anticuerpo seleccionado de entre el grupo constituido por Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario (scFv), un fragmento (Diacuerpo) de la región variable (región V) dimerizado y un fragmento de la región V estabilizado con disulfuro (dsFv).

35 2. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 1 que presenta actividad citotóxica contra una célula que expresa a CCR4.

3. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la región extracelular es una región extracelular de las posiciones 1 a 39 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.

40 4. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 2 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.

45 5. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 13 a 29 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.

6. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la región extracelular es un epítipo presente en las posiciones 13 a 25 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 48.

7. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que reacciona específicamente con una célula que expresa a CCR4.

50 8. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que presenta una actividad citotóxica superior contra una célula que expresa a CCR4 que

un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma de animal no humano.

9. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que la actividad citotóxica es una actividad citotóxica mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC).

5 10. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 9, en el que la actividad ADCC es una actividad de inducción de apoptosis de una célula que expresa a CCR4.

11. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que presenta una actividad de eliminación de una célula que expresa a CCR4.

10 12. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la célula que expresa a CCR4 es un linfocito Th2.

13. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que presenta una actividad de inhibición de la producción de citocinas de un linfocito Th2.

15 14. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según la reivindicación 13, en el que la citocina es IL-4, IL-5 o IL-13.

15. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que pertenece a un anticuerpo IgG humano.

20 16. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo que es producido por un transformante KM8759 (FERM BP-8129) o KM8760 (FERM BP-8130).

17. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo en el que el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 está conjugado química o genéticamente con un radioisótopo, una proteína o un agente.

25 18. Transformante no humano que produce el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

19. Transformante según la reivindicación 18, en el que el transformante es KM8759 (FERM BP-8129) o KM8760 (FERM BP-8130).

30 20. Procedimiento para producir un anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende cultivar el transformante según la reivindicación 18 ó 19 en un medio para formar y acumular el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo en el cultivo; y recuperar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del cultivo.

21. ADN que codifica el anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

22. Vector recombinante que comprende el ADN según la reivindicación 21.

35 23. Transformante no humano que puede obtenerse introduciendo el vector recombinante según la reivindicación 22 en una célula hospedadora.

24. Medicamento que comprende por lo menos uno seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 como principio activo.

40 25. Agente terapéutico para su utilización en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con CCR4, que comprende por lo menos uno seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 como principio activo.

26. Agente terapéutico según la reivindicación 25, en el que la enfermedad relacionada con CCR4 es un cáncer o enfermedades inflamatorias.

45 27. Agente terapéutico según la reivindicación 26, en el que el cáncer es un cáncer sanguíneo.

28. Agente terapéutico según la reivindicación 27, en el que el cáncer sanguíneo es la leucemia o la linfomatosis.

29. Agente terapéutico según la reivindicación 26, en el que la enfermedad inflamatoria es la hipersensibilidad aguda o crónica de las vías respiratorias o el asma bronquial, la atopía cutánea, la rinitis alérgica o

la polenosis.

30. Agente terapéutico para su utilización en el tratamiento de las enfermedades inmunitarias mediadas por Th2, que comprende por lo menos uno seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 como principio activo.

5

31. Agente terapéutico según la reivindicación 30, en el que la enfermedad inmunitaria mediada por Th2 es el asma con hipersensibilidad crónica de las vías respiratorias, el asma bronquial, la atopia cutánea, la rinitis alérgica o la polenosis.

10

32. Agente de diagnóstico para las enfermedades relacionadas con CCR4, que comprende por lo menos uno seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 como principio activo.

33. Agente de diagnóstico según la reivindicación 32, en el que la enfermedad relacionada con CCR4 es un cáncer o una enfermedad inflamatoria.

34. Agente de diagnóstico según la reivindicación 33, en el que el cáncer es un cáncer sanguíneo.

15

35. Agente de diagnóstico según la reivindicación 33, en el que el cáncer sanguíneo es la leucemia o la linfomatosis.

36. Agente de diagnóstico según la reivindicación 33, en el que la enfermedad inflamatoria es el asma con hipersensibilidad crónica de las vías respiratorias, el asma bronquial, la atopia cutánea, la rinitis alérgica o la polenosis.

20

37. Agente de diagnóstico para las enfermedades inmunitarias mediadas por Th2, que comprende por lo menos uno seleccionado de entre el anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 como principio activo.

38. Agente de diagnóstico según la reivindicación 17, en el que la enfermedad inmunitaria mediada por Th2 es el asma con hipersensibilidad crónica de las vías respiratorias, el asma bronquial, la atopia cutánea, la rinitis alérgica o la polenosis.

25

39. Utilización del anticuerpo humano injertado con CDR y del fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la preparación de una composición de diagnóstico destinada a detectar inmunológicamente CCR4.

30

40. Utilización del anticuerpo humano injertado con CDR o del fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la preparación de una composición de diagnóstico destinada a detectar inmunológicamente una célula que ha expresado CCR4 en la superficie celular.

41. Utilización del anticuerpo humano injertado con CDR o del fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la preparación de un medicamento destinado a reducir o eliminar una célula que ha expresado CCR4 en la superficie celular.

35

42. Utilización del anticuerpo humano injertado con CDR o del fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la producción de citocina de un linfocito Th2.

43. Anticuerpo humano injertado con CDR y el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su utilización en la detección inmunológicamente de CCR4.

40

44. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su utilización en la detección inmunológicamente de una célula que ha expresado CCR4 en la superficie celular.

45. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su utilización en la reducción o eliminación de una célula que ha expresado CCR4 en la superficie celular.

45

46. Anticuerpo humano injertado con CDR o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su utilización en la inhibición de la producción de citocina de un linfocito Th2.

