



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 567**

15 Folleto corregido: T3

Texto afectado: Lista de secuencias

48 Fecha de publicación de la corrección: 25.05.2011

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA CORREGIDA

T9

96 Número de solicitud europea: **05823880 .9**

96 Fecha de presentación : **29.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1831257**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2007**

54 Título: **Anticuerpo humanizado específico para el factor de necrosis tumoral- α .**

30 Prioridad: **29.12.2004 KR 10-2004-0115709**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2011

73 Titular/es: **YUHAN CORPORATION**
49-6, Taebang-dong
Tongjak-ku, Seoul 156-020, KR

72 Inventor/es: **Yoo, Tae Hyoung;**
Song, Moo Young;
Kim, Chang Seok;
Park, Sang Koo;
Na, Kang In;
Lee, Byung Kyu y
Kang, Heui Il

74 Agente: **Miltényi Null, Peter**

ES 2 359 567 T9

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

Anticuerpo humanizado específico para el factor de necrosis tumoral- α .

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado específico para el factor de necrosis tumoral- α humano definido en la reivindicación 1.

10 **Antecedentes de la invención**

El factor de necrosis tumoral- α humano (de aquí en adelante denominado como "hTNF- α ") es un homotrímero que consiste en tres subunidades proteicas de 17 kDa (Eck M. J. *et al.*, *JBC*, 267: 2119-2122, 1992; Smith R. A. *et al.*, *JBC*, 262: 6951-6954, 1987). El hTNF- α es una citoquina inflamatoria secretada de macrófagos y monocitos y funciona como transmisor de señales en varias reacciones celulares tales como necrosis y apoptosis (Beyaert R. *et al.*, *FEBS Lett.*, 340: 9-16, 1994). El h-TNF- α causa una acción proinflamatoria que produce destrucción de tejido, tal como rotura de cartílago y hueso (Saklatvala, *Nature*, 322: 547-549, 1986), inducción de moléculas de adhesión, inducción de actividad de procoagulación en células vasculares endoteliales (Pober JS *et al.*, *J. Immunol.*, 136: 1680-1687, 1986) y aumento en la adherencia de neutrófilos y linfocitos (Pober *et al.*, *J. Immunol.* 138: 3319-3324, 1987). Además, se ha sabido que el hTNF- α desempeña un papel importante en un mecanismo de defensa contra enfermedades infecciosas y tumores (Fiers W., *FEBS Lett.*, 285: 199-212, 1991).

El hTNF- α está implicado en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, infecciones bacterianas, cánceres y enfermedades degenerativas. Entre estas enfermedades el hTNF- α se ha considerado como una proteína diana útil para un tratamiento fisiológico específico de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, y espondilitis anquilosante.

Mientras tanto, también se ha sugerido usar un inhibidor de hTNF- α para el propósito de tratar artritis reumatoide. Se ha descrito que hTNF- α se sobreexpresa en las células sinoviales aisladas de la articulación reumatoide de fase temprana (Buchan G. *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 73: 449-455, 1988) y las citoquinas relacionadas con lesiones de artritis reumatoide disminuyen cuando las células sinoviales anteriores se tratan con un anticuerpo monoclonal anti-hTNF- α (Butler D. M. *et al.*, *Eur. Cytokine Netw.*, 6: 225-230, 1995). Además, se ha encontrado que un anticuerpo anti-hTNF- α o un receptor recombinante soluble de hTNF- α suprimen la inflamación y destrucción de una articulación en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratón (Piguet P. F. *et al.*, *Immunology*, 77: 510-514, 1992; Wooley P. H. *et al.*, *J Immunol.*, 151: 6602-6607, 1993; Williams R. O. *et al.*, *Immunology*, 84: 433-439, 1995). Además, se ha observado que la artritis inflamatoria se induce en un ratón transgénico que sobreexpresa hTNF- α (Keller J. *et al.*, *EMBO J.*, 10: 4025-4031, 1991).

Estos resultados indican que hTNF- α desempeña un papel importante como un regulador directo o indirecto que controla las citoquinas inflamatorias en la artritis reumatoide. Según esto, ha habido una necesidad para desarrollar un anticuerpo monoclonal que tenga gran selectividad y reactividad hacia hTNF- α para el fin de tratar artritis reumatoide.

En general, un anticuerpo que tiene gran selectividad y reactividad hacia un antígeno específico se prepara mediante la inmunización de un ratón con el antígeno (Kohler G. & Milstein C., *Nature*, 256: 495-497, 1975). Un anticuerpo monoclonal de ratón es ventajoso en que es fácil preparar el anticuerpo y seleccionar un anticuerpo que tenga gran reactividad. Sin embargo, también tiene un problema que se forma un anticuerpo anti-ratón en un cuerpo humano cuando se administra durante un tiempo largo (Dimaggio J. J., *et al.*, *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.*, 11: 177-203, 1990).

Para superar las propiedades indeseables de los anticuerpos monoclonales de ratón, se ha desarrollado un anticuerpo humanizado sustituyendo las regiones marco excepto los sitios de unión al antígeno con las de un anticuerpo humano. Como un método para preparar tal anticuerpo humanizado, actualmente se emplea un método de injerto de CDR (región determinante de complementariedad), en donde solo se injertan las CDR de un anticuerpo de ratón en un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado preparado mediante injerto de CDR tiene la ventaja de reducir las respuestas inmunes *in vivo* (Riechmann, *et al.*, *Nature*, 332: 323, 1988; Nakatani *et al.*, *Protein Engineering*, 7: 435, 1994), sin embargo, con frecuencia pierde la gran selectividad y reactividad del anticuerpo de ratón original (Carter P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 4285-4289, 1992).

Este es efectivamente el caso para el anticuerpo monoclonal de ratón humanizado anti-hTNF- α descrito por Wang y col. que, cuando se compara con el anticuerpo monoclonal original anti TNF α humano tiene capacidades neutralizantes reducidas (Wang *et al.*, *Journal of Immunological methods*, 171-184, 2000).

Los presentes inventores se han esforzado para superar tales problemas del anticuerpo humanizado convencional y han desarrollado un nuevo anticuerpo humanizado que se une específicamente a hTNF- α , que muestra una afinidad de unión al antígeno similar a la del anticuerpo monoclonal de ratón original e inmunogenicidad minimizada.

Compendio de la invención

Según esto, la presente invención proporciona:

- 5 1. Un anticuerpo humanizado específico para el factor de necrosis tumoral- α humano (hTNF- α), que comprende: a) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38; b) una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 o 40; c) una región constante de la cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano; y d) una región constante de la cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano.
- 10 2. El anticuerpo humanizado de 1, en donde la afinidad de unión al antígeno (Kd) del anticuerpo varía desde 1×10^{-9} M hasta 1×10^{-13} M.
- 15 3. El anticuerpo humanizado de 1, en donde la constante de disociación (K_{off}) del anticuerpo varía desde 1×10^{-6} s⁻¹ hasta 1×10^{-9} s⁻¹, que se determina mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR).
4. El anticuerpo humanizado de 1, en donde la región variable de la cadena pesada del anticuerpo está codificada por un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31, 32 o 33.
- 20 5. El anticuerpo humanizado de 1, en donde la región variable de la cadena ligera del anticuerpo está codificada por un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 34 o 35.
6. Un vector de expresión para el anticuerpo humanizado específico para hTNF- α de 1, que comprende un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38 y un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de secuencia SEQ ID NO: 39 o 40.
- 25 7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado de cualquiera de 1 a 5, para tratar una enfermedad relacionada con hTNF- α , seleccionada del grupo que consiste en: artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, psoriasis, septicemia, asma, granulomatosis de Wegener, inflamación y espondilitis anquilosante.
- 30

Breve descripción de las figuras

- 35 Los anteriores y otros objetos y características de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se toma junto con las figuras acompañantes, que respectivamente muestran:

Fig. 1: Comparación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (TSK114 H) de un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente a TNF- α (SEQ ID NO: 47), subgrupo 1 de cadena pesada (Hh1) de un anticuerpo humano (SEQ ID NO: 48) y las cadenas pesadas (TNHV2, TNHV2k y TNHV1k) de los anticuerpos humanizados de la presente invención (SEQ ID NO: 36 a 38);

40 Fig. 2: Comparación de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (TSK114 L) de un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente a TNF- α (SEQ ID NO: 49), subgrupo 1 de cadena ligera (Hk1) de un anticuerpo humano (SEQ ID NO: 50) y las cadenas ligeras (TNLV2 y TNLV2d) de los anticuerpos humanizados de la presente invención (SEQ ID NO: 39 y 40);

Fig. 3: Diagrama esquemático que muestra el proceso para preparar el vector pHAB-TNHV2 HF que expresa la cadena pesada del anticuerpo humanizado inventivo;

50 Fig. 4: Diagrama esquemático que muestra el proceso para preparar el vector pHAB-TNHV2k HF que expresa la cadena pesada del anticuerpo humanizado inventivo;

Fig. 5: Diagrama esquemático que muestra el proceso para preparar el vector pHAB-TNHV1k HF que expresa la cadena pesada del anticuerpo humanizado inventivo;

Fig. 6: Diagrama esquemático que muestra el proceso para preparar el vector pHAB-TNLV2 LF que expresa la cadena ligera del anticuerpo humanizado inventivo;

60 Fig. 7: Diagrama esquemático que muestra el proceso para preparar el vector pHAB-TNLV2d LF que expresa la cadena ligera del anticuerpo humanizado inventivo;

Fig. 8: Resultado de SDS-PAGE del anticuerpo humanizado inventivo producido en una célula animal y purificado después de ello; y

65 Fig. 9: Gráfico que muestra las afinidades de unión para TNF- α de un anticuerpo monoclonal de ratón y los anticuerpos humanizados inventivos.