FIG. 1

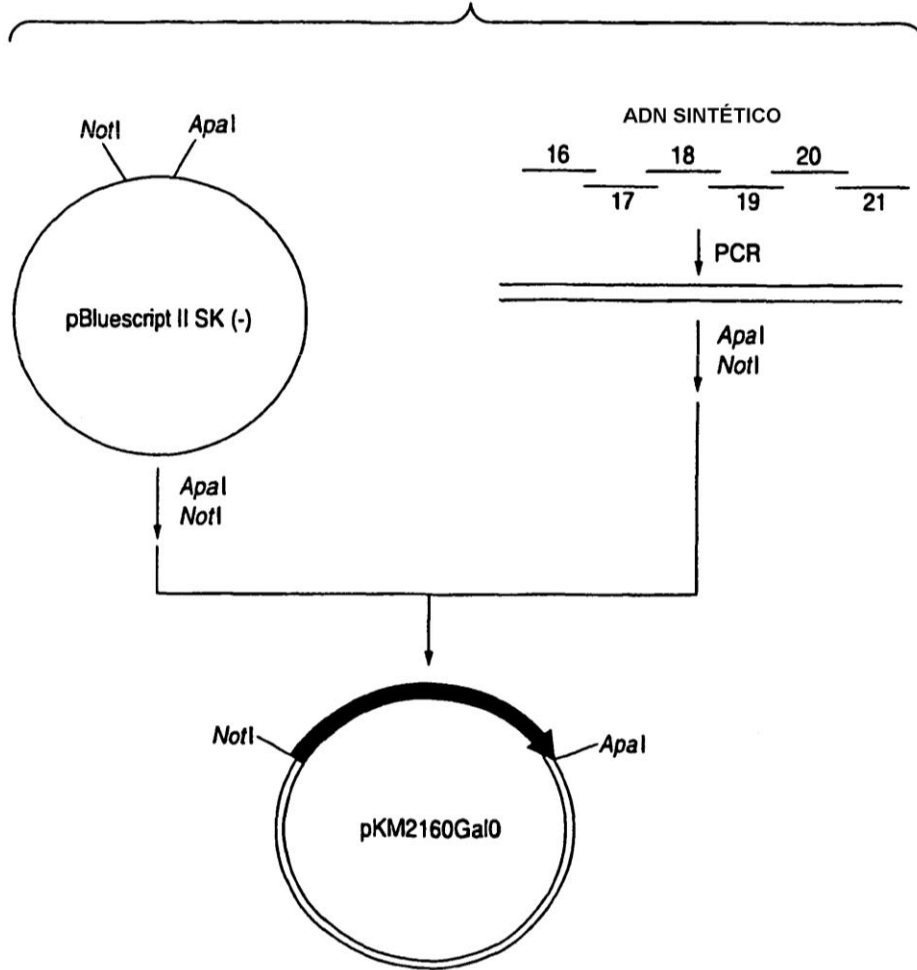


FIG. 2

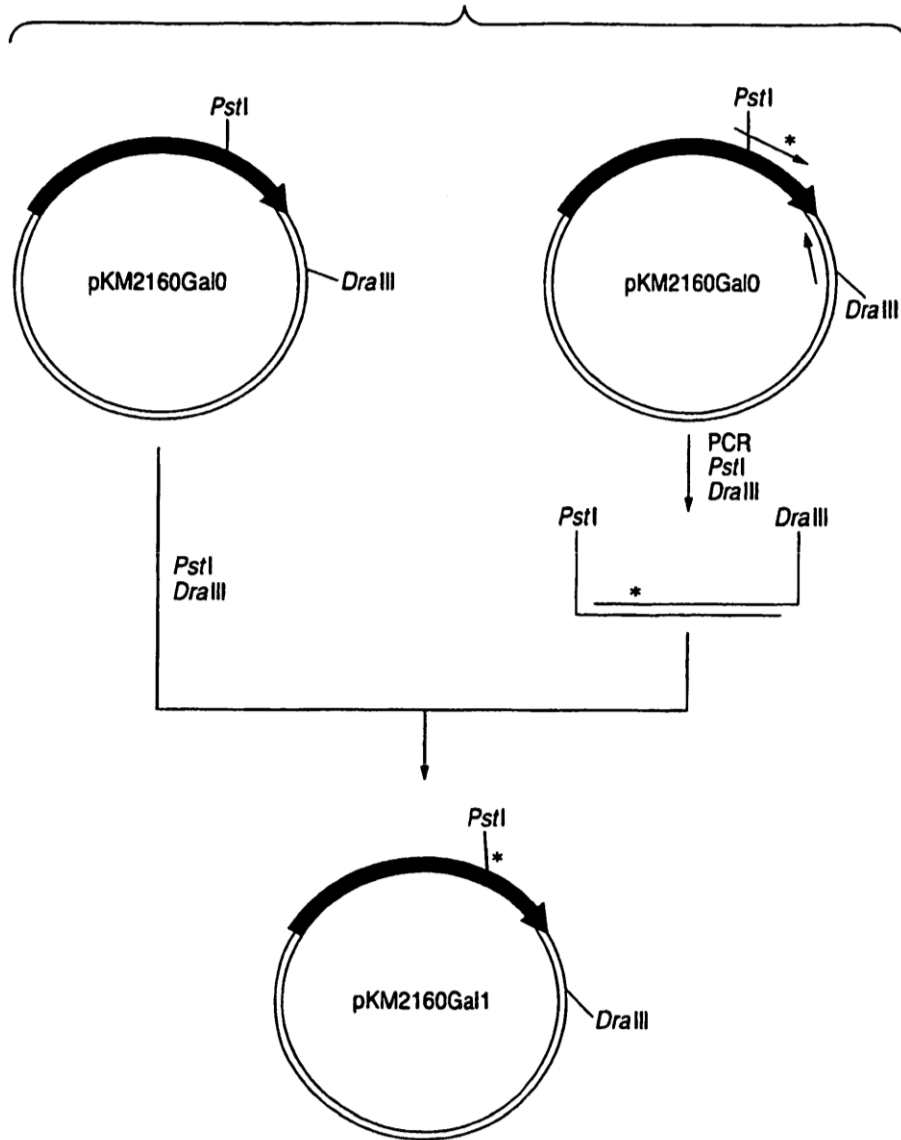


FIG. 3