Descripción detallada de la invención

En los anticuerpos humanizados de la presente invención, las CDR de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los mismos derivan de un anticuerpo monoclonal de ratón, y las regiones marco excepto para las CDR así como las regiones constantes de la cadena pesada y ligera derivan de un anticuerpo humano. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado inventivo muestra una afinidad de unión al antígeno (K_d) varía desde 1×10^{-9} M hasta 1×10^{-13} M. Además, la constante de disociación (K_{off}) del anticuerpo humanizado inventivo varía desde 1×10^{-6} s⁻¹ hasta 1×10^{-9} s⁻¹, cuando se determina mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR).

El anticuerpo humanizado de la presente invención se puede preparar mediante un método de injerto de CDR a partir del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 (números de acceso del depósito: KCTC 10514BP y KCTC 10515BP) específico para hTNF- α , en donde la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 comprende tres CDR de SEQ ID NO: 41 a 43 y la región variable de la cadena ligera, tres CDR de SEQ ID NO: 44 a 46.

Primero, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón se comparan con secuencias humanas en la base de datos GenBank y se seleccionan el subgrupo 1 de la región variable de la cadena pesada humana (Hh1) definido por Kabat que tiene la mayor similitud de secuencia a la cadena pesada del anticuerpo de ratón, y el subgrupo 1 de la región variable de la cadena ligera kappa humana (Hk1) que tiene la mayor similitud a la cadena ligera del anticuerpo de ratón (Harris L. & Bajorath J., *Protein Science*, 4; 306-310, 1995).

Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo humanizado se pueden amplificar usando estos genes humanos seleccionados como moldes. En este procedimiento, cada una de las secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo humanizado se puede modificar en base a la información de estudios genéticos bien conocidos y análisis estructurales de anticuerpos. Además, si ciertos residuos de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón afectan a la afinidad de unión al antígeno o son importantes para mantener la estructura del anticuerpo, es preferible conservar las secuencias de nucleótidos que codifican los residuos de aminoácidos sin modificación (Kabat E.A. *et al.*, *D.H.H.S. número de publicación (NIH)* 91-3242, 1991; Chothia C. *et al.*, *Nature*, 342; 877-883, 1989; Studnicka G.M. *et al.*, *Protein Engineering*, 7; 805-814, 1994; Harris L. & Bajorath J., *Protein Science*, 4; 306-310, 1995).

Se puede preparar un gen que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado sustituyendo las regiones marco excepto el sitio de unión al antígeno en la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 que se une específicamente a hTNF- α con el subgrupo 1 de cadena pesada (Hh1) de un anticuerpo humano. Se puede preparar tal gen que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado mediante los pasos de: diseñar cebadores para humanizar el anticuerpo monoclonal de ratón usando el gen que codifica la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 como molde; realizar PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando los cebadores correspondientes; y ligar entre sí los productos de PCR así amplificados usando enzimas de restricción y ADN ligasa. Los genes que codifican la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado preparado de esta manera se han designado TNHV2 (SEQ ID NO: 31), TNHV2k (SEQ ID NO: 32) y TNHV1k (SEQ ID NO: 33), que codifican los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente (véase la Fig. 1).

Para preparar un gen que codifique la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo humanizado incluyendo el gen que codifica la región variable de la cadena pesada humanizada, se inserta el gen TNHV2, TNHV2k o TNHV1k en un vector apropiado, por Ejemplo, un vector TOPO (kit de clonación TOPO TA, Invitrogen, EE UU), para preparar vectores de expresión pCR-TNHV2 Hv, pCR-TNHV2k Hv y pCR-TNHV1k Hv. Se aísla un fragmento génico que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado del vector de expresión pCR-TNHV2 Hv, pCR-TNHV2k Hv o pCR-TNHV1k Hv y se inserta en el vector pHAB-HC (número de acceso del depósito: KCTC 10229BP; Publicación de la patente coreana accesible al público No: 2004-12266) que contiene el gen que codifica la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo humano, para obtener el vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo humanizado. Los vectores de expresión preparados de esta manera se han designado pHAB-TNHV2 HF, pHAB-TNHV2k HF y pHAB-TNHV1k HF.

Los transformantes de *E. coli* TOP10F' transformados con los vectores de expresión pHAB-TNHV2 HF y pHAB-TNHV2k HF se depositaron el 1 de septiembre de 2004 en la colección Coreana para Cultivos Tipo (KCTC) (Dirección: Instituto de Investigación de Biociencia y Biotecnología de Corea (KRIBB), #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, 305-333, República de Corea) con los números de acceso KCTC 10691BP y KCTC 10692BP, respectivamente, y un transformante de *E. coli* TOP10F' transformado con el vector de expresión pHAB-TNHV1k HF se depositó el 13 de junio de 2005 con la KCTC con el número de acceso KCTC 10818BP, según los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines de procedimientos en materia de patentes.

Los genes que codifican la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo humanizado se pueden aislar de los vectores de expresión de la cadena pesada pHAB-TNHV2 HF, pHAB-TNHV2k HF y pHAB-TNHV1k HF, y se han designado TNHV2 HF, TNHV2k HF y TNHV1k HF, respectivamente.

ES 2 359 567 T9

Se puede preparar un gen que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado sustituyendo las regiones marco excepto el sitio de unión al antígeno en la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 que se une específicamente a hTNF- α con el subgrupo 1 de cadena ligera (Hk1) de un anticuerpo humano. Se puede preparar tal gen que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado mediante los pasos de: diseñar cebadores para humanizar el anticuerpo monoclonal de ratón usando el gen que codifica la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 como molde; realizar PCR usando los cebadores correspondientes; y ligar entre sí los productos de PCR así amplificados usando enzimas de restricción y ADN ligasa. Los genes que codifican la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado preparado de esta manera se han designado TNLV2 y TNLV2d, que codifican los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 40, respectivamente (véase la Fig. 2).

Para preparar un gen que codifique la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo humanizado incluyendo el gen que codifica la región variable de la cadena ligera humanizada, se inserta el gen TNLV2 o TNLV2d en un vector apropiado, por Ejemplo, un vector TOPO, para preparar vectores de expresión pCR-TNLV2 Lv y pCR-TNLV2d Lv. Se aísla un fragmento génico que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado del vector de expresión pCR-TNLV2 Lv o pCR-TNLV2d Lv y se inserta en el vector pHAB-KC (número de acceso del depósito: KCTC 10230BP; Publicación de la patente coreana accesible al público No: 2004-12268) que contiene el gen que codifica la región constante de la cadena ligera de un anticuerpo humano, para obtener el vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo humanizado. Los vectores de expresión preparados de esta manera se han designado pHAB-TNLV2 LF y pHAB-TNLV2d LF.

Un transformante de *E. coli* TOP10F' transformado con el vector de expresión pHAB-TNLV2 LF se depositó el 1 de septiembre de 2004 con la KCTC con el número de acceso KCTC 10690BP, y un transformante de *E. coli* TOP10F' transformado con el vector de expresión pHAB-TNLV2d LF se depositó el 13 de junio de 2005 con la KCTC con el número de acceso KCTC 10817BP, según los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines de procedimientos en materia de patentes.

Los genes que codifican la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo humanizado se pueden aislar de los vectores de expresión de la cadena ligera pHAB-TNLV2 LF y pHAB-TNLV2d LF, y se han designado TNLV2 LF y TNLV2d LF, respectivamente.

Se pueden transformar líneas de células CHO con el vector de expresión de la cadena pesada humanizada pHAB-TNHV2 HF y el vector de expresión de la cadena ligera humanizada pHAB-TNLV2 LF usando una solución de transformación apropiada tal como GenePORTER (GTS, EE UU) para obtener un transformante que produzca el anticuerpo humanizado específico para hTNF- α , y el transformante se ha designado CHO-YHB1406. Además, se puede preparar otro transformante usando el vector de expresión de la cadena pesada humanizada pHAB-TNHV2k HF y el vector de expresión de la cadena ligera humanizada pHAB-TNLV2 LF o pHAB-TNLV2d LF según el mismo método descrito anteriormente. Estos transformantes se han designado CHO-YHB1411 y CHO-YHB1411-2. Además, se puede preparar otro transformante usando el vector de expresión de la cadena pesada humanizada pHAB-TNHV1k HF y el vector de expresión de la cadena ligera humanizada pHAB-TNLV2d LF según el mismo método descrito anteriormente, y se ha designado CHO-YHB1406-2.

Para purificar el anticuerpo humanizado de la presente invención de las líneas celulares transformantes, se puede cultivar el transformante CHO-YHB1406, CHO-YHB1411, CHO-YHB1411-2 o CHO-YHB1406-2 en un medio de cultivo apropiado, y se puede someter el sobrenadante del cultivo a cromatografía en columna usando proteína A (Amersham Bioscience, Suecia) o inmunoglobulina G anti-humana de cabra (Zymed Laboratories Inc., EE UU). Los anticuerpos humanizados purificados de esta manera se han designado YHB1406, YHB1411, YHB1411-2 e YHB1406-2, respectivamente.

Se puede determinar la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado mediante, por Ejemplo, ELISA competitivo, ELISA en fase sólida o resonancia de plasmón de superficie. Los anticuerpos humanizados YHB1406, YHB1411, YHB1411-2 e YHB1406-2 que se unen específicamente a hTNF- α muestran afinidades de unión al antígeno que varían desde 1×10^{-9} M hasta 1×10^{-13} M, lo que demuestra que los anticuerpos humanizados de la presente invención tienen actividades de unión al antígeno similares a las del anticuerpo monoclonal de ratón original, mientras que muestran inmunogenicidad significativamente reducida y por tanto, se pueden usar eficazmente para tratar enfermedades relacionadas con hTNF- α . Además, la constante de disociación (K_{off}) del anticuerpo humanizado inventivo determinada por SPR varía desde $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ hasta $1 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, lo que refleja un grado muy bajo de disociación del complejo antígeno-anticuerpo.