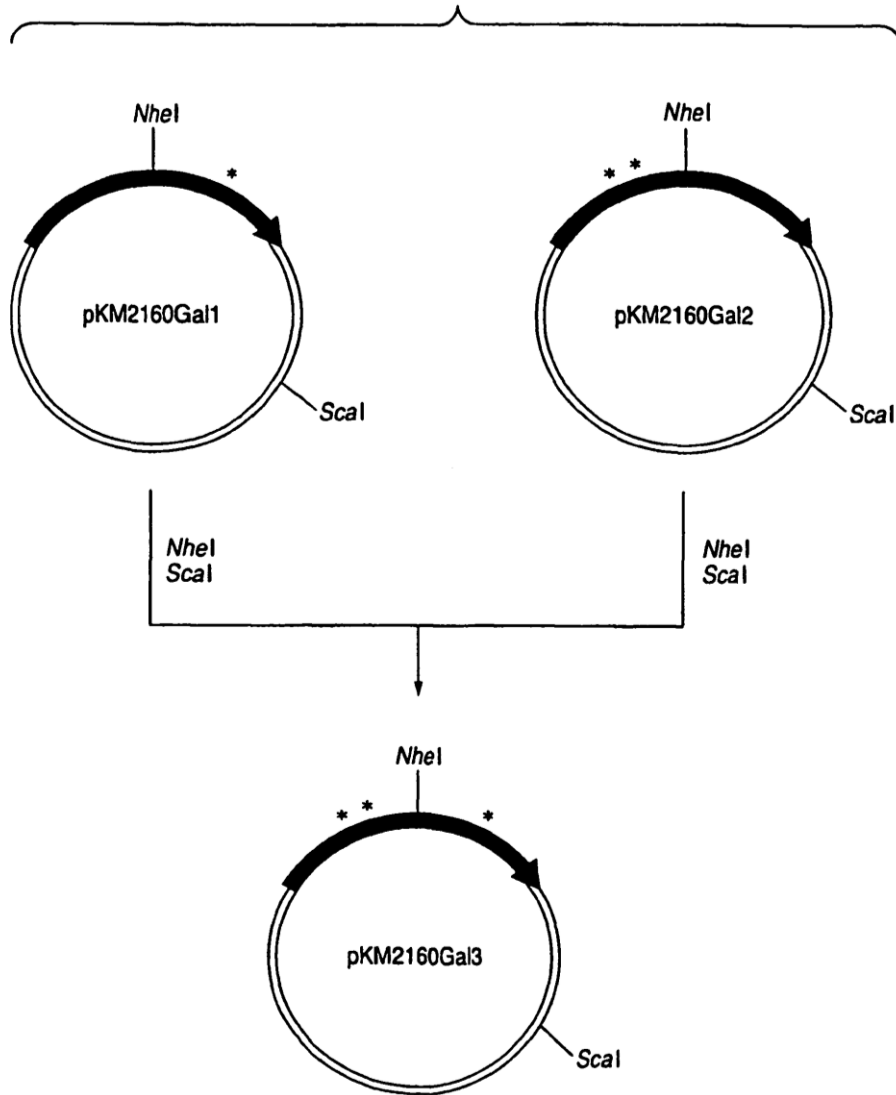


FIG. 4

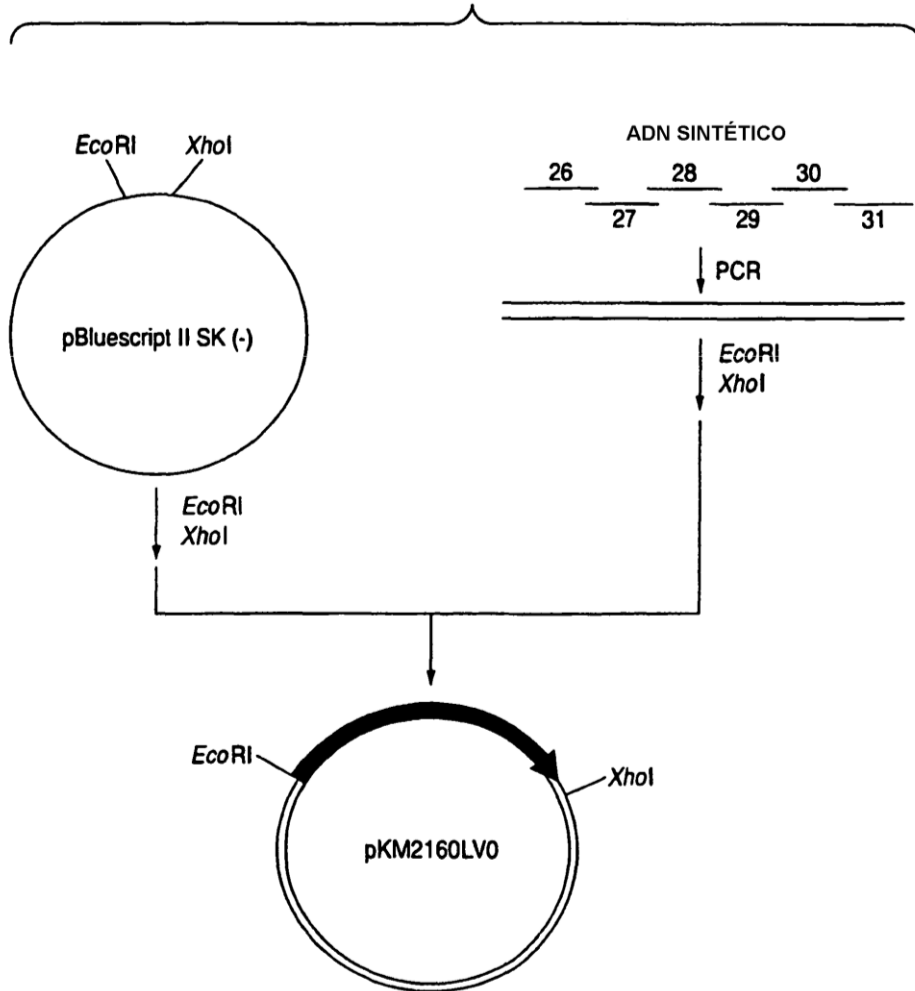


FIG. 5

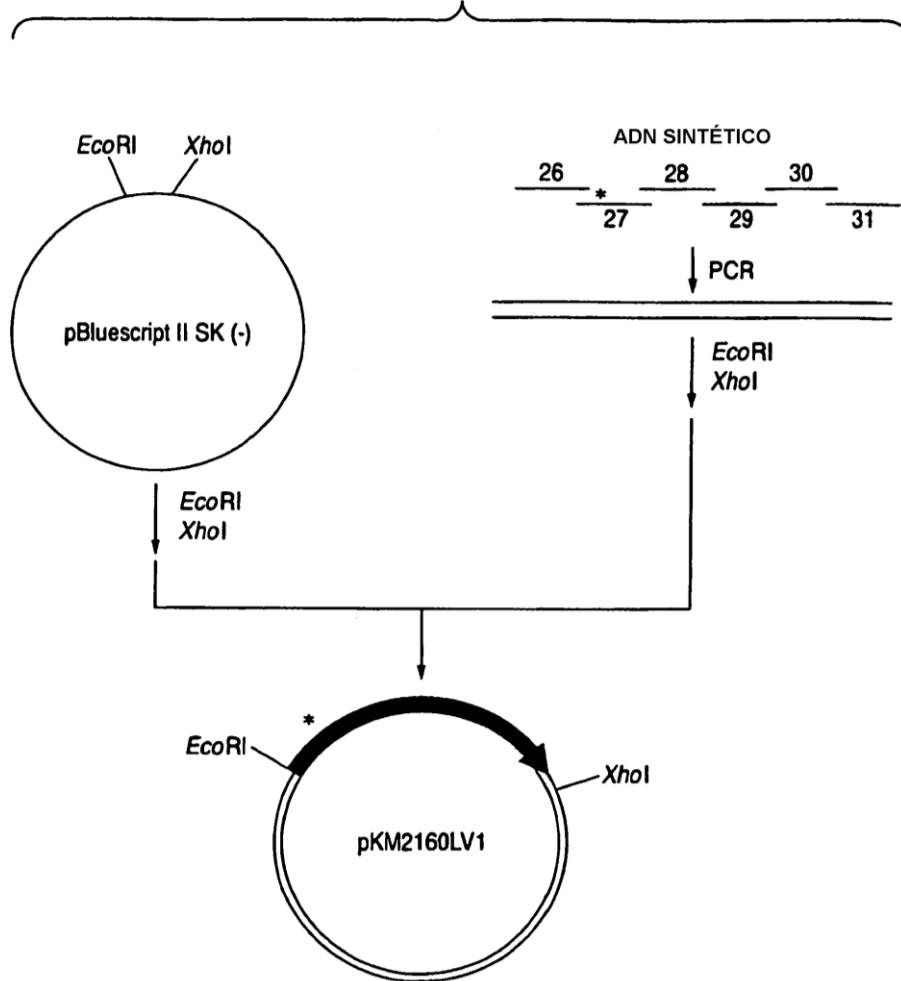


FIG. 6

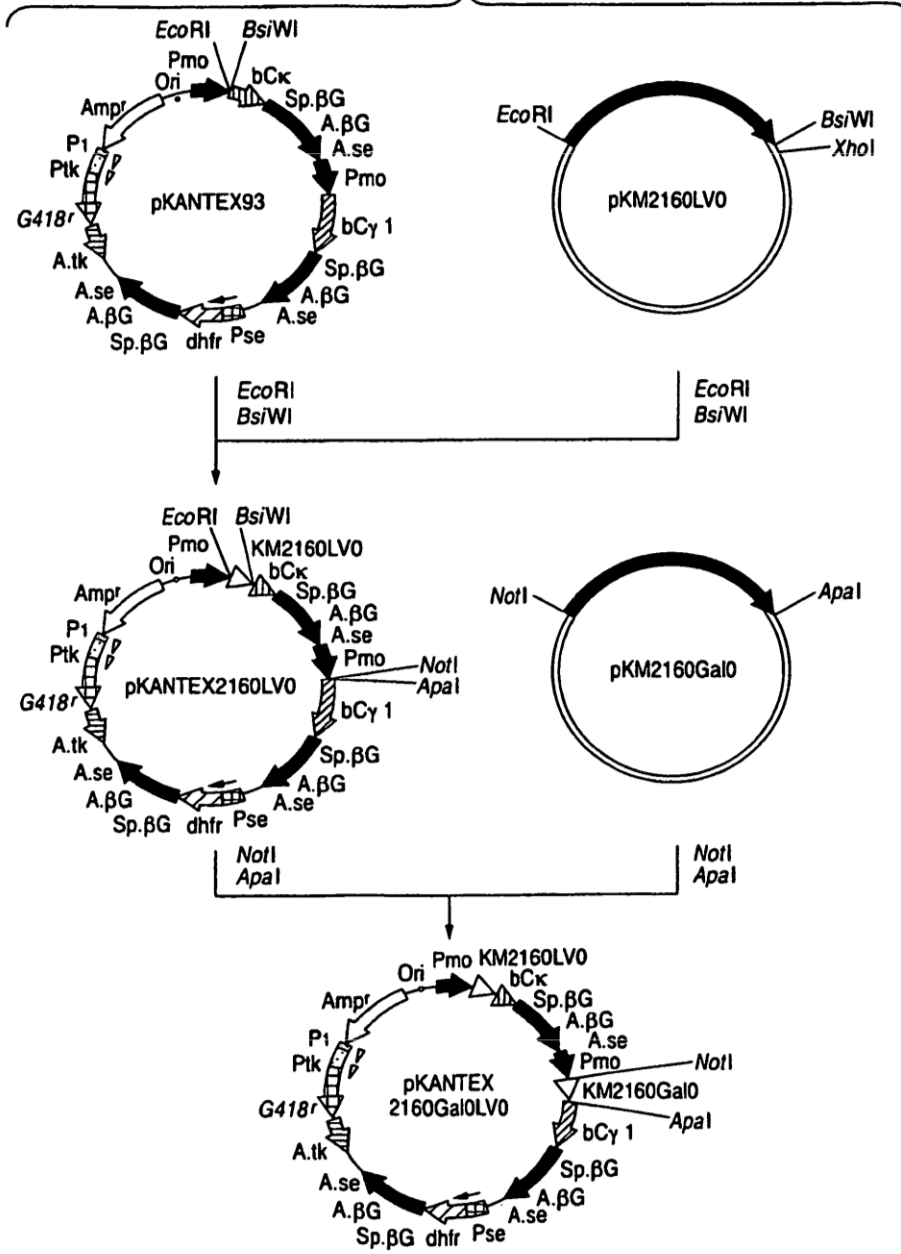


FIG. 7

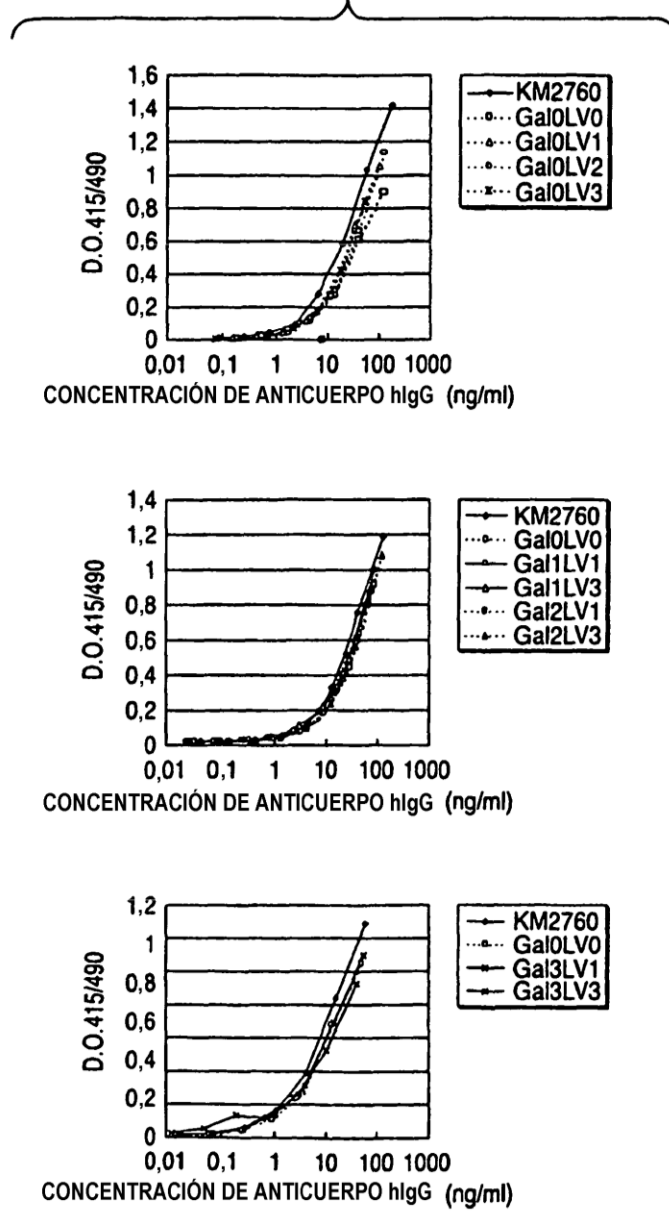


FIG. 8