Para este propósito, el anticuerpo humanizado de la presente invención se puede usar como un principio activo en una composición farmacéutica para tratar una enfermedad relacionada con hTNF- α tal como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, psoriasis, septicemia, asma, granulomatosis de Wegener, inflamación y espondilitis anquilosante.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular de modo que se proporcione una liberación rápida, sostenida o retrasada del principio activo después de la administración a un paciente empleando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica. La composición puede comprender excipientes, diluyentes, rellenos, disgregantes, edulcorantes, lubricantes y sabores farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica preferi-

ES 2 359 567 T9

blemente se formula para la administración intravenosa, mediante inyección intravenosa rápida o infusión intravenosa sostenida, o para la liberación de una cápsula implantada. Una formulación típica para la administración intravenosa utiliza solución salina fisiológica como diluyente.

5 La dosis del anticuerpo realmente administrada a un paciente se debe determinar a la luz de varios factores relevantes incluyendo el anticuerpo específico a ser administrado, el tiempo de administración y la formulación en la composición, vía de administración, la enfermedad a ser tratada, y el peso corporal, edad, género, estado de salud y dieta de un paciente. Una dosis típica puede variar desde 0,01 mg/kg/día hasta 1.000 mg/kg/día. Más típicamente, la dosis puede variar desde 0,1 mg/kg/día hasta 10 mg/kg/día.

10 Se pretende que los siguientes Ejemplos ilustren adicionalmente la presente invención sin limitar su ámbito.

Ejemplo 1

15 *Construcción de un gen que codifica una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo humanizado*

Se llevó a cabo PCR usando como molde un gen que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 (números de acceso de depósito: KCTC 10514BP y KCTC 10515BP) específico para TNF- α y un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 14, para amplificar el gen A que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado que lleva una secuencia líder. El producto de PCR amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y se recuperó del gel usando el kit de extracción QIAgel (Qiagen, EE UU).

25 El gen A obtenido de esta manera se sometió a PCR con un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 7 o SEQ ID NO: 6 y 14 para amplificar fragmentos de ADN, y se realizó una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 14. El producto de PCR amplificado se incubó con el vector TOPO (kit de clonación TOPO TA, Invitrogen Inc., EE UU) a temperatura ambiente durante 45 minutos para ser clonado, y el vector clonado se transformó en *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Inc., EE UU). Después de incubar las *E. coli* transformadas en medio LB que contenía 100 μ g/ml de ampicilina, el plásmido se aisló de las *E. coli*, y se digirió con *EcoRI* (BioLabs Inc., EE UU) para preparar el gen B de alrededor de 450 pb que codifica la región variable de la cadena pesada.

30 Se llevó a cabo la PCR usando el gen B como molde y un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 9 o SEQ ID NO: 8 y 14 para amplificar fragmentos de ADN, y se llevó a cabo una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 14. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el producto de PCR amplificado se clonó en un vector TOPO y se digirió con *EcoRI* para preparar un gen C que codifica la región variable de la cadena pesada.

40 De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el gen C se sometió a PCR con un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 11 o SEQ ID NO: 10 y 14 para amplificar fragmentos de ADN y se realizó una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 14. El producto de PCR amplificado de esta manera se clonó en un vector TOPO para obtener el gen D que codifica la región variable de la cadena pesada. El gen D se sometió a PCR con un par de cebadores de SEQ ID NO: 4 y 14 o SEQ ID NO: 1 y 5 para amplificar fragmentos de ADN y se realizó una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 14. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el producto de PCR amplificado de esta manera se clonó en un vector TOPO para obtener un gen E que codifica la región variable de la cadena pesada.

50 Además, se llevó a cabo PCR usando el gen E como molde y un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 3 o SEQ ID NO: 2 y 14 para amplificar fragmentos de ADN y se realizó una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 14. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el producto de PCR se clonó en un vector TOPO para obtener el gen TNH2V (SEQ ID NO: 31) que codifica la región variable de la cadena pesada y el vector TOPO con TNH2V insertado se designó pCR-TNH2V Hv.

55 De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se llevó a cabo PCR usando TNH2V como molde y un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 13 o SEQ ID NO: 12 y 14 para amplificar fragmentos de ADN y se realizó una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 14. El producto de PCR se clonó en un vector TOPO para obtener otro gen que codifica la región variable de la cadena pesada. El gen se designó TNH2V2k (SEQ ID NO: 32) y el vector TOPO con el gen TNH2V2k insertado se designó pCR-TNH2V2k Hv.

60 Además, de la misma manera que se ha descrito anteriormente, se llevó a cabo PCR usando el gen TNH2V2k como molde y un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 15, y el producto de PCR se clonó en un vector TOPO para obtener aún otro gen que codifica la región variable de la cadena pesada. El gen se designó TNH1k (SEQ ID NO: 33) y el vector TOPO con TNH1k insertado se designó pCR-TNH1k Hv.

ES 2 359 567 T9

Los pares de cebadores y condiciones de reacción empleados en cada reacción de PCR se muestran en la Tabla 1. Cada reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones de 30 ciclos como se muestra en la Tabla 1 después de una desnaturalización inicial de 7 minutos a 95°C, y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

5

TABLA 1

	Par de cebadores	Gen	Condiciones de PCR		
			Desnaturalización	Hibridación	Extensión
10	SEQ ID NO: 1 y 14	A	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 6 y 14	B	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
15	SEQ ID NO: 1 y 7		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 8 y 14	C	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
20	SEQ ID NO: 1 y 9		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 10 y 14	D	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
25	SEQ ID NO: 1 y 11		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 4 y 14	E	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 1 y 5		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
30	SEQ ID NO: 2 y 14	TNHV2	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 1 y 3		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
35	SEQ ID NO: 12 y 14	TNHV2k	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 1 y 13		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
40	SEQ ID NO: 1 y 15	TNHV1k	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min

Ejemplo 2

45 *Construcción de un gen de la cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo humanizado y un vector de expresión del mismo*

Para construir el gen que codifica la cadena pesada de longitud completa usando el gen que codifica la región variable de la cadena pesada insertada en el vector pCR-TNHV2 Hv preparado en el Ejemplo 1, se empleó el vector pHAB-HC (KCTC 10229BP, publicación de patente coreana accesible al público No. 2004-12266) que contiene el gen que codifica la región constante de la cadena pesada del anticuerpo humano.

55 Primero, para insertar el gen TNHV2 que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado en el vector de expresión pHAB-HC, pCR-TNHV2 Hv se trató con *HindIII*/*ApaI* (BioLabs, Inc., EE UU) a 37°C durante 2 horas, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y se tiñó con bromuro de etidio (EtBr), y se observó un fragmento del gen de alrededor de 450 pb.

60 Además, pHAB-HC se trató con *HindIII*/*ApaI*, se sometió a electroforesis y se tiñó, y se observó un fragmento del vector digerido de alrededor de 6,5 kb. Después de ello, los fragmentos génicos observados se recuperaron de los geles usando un kit de extracción QIAgel (Qiagen, EE UU), se trataron con ADN ligasa de T4 (BioLabs, Inc., EE UU) a 16°C durante la noche y se transformaron en *E. coli* TOP10F' para obtener un transformante. El transformante se cultivó en un medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina durante la noche, y se aisló un plásmido del mismo. El plásmido aislado se trató con *HindIII*/*NotI* y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, para obtener un gen de cadena pesada de longitud completa de alrededor de 1,4 kb del anticuerpo humanizado.

65 El gen de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo humanizado preparado de esta manera se designó TNHV2 HF. Además, el vector de expresión con TNHV2 HF insertado se designó pHAB-TNHV2 HF (Fig. 3) y se transformó en *E. coli* TOP10F' para obtener un transformante, que se depositó el 1 de septiembre de 2004 en la

ES 2 359 567 T9

colección Coreana para Cultivos Tipo (KCTC) (dirección: Instituto de Investigación de Biociencia y Biotecnología de Corea (KRIBB), #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, 305-333, República de Corea) con el número de acceso KCTC 10691BP.

5 De la misma manera que se ha descrito anteriormente, también se preparó el gen de longitud completa de la cadena pesada del anticuerpo humanizado usando los genes TNHV2k o TNHV1k, y los genes de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo humanizado preparados de esta manera se designaron TNHV2k HF o TNHV1k HF, respectivamente. Además, el vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo humanizado con el gen de la cadena pesada de longitud completa, TNHV2k HF o TNHV1k HF, insertado se designó pHAB-TNHV2k HF o pHAB-TNHV1k HF (Figs. 4 y 5), respectivamente, y la *E. coli* TOP10F' transformada con pHAB-TNHV2k HF o pHAB-TNHV1k HF se depositó el 1 de septiembre de 2004 o el 13 de junio de 2005, respectivamente, en la Colección Coreana para Cultivos Tipo (KCTC) con los números de acceso KCTC 10692BP y KCTC 10818BP, respectivamente.

Ejemplo 3

15 *Construcción de un gen que codifica una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado*

Se llevó a cabo PCR usando como molde el gen que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 que reconoce específicamente TNF- α y un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 30, para amplificar un gen A que codifica la región variable de la cadena ligera que contiene una secuencia líder. El gen A se sometió a electroforesis en gel de agarosa y tinción con EtBr y se recuperó del gel usando un kit de extracción QIAgel.

25 El gen A purificado de esta manera se sometió a PCR con un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 25 o SEQ ID NO: 24 y 30 para amplificar fragmentos de ADN y se llevó a cabo una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 30. El producto de PCR amplificado se incubó con el vector TOPO (kit de clonación TOPO TA, Invitrogen Inc., EE UU) a temperatura ambiente durante 45 minutos y el vector clonado se transformó en *E. coli* TOP10F' para obtener un transformante. Después de incubar el transformante en medio LB que contenía 100 μ g/ml de ampicilina durante la noche, el plásmido se aisló de *E. coli* y se digirió con *EcoRI* (BioLabs Inc., EE UU) para obtener el gen B de alrededor de 400 pb que codifica la región variable de la cadena ligera.