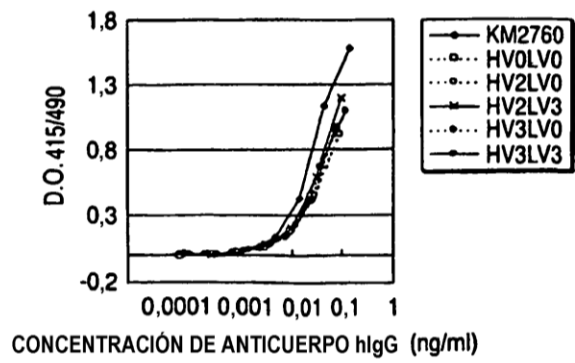
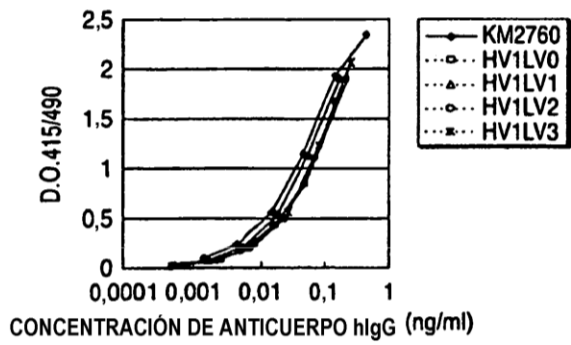
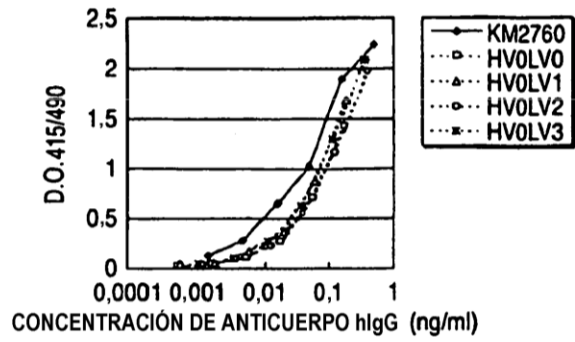


FIG. 9

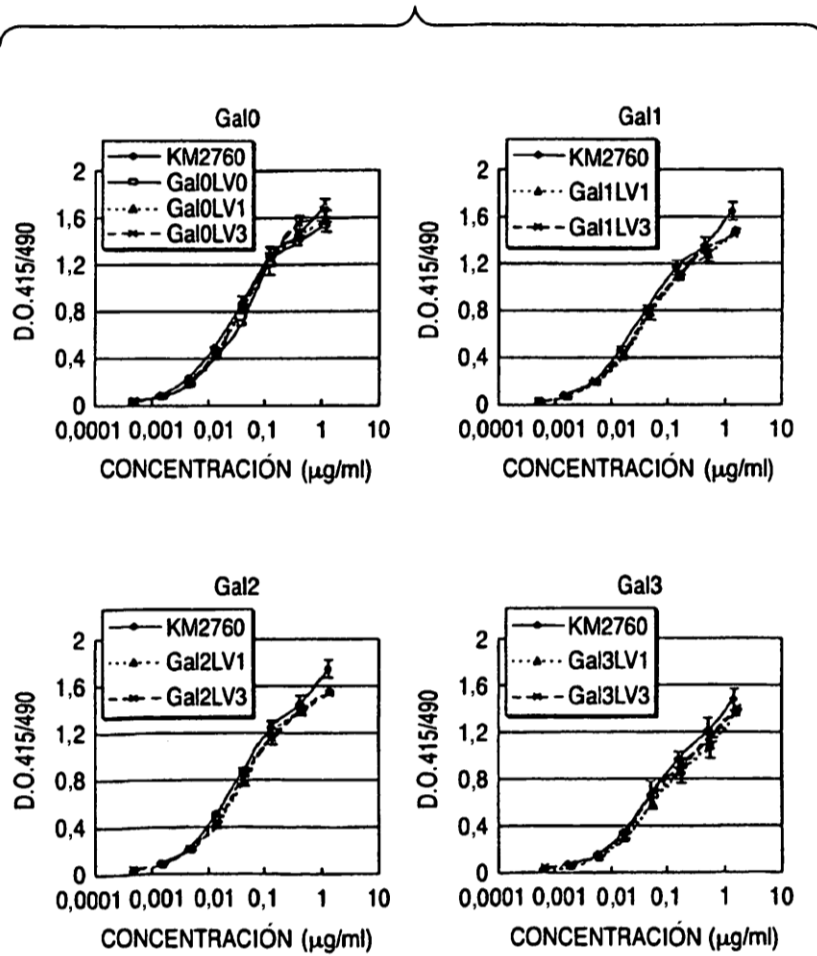


FIG. 10

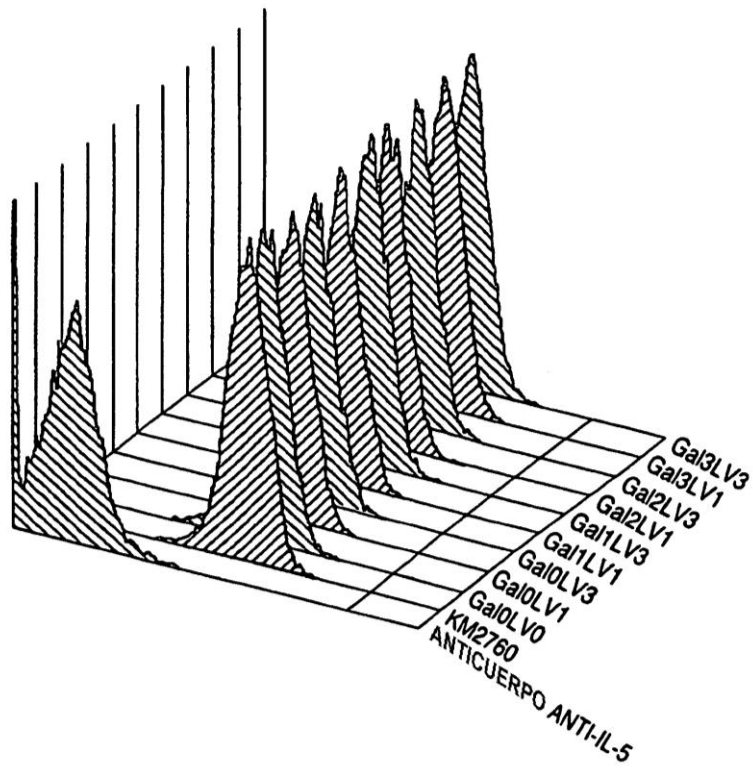


FIG. 11

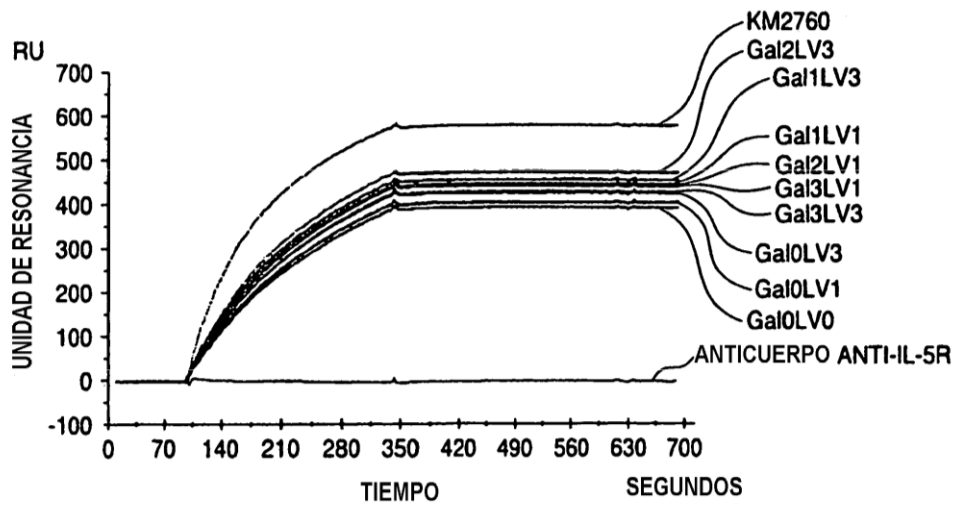