35 Se realizó PCR usando el gen B como molde y un par de cebadores de SEQ ID NO: 26 y 30 o SEQ ID NO: 16 y 27 para amplificar fragmentos de ADN y se llevó a cabo una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 30. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el producto de PCR amplificado se clonó en un vector TOPO y se digirió con *EcoRI* para preparar el gen C que codifica la región variable de la cadena ligera.

40 De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el gen C se sometió a PCR con un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 23 o SEQ ID NO: 22 y 30 para amplificar fragmentos de ADN y se llevó a cabo una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 30. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el producto de PCR amplificado de esta manera se clonó en un vector TOPO para obtener el gen D que codifica la región variable de la cadena ligera.

45 Se obtuvo el gen E que codifica la región variable de la cadena ligera realizando PCR usando el gen D como molde con un par de cebadores de SEQ ID NO: 18 y 30 o SEQ ID NO: 16 y 19 para amplificar fragmentos de ADN y se llevó a cabo una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 30. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el producto de PCR amplificado de esta manera se clonó en un vector TOPO.

50 Se obtuvo el gen F que codifica la región variable de la cadena ligera realizando PCR usando el gen E como molde con un par de cebadores de SEQ ID NO: 20 y 30 o SEQ ID NO: 16 y 21 para amplificar fragmentos de ADN y se llevó a cabo una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 30. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el producto de PCR amplificado de esta manera se clonó en un vector TOPO.

55 Además, se realizó PCR usando el gen F como molde y un par de cebadores de SEQ ID NO: 28 y 30 o SEQ ID NO: 16 y 29 para amplificar fragmentos de ADN y se llevó a cabo una PCR solapante usando los fragmentos de ADN resultantes con un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 30. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el producto de PCR se clonó en el vector TOPO para obtener el gen TNLV2 (SEQ ID NO: 34) que codifica la región variable de la cadena ligera, y el vector TOPO con el gen TNLV2 insertado se designó pCR-TNLV2 Lv.

65 Además, de la misma manera que se ha descrito anteriormente, se llevó a cabo PCR usando TNHV2 como molde y un par de cebadores de SEQ ID NO: 16 y 17 para amplificar un fragmento de ADN y el fragmento se sometió a PCR usando un cebador de SEQ ID NO: 30 como un megacebador para obtener un gen que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado. El gen se designó TNLV2d (SEQ ID NO: 35) y el vector TOPO con TNLV2d insertado se designó pCR-TNLV2d Lv.

ES 2 359 567 T9

Los pares de cebadores y las condiciones de PCR empleadas en las reacciones de PCR anteriores se describen en la siguiente Tabla 2. Cada una de las reacciones de PCR se realizó en las condiciones de 30 ciclos como se muestra en la Tabla 2 después de una desnaturalización inicial de 7 minutos a 95°C, y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

5

TABLA 2

	Par de cebadores	Gen	Condiciones de PCR		
			Desnaturalización	Hibridación	Extensión
10	SEQ ID NO: 16 y 30	A	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
15	SEQ ID NO: 24 y 30	B	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 25 y 16		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
20	SEQ ID NO: 26 y 30	C	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 27 y 16		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
25	SEQ ID NO: 22 y 30	D	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 23 y 16		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
30	SEQ ID NO: 18 y 30	E	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 19 y 16		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
35	SEQ ID NO: 20 y 30	F	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 21 y 16		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
40	SEQ ID NO: 28 y 30	TNLV2	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 29 y 16		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 16 y 17	TNLV2d	95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min
	SEQ ID NO: 30		95°C, 2 min	58°C, 1,5 min	72°C, 2 min

Ejemplo 4

45

Construcción de un gen de la cadena ligera de longitud completa de un anticuerpo humanizado y un vector de expresión del mismo

50 Para construir el gen que codifica la cadena ligera de longitud completa humanizada usando el gen que codifica la región variable de la cadena ligera insertado en el vector pCR-TNLV2 Lv preparado en el Ejemplo 3, se empleó el vector de expresión pHAB-KC (KCTC 10230BP, publicación de patente coreana accesible al público No. 2004-12268) que contiene el gen que codifica la región constante de la cadena ligera del anticuerpo humano.

55 Primero, para insertar el gen TNLV2 que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado en el vector de expresión pHAB-KC, pCR-TNLV2 Lv se trató con *HindIII/BsiWI* (BioLabs, Inc., EE UU) a 37°C durante 2 horas, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y se tiñó con bromuro de etidio (EtBr) y se observó un fragmento del gen de alrededor de 400 pb.

60 De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el vector de expresión pHAB-KC también se trató con *HindIII/BsiWI* y se observó un fragmento del vector digerido de alrededor de 6,5 kb. Después de ello, los fragmentos génicos observados se recuperaron de los geles usando un kit de extracción QIAgel (Qiagen, EE UU), se trataron con ADN ligasa de T4 (BioLabs, Inc., EE UU) a 16°C durante la noche y se transformaron en *E. coli* TOP10F' para obtener un transformante. El transformante se cultivó en un medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina durante la noche, y se aisló un plásmido del medio de cultivo. El plásmido aislado se trató con *HindIII/NotI* (BioLabs, Inc., EE UU) y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, para obtener un gen de cadena ligera de longitud completa de 65 alrededor de 0,7 kb del anticuerpo humanizado.

ES 2 359 567 T9

El gen de la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo humanizado preparado de esta manera se designó TNLV2 LF. Además, el vector de expresión con TNLV2 LF insertado se designó pHAB-TNLV2 LF (Fig. 6) y se transformó en *E. coli* TOP10F' para obtener un transformante, que se depositó el 1 de septiembre de 2004 en la colección Coreana para Cultivos Tipo (KCTC) con el número de acceso KCTC 10690BP.

De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se preparó un gen de la cadena ligera de longitud completa usando el gen TNLV2d y el gen de la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo humanizado preparado de esta manera se designó TNLV2d LF. Además, el vector de expresión con TNLV2d LF insertado se designó pHAB-TNLV2d LF (Fig. 7) y se transformó en *E. coli* TOP10F' para obtener un transformante, que se depositó el 13 de junio de 2005 en la colección Coreana para Cultivos Tipo (KCTC) con el número de acceso KCTC 10817BP.

Ejemplo 5

Transformación de un anticuerpo humanizado en líneas de células CHO

Para medir la actividad del anticuerpo humanizado en células animales, el vector de expresión de la cadena pesada pHAB-TNHV2 HF preparado en el Ejemplo 2 y el vector de expresión de la cadena ligera pHAB-TNLV2 LF preparado en el Ejemplo 4 se transfectoron en la línea celular CHO (ATCC CRL-9096, EE UU) como sigue.

Primero, se hicieron crecer células CHO en medio DMEM/F12 (JHR Inc., EE UU) suplementado con 2,0 g/l de bicarbonato de sodio (Sigma, EE UU) y SBF al 10% inactivado por calor (Gibco BRL, EE UU) en un incubador con CO₂ a 37°C humidificado durante 2 a 3 días. Las células cultivadas se recogieron centrifugando la solución de cultivo a 1.200 rpm y temperatura ambiente (25°C) durante 5 minutos, se tiñeron con azul de tripán al 0,4% (Gibco BRL, EE UU) y se contaron con un hematocitómetro. Las células se sembraron en una botella T-75 en una cantidad de alrededor de 3x10⁵ células para ser subcultivadas.

Las células CHO sembradas se dejaron proliferar hasta que ocuparon la superficie de la botella a una densidad del 60 al 90%. Se mezclaron 10 µg de pHAB-TNHV2 HF, 10 µg de pHAB-TNLV2 y 80 µl de solución GenePORTER (GTS, EE UU) para transfección con 5 ml de medio DMEM/F12 (sin suero). Después de mantener la mezcla a temperatura ambiente durante 10 a 45 minutos, el medio de cultivo se retiró de la botella y las células CHO subcultivadas se incubaron con la mezcla en un incubador con CO₂ a 37°C humidificado durante 3 a 5 horas, para obtener un transfectante designado CHO-YHB1406.

Según la misma manera que se ha descrito anteriormente, el vector de expresión de la cadena pesada pHAB-TNHV2k HF y el vector de expresión de la cadena ligera pHAB-TNLV2 LF, el vector de expresión de la cadena pesada pHAB-TNHV2k HF y el vector de expresión de la cadena ligera pHAB-TNLV2d LF, o el vector de expresión de la cadena pesada pHAB-TNHV1k HF y el vector de expresión de la cadena ligera pHAB-TNLV2d LF, que se prepararon en los Ejemplos 2 y 4, respectivamente, se transfectoron en células CHO para obtener transfectantes, que se designaron CHO-YHB1411, CHO-YHB1411-2 y CHO-YHB1406-2, respectivamente.

Ejemplo 6

Purificación de un anticuerpo humanizado

Las células transfectantes CHO-YHB1406 obtenidas en el Ejemplo 5 se sembraron en una botella T-75 que contenía medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino fetal al 10% en una cantidad de 2x10⁵ células, y la botella se incubó en un incubador con CO₂ a 37°C humidificado durante 7 días para expresar el anticuerpo humanizado. El medio de cultivo se recogió, se centrifugó y se filtró para obtener una solución de cultivo sin células que comprendía anticuerpos.

Para purificar el anticuerpo humanizado de la solución, se emplearon columnas de flujo rápido de sepharosa 4 conjugada con proteína A (Pharmacia) e inmunoglobulina G anti-humana de cabra (Zymed Laboratories Inc., EE UU), respectivamente. El medio de cultivo que comprendía los anticuerpos se aplicó a una columna de flujo rápido de sepharosa 4 conjugada a proteína A para dejar que el anticuerpo humanizado se uniera a la proteína A, y se introdujo en la columna un tampón de glicina (pH 2,5) para eluir el anticuerpo humanizado. Después, el eluido se neutralizó mezclándolo con Tris-HCl 1 M (pH 8,0) en una relación en volumen de 1:10, y se sometió a una columna de flujo rápido de sepharosa 4 conjugada con IgG anti-humana de cabra para permitir que la columna capturara específicamente la proteína del anticuerpo.