FIG. 12

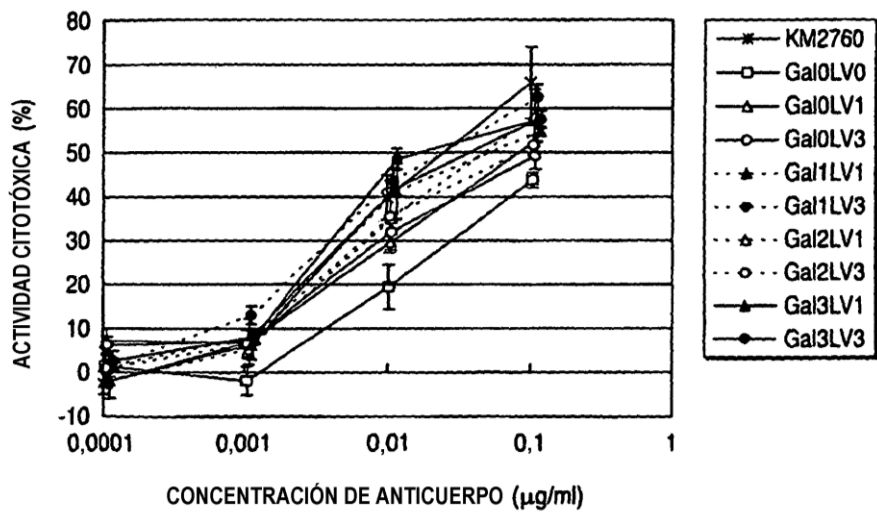


FIG. 13

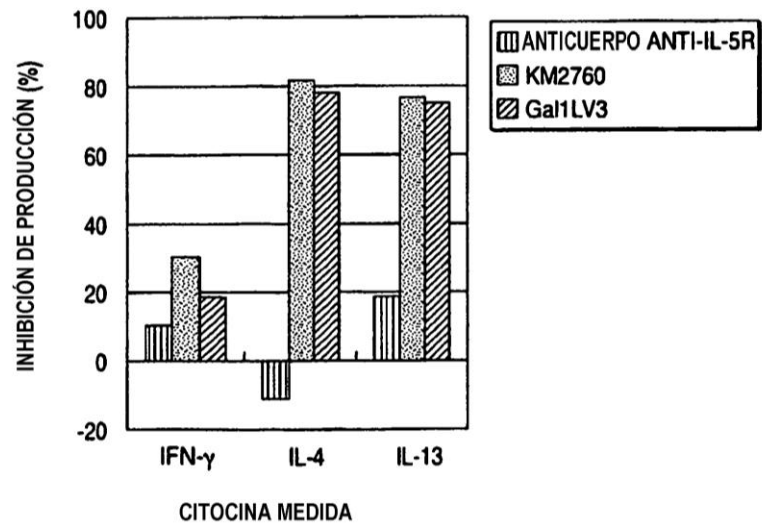


FIG. 14