El anticuerpo humanizado se eluyó según el mismo método que se ha descrito anteriormente, y el anticuerpo humanizado purificado se designó YHB1406.

Según la misma manera que se ha descrito anteriormente, se cultivaron los transfectantes CHO-YHB1411, CHO-YHB1411-2 y CHO-YHB1406-2, preparados en el Ejemplo 5, y los anticuerpos producidos por los mismos se purificaron, respectivamente, para obtener los anticuerpo humanizados purificados designados YHB1411, YHB1411-2 e YHB-1406-2, respectivamente.

ES 2 359 567 T9

Como resultado de analizar los anticuerpos humanizados purificados con SDS-PAGE, se observaron bandas de alrededor de 50 kDa y alrededor de 25 kDa, que se identificaron como la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo humanizado, respectivamente (Fig. 8).

5 Ejemplo 7

Medida de la afinidad de unión al antígeno de un anticuerpo humanizado contra hTNF- α

10 Los anticuerpos humanizados purificados en el Ejemplo 6 se cuantificaron con ELISA competitivo, y sus actividades de unión al antígeno se analizaron usando un hTNF- α recombinante (Biosource, EE UU). Para la cuantificación del anticuerpo, se añadieron 100 ng de inmunoglobulina G.A.M. anti-humana de cabra (Zymed Laboratories, Inc., EE UU) en cada pocillo de una microplaca (Dynatech Laboratories Inc., EE UU) y la placa se mantuvo a 4°C durante la noche para recubrirla con la inmunoglobulina. En este momento, se usó el anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 como control.

15 Para medir la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado al antígeno hTNF- α recombinante, se mezclaron soluciones del antígeno (100 μ l de cada una) a varias concentraciones que variaban desde 10^{-11} a 10^{-7} M con 5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón TSK114, anticuerpos humanizados YHB1406, YHB1411, YHB1411-2 e YHB1406-2, respectivamente y se hicieron reaccionar a 37°C durante 2 horas. Cada uno de los reactivos se añadió a la placa recubierta con 0,4 μ g del antígeno y la placa se mantuvo a 37°C durante alrededor de 1,5 horas. Se diluyó un anticuerpo policlonal de cabra anti-humano (BioRad, EE UU) conjugado con peroxidasa de rábano a una relación 1:1000 y se añadieron a cada pocillo 100 μ l de la solución de anticuerpo diluido. La placa se mantuvo a 37°C durante 20 1 hora. Después de terminar la reacción, se midió la densidad óptica de cada pocillo usando un kit substrato de peroxidasa de rábano (BioRad, EE UU).

25 Se calcularon las concentraciones del anticuerpo unido al antígeno y del anticuerpo sin unir a partir de las densidades ópticas medidas, y se determinó la afinidad de unión al antígeno de los anticuerpos humanizados a partir de ellas (Friguet B. *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 77: 305-319, 1985). Los resultados se muestran en la Tabla 3 y la Figura 9.

30

TABLA 3

Antígeno	Afinidad de unión al antígeno (Kd)
Anticuerpo de ratón TSK114	$1,4 \times 10^{-10}$ M
Anticuerpo humanizado YHB1406	$2,2 \times 10^{-10}$ M
Anticuerpo humanizado YHB1411	$2,0 \times 10^{-10}$ M
Anticuerpo humanizado YHB1411-2	$2,0 \times 10^{-10}$ M
Anticuerpo humanizado YHB1406-2	$2,9 \times 10^{-10}$ M

45 Como se puede ver en la Tabla 3 y la Figura 9, las afinidades de unión al antígeno de los anticuerpos humanizados YHB1406, YHB1411, YHB1411-2 e YHB1406-2 eran similares a la del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114.

Ejemplo 8

Prueba de la capacidad de neutralización in vitro del anticuerpo humanizado

50 Se determinaron las capacidades de los anticuerpos humanizados inventivos para neutralizar el antígeno hTNF- α *in vitro* empleando la línea celular WHEI 164 (ATCC CRL-1751, EE UU), como sigue (Khabar KSA *et al.*, *Immunol. Lett.* 46; 107-110, 1995).

55 Se diluyeron el anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 y los anticuerpos humanizados YHB1406, YHB1411, YHB1411-2 e YHB1406-2 en tampón PBS a varias concentraciones que variaban desde 0,024 ng/ml a 1,0 μ g/mL, respectivamente, y cada 100 μ l de las diluciones resultantes se añadieron a los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos. Se añadieron 50 μ l de solución de hTNF- α (100 pg/mL) a cada pocillo y se llevó a cabo una reacción a 37°C durante 1 hora. Después, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de líneas de células WHEI 164 (1×10^6 células/ml) tratadas con actinomicina D 2 μ g/ml (Sigma, EE UU).

65 Las células se cultivaron a 37°C durante 24 horas, y se retiraron 100 μ l de la solución de cultivo. Se añadieron a cada pocillo de la placa de cultivo 20 μ l de una solución de metil tiazol tetrazolio (MTT, Sigma, EE UU) diluida en tampón PBS a una concentración de 5 mg/mL y la placa se incubó a 37°C durante 4 horas para desarrollar el color. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de solución HCl 0,1 N-SDS al 10% (Sigma, EE UU) para disolver por completo el precipitado coloreado y se midió la absorbancia de cada pocillo a 595 nm.

ES 2 359 567 T9

A partir de los datos de absorbancia obtenidos anteriormente, se dibujó una curva de índice de supervivencia de las líneas celulares WHEI 164 frente a concentración de anticuerpo. Se calculó la concentración de los anticuerpos que inhibía la muerte celular en un 50% (IC_{50}) a partir de la curva, y los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Capacidades de neutralización del antígeno de los anticuerpos

Antígeno	IC_{50} (ng/mL)
Anticuerpo de ratón TSK114	4,7
Anticuerpo humanizado YHB1406	9,2
Anticuerpo humanizado YHB1411	6,7
Anticuerpo humanizado YHB1411-2	5,5
Anticuerpo humanizado YHB1406-2	6,5

Como se muestra en la Tabla 4, la IC_{50} del anticuerpo monoclonal de ratón (TSK114) fue 4,7 ng/mL, y las de los anticuerpos humanizados inventivos YHB1406, YHB1411, YHB1411-2 e YHB1406-2 fueron 9,2 ng/mL, 6,7 ng/mL, 5,5 ng/mL y 6,5 ng/mL, respectivamente. Este resultado muestra que los anticuerpos humanizados tienen capacidades de neutralización del antígeno *in vitro* similares a las del anticuerpo monoclonal de ratón.

Ejemplo 9

Medida de la afinidad de unión al antígeno de un anticuerpo humanizado contra hTNF- α por SPR

Se midieron las afinidades de unión a hTNF- α de un anticuerpo monoclonal de ratón y de un anticuerpo humanizado mediante el método de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Específicamente, se inmovilizó hTNF- α (Biosource, EE UU) en un chip sensor CM5 (Biacore, Suecia) a una concentración de 200 μ g/ml y se hizo reaccionar con anticuerpo monoclonal de ratón TSK114 o anticuerpo humanizado YHB-1411-2 a 25, 50, 100, 200 y 400 nM, respectivamente. Después, se midieron las constantes de asociación y disociación de las reacciones mediante Biacore2000 (Biacore, Suecia).

A partir de las constantes de asociación y disociación medidas anteriormente, se calcularon las afinidades de unión al antígeno de los anticuerpos y los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Comparación de las afinidades de unión a hTNF- α del anticuerpo monoclonal de ratón y el anticuerpo humanizado

Anticuerpo	Constante de asociación (K_{on} , $M^{-1}s^{-1}$)	Constante de disociación (K_{off} , s^{-1})	Afinidad de unión al antígeno (Kd , M)
TSK114	$4,12 \times 10^4$	$2,39 \times 10^{-7}$	$5,79 \times 10^{-12}$
YHB1411-2	$3,96 \times 10^4$	$6,80 \times 10^{-8}$	$1,71 \times 10^{-12}$

Como se muestra en la Tabla 5, el anticuerpo humanizado inventivo YHB1411-2 mostró una afinidad de unión al antígeno alta del nivel de picomoles (10^{-12} M) y una constante de disociación baja. Además, la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado YHB1411-2 fue mayor en alrededor de 3 veces que la del anticuerpo monoclonal de ratón TSK114.

ES 2 359 567 T9

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado específico para el factor de necrosis tumoral- α humano (hTNF- α) que comprende:

- 5
- a) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38;
 - b) una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 o 40;
 - 10 c) una región constante de la cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano; y
 - d) una región constante de la cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano.

15 2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde la afinidad de unión al antígeno (K_d) del anticuerpo varía desde 1×10^{-9} M hasta 1×10^{-13} M.

3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde la constante de disociación (K_{off}) del anticuerpo varía desde 1×10^{-6} s $^{-1}$ hasta 1×10^{-9} s $^{-1}$, que se determina mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR).

20 4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde la región variable de la cadena pesada del anticuerpo está codificada por un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31, 32 o 33.

25 5. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde la región variable de la cadena ligera del anticuerpo está codificada por un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 34 o 35.

30 6. Un vector de expresión para el anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, que comprende un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37 o 38 y un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de secuencia SEQ ID NO: 39 o 40.

35 7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para tratar una enfermedad relacionada con hTNF- α , seleccionada del grupo que consiste en: artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, psoriasis, septicemia, asma, granulomatosis de Wegener, inflamación y espondilitis anquilosante.

FIG. 1

TSK114H: QVQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT HYGMNWKQA PEGLEKMMGW INTNTGEPRY
Hh1: QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQA PGQGLEWMMGW INPNSGGTNY
TNHV2: QVQLVQSGPE LKKPGASVKV SCKASGYTFT HYGMNWKQA PGQGLEWMMGW INTNTGEPRY
TNHV2k: QVQLVQSGPE LKKPGASVKV SCKASGYTFT HYGMNWKQA PGKGLEWMMGW INTNTGEPRY
TNHV1k: QVQLVQSGPE LKKPGASVKV SCKASGYTFT HYGMNWKQA PGKGLEWMMGW INTNTGEPRY

TSK114H: DEEFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLRRER TATYFCARYD SRGEDCWGQG TLLTVSS (SEQ ID NO: 47)
Hh1: AQKFQGRVTM TRDTSASTAY MELSSLRSED TAVYICAR-- ---- (SEQ ID NO: 48)
TNHV2: DEEFKGRVTM TRDTSASTAY MELSSLRSED TAVYICARYD SRGEDCWGQG TTVTIVSS (SEQ ID NO: 36)
TNHV2k: DEEFKGRVTM TRDTSASTAY MELSSLRSED TAVYICARYD SRGEDCWGQG TTVTIVSS (SEQ ID NO: 37)
TNHV1k: DEEFKGRVTM TRDTSASTAY MELSSLRSED TAVYICARYD SRGEDCWGQG TLLTVSS (SEQ ID NO: 38)

FIG. 2

TSK114L: QIVLTQSPAI MSASLGERVT MTCTASSSIS YNYFHWYQQR PGSSPKLWIY SSSNLAGSVP
Hk1: QIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCQASQDIS -NYLNWYQQK PGKAPKLLIY DASNLEIGVP
TNLV2: QIVMTQSPSS LSASVGERVT ITCTASSSIS YNYFHWYQQK PGSAPKLIY SSSNLAGSVP
TNLV2d: DIVMTQSPSS LSASVGERVT ITCTASSSIS YNYFHWYQQK PGSAPKLIY SSSNLAGSVP

TSK114L: PRISGSGSGT SYSLTISSME AEDAATYICH QYERSPWTFG GGTKLEIKR (SEQ ID NO: 49)
Hk1: SRFSGSGSGT DFTFFISSLQ PEDIATYICQ QYDNLP- (SEQ ID NO: 50)
TNLV2: SRFSGSGSGT DFTFFISSLQ PEDIATYICH QYERSPWTFG GGTKVEIKR (SEQ ID NO: 39)
TNLV2d: SRFSGSGSGT DFTFFISSLQ PEDIATYICH QYERSPWTFG GGTKVEIKR (SEQ ID NO: 40)