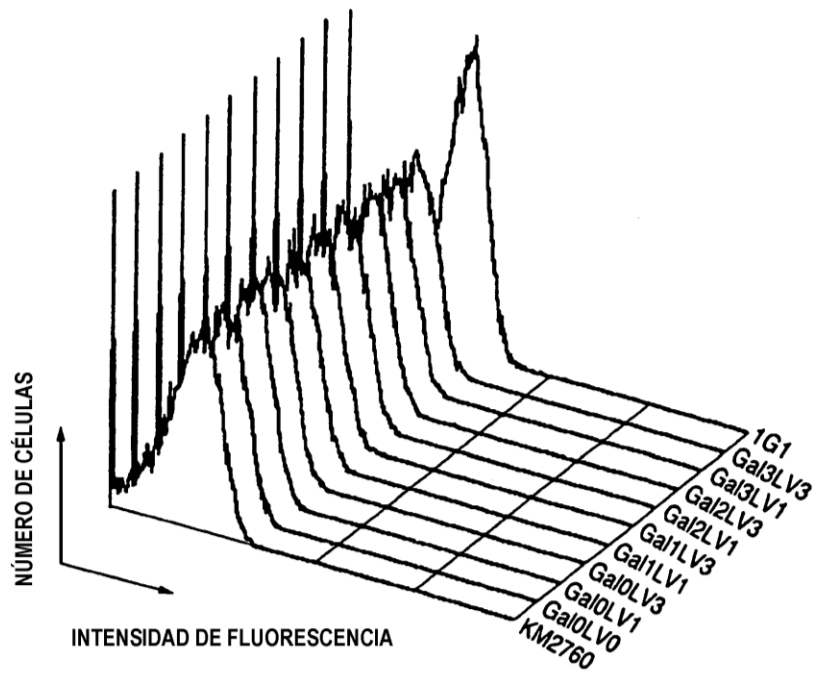


FIG. 15

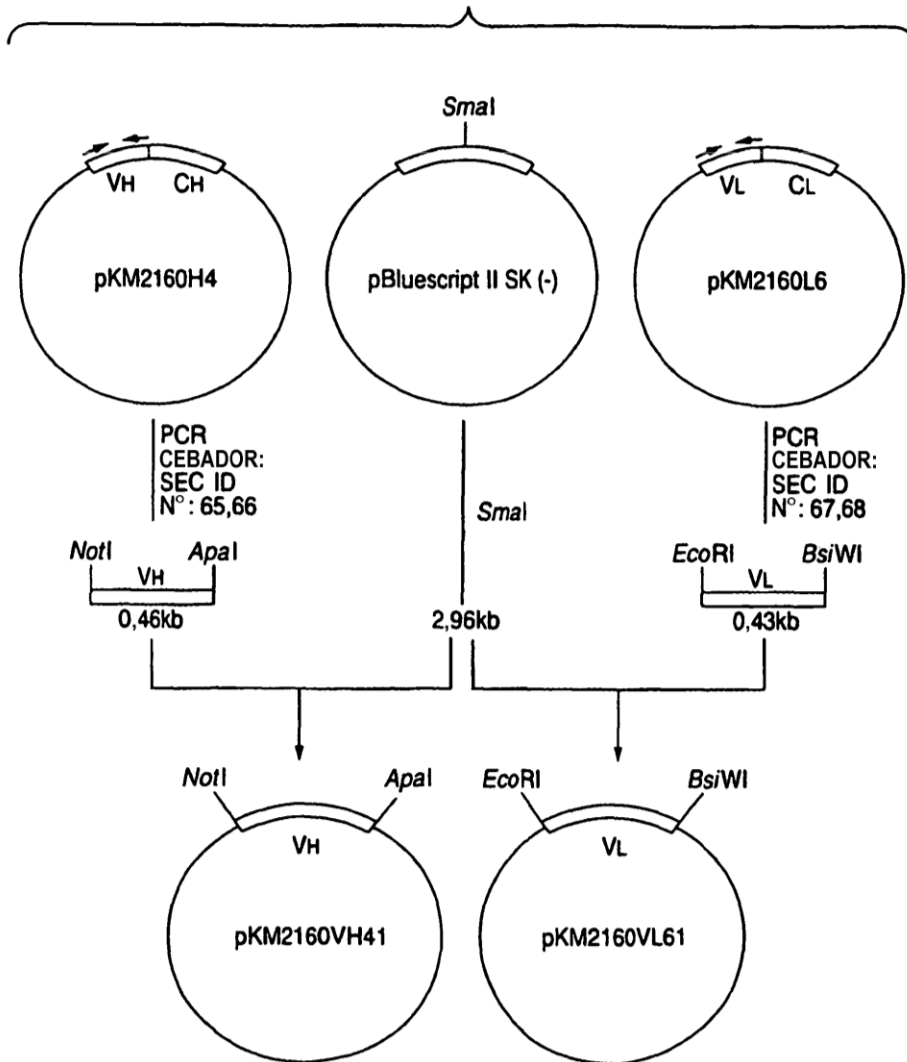


FIG. 16

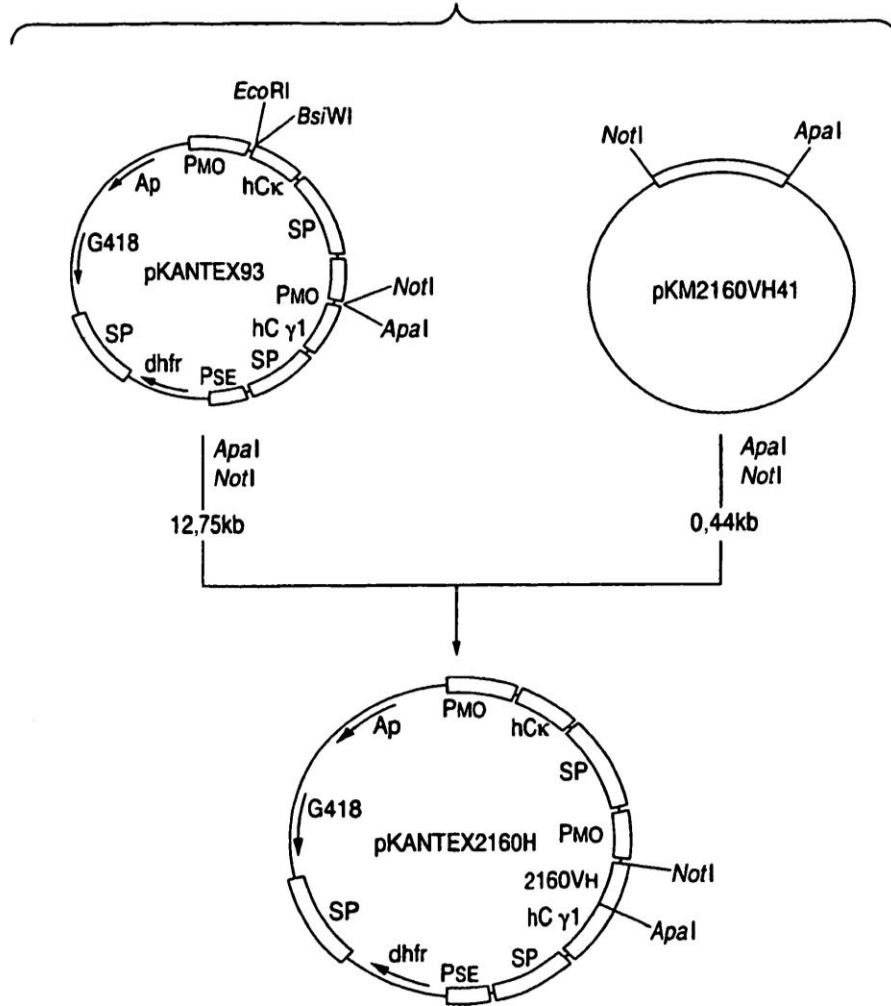


FIG. 17