FIG. 3

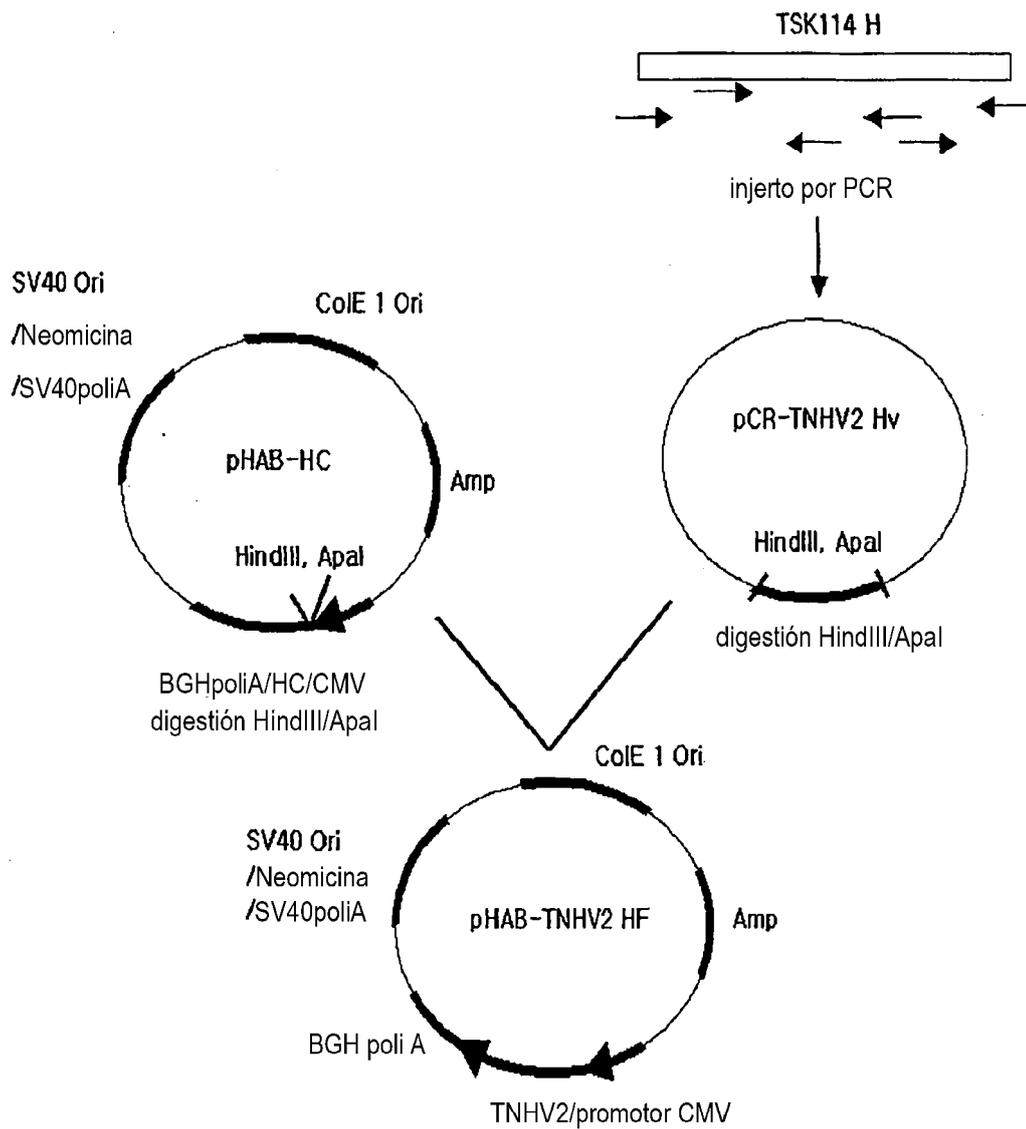


FIG. 4

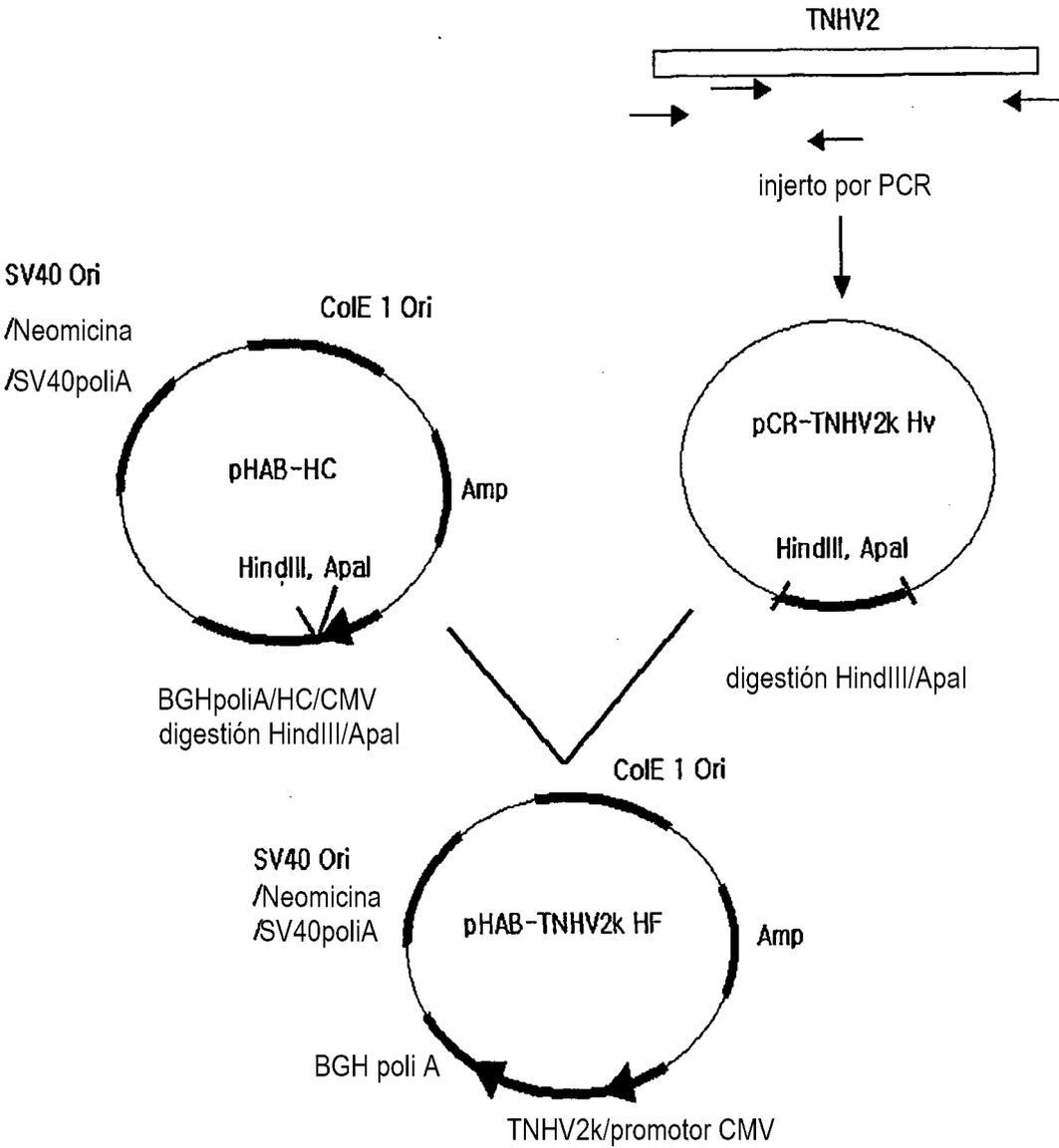


FIG. 5

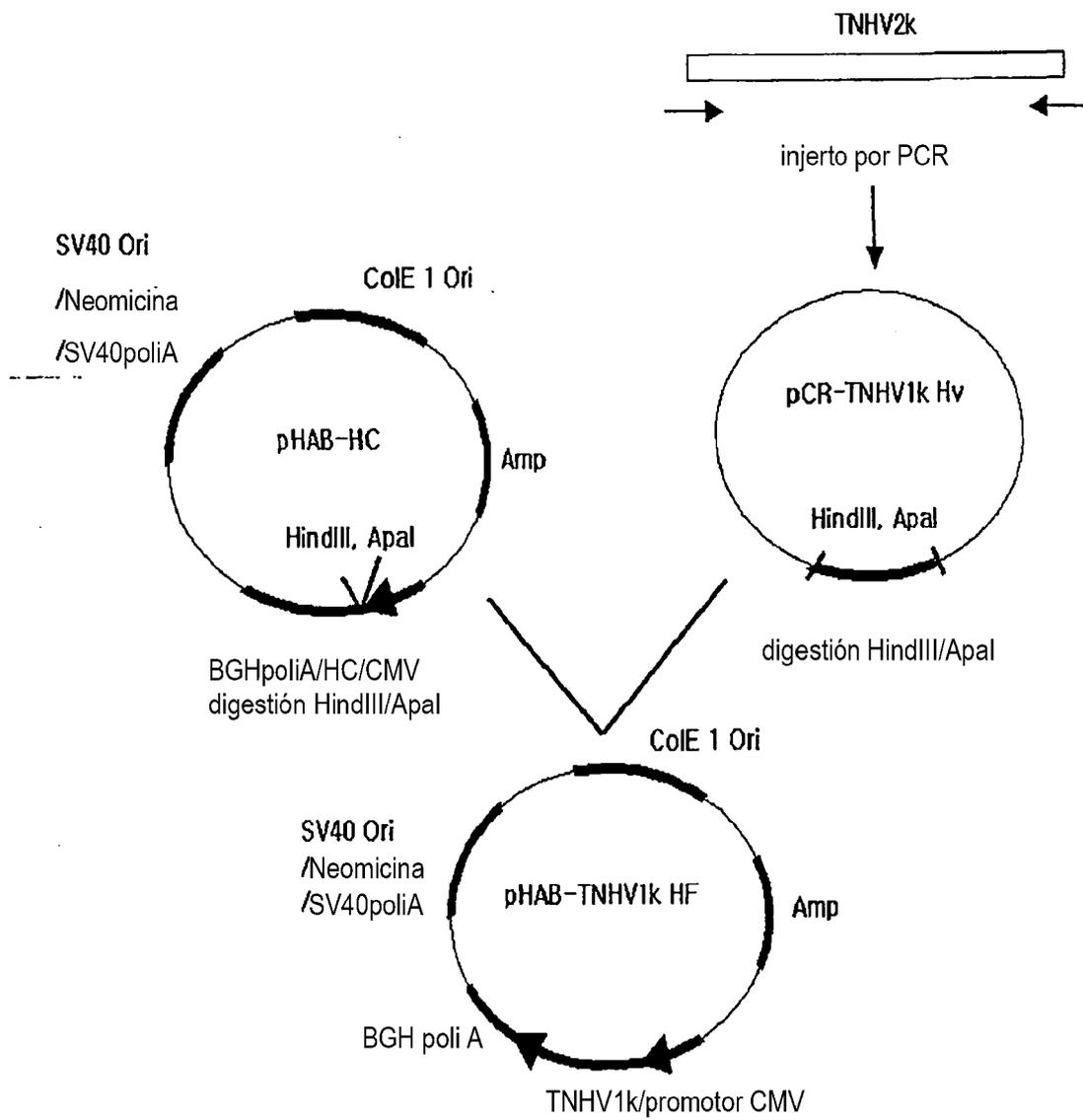


FIG. 6

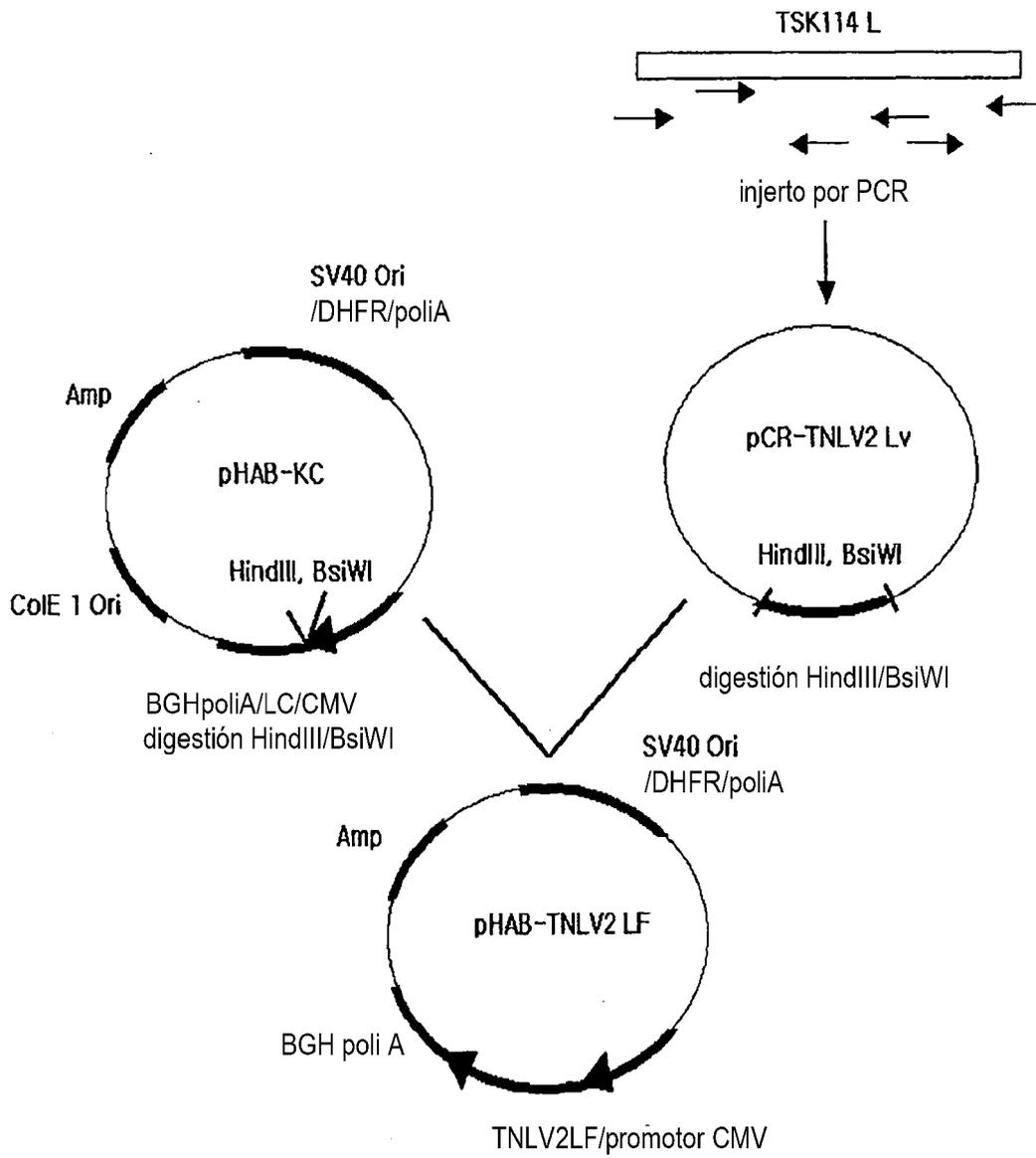


FIG. 7

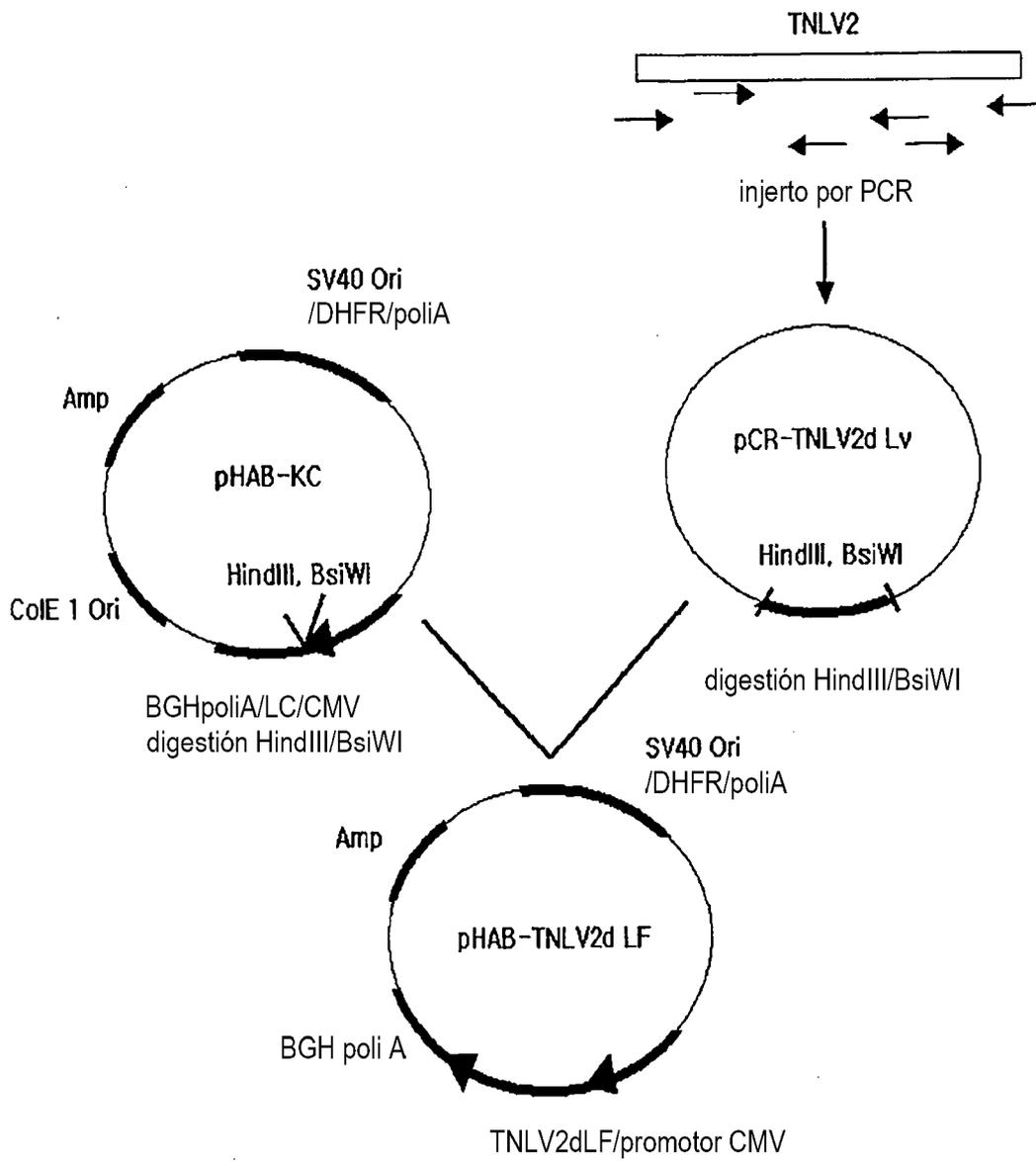
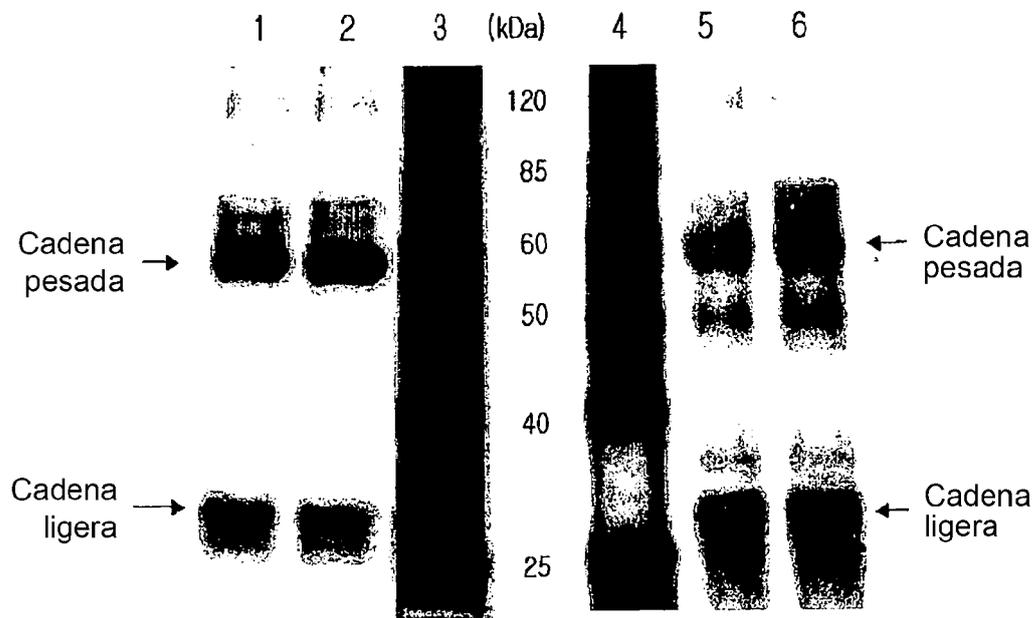
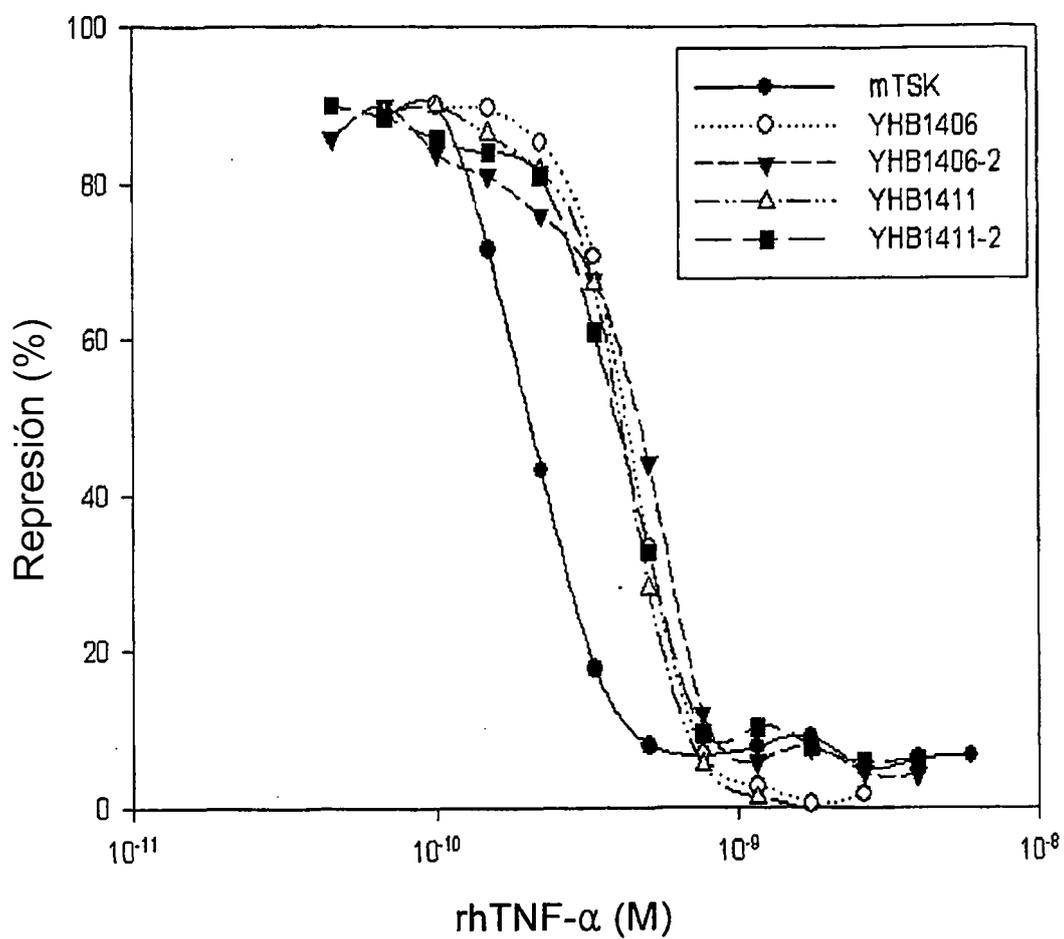


FIG. 8



- 1. Ac humanizado YHB1406
- 2. Ac humanizado YHB1411
- 3. Marcador tamaño proteínas
- 4. Marcador tamaño proteínas
- 5. Ac humanizado YHB1406-2
- 6. Ac humanizado YHB1411-2

FIG. 9



ES 2 359 567 T9

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> YUHAN CORPORATION
- 5 <120> ANTICUERPO HUMANIZADO ESPECÍFICO PARA EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α
- <130> EP52431HV12pau
- 10 <140> EP 05 823 880.9
<141> 2005-12-29
- 15 <150> PCT/KR2005/004634
<151> 2005-12-29
- <150> KR 10-2004-0115709
20 <151> 2004-12-29
- <160> 50
- 25 <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
<211> 40
<212> DNA
30 <213> Artificial Sequence
- <220>
35 <223> cebador
- <400> 1
- 40 **aaagcttatg gattgggtgt ggaacttgct attcctgatg** **40**
- <210> 2
<211> 33
45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
50 <223> cebador
- <400> 2
- 55 **cctggagcgt cagtcaaggt ctctgcaag gct** **33**
- <210> 3
60 <211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- 65 <220>
<223> cebador

ES 2 359 567 T9

<400> 3

cttgaggag accttgactg acgctccagg cttctt

36

5

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

15

<223> cebador

<400> 4

gtgaggcagg ctccaggaca gggtttagag tggatgggc

39

20

<210> 5

<211> 45

25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> cebador

<400> 5

gcccattcac tctaaacct gtcctggagc ctgcctcacc cagtt

45

35

<210> 6

40

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

45

<223> cebador

<400> 6

50

ggacggggtta ccatgactag ggacacctct gccagcact

39

<210> 7

55

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60

<220>

<223> cebador

<400> 7

65

ggcagagggtg tccttagtca tggtaacccg tccctt

36

ES 2 359 567 T9

	<210> 8		
	<211> 39		
	<212> DNA		
5	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> cebador		
10	<400> 8		
15	gcctatatgg agctcagcag cctcagaagt gaggacacg		39
	<210> 9		
	<211> 42		
20	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
25	<223> cebador		
	<400> 9		
30	cggtgcctca cttctgaggc tgctgagctc catataggca gt		42
	<210> 10		
35	<211> 36		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
40	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 10		
45	gacacggctg tatattactg tgcaagatat gattcc		36
	<210> 11		
50	<211> 36		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
55	<220>		
	<223> cebador		
60	<400> 11		
	atcatatctt gcacagtaat atacagccgt gtcctc		36
65	<210> 12		
	<211> 27		

ES 2 359 567 T9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> cebador

<400> 12

10

gtgaggcagg ctccaggaaa gggttta

27

<210> 13

15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> cebador

25

<400> 13

gcccatccac tctaaaccct ttcctgg

27

<210> 14

30

<211> 38

<212> DNA

35

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cebador

40

<400> 14

tgggcccttg gtggaggctg aggagactgt gacagtgg

38

45

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

50

<213> Artificial Sequence

<220>

55

<223> cebador

<400> 15

tgggcccttg gtggaggctg aggagactgt gagagtgg

39

60

<210> 16

<211> 43

65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 359 567 T9

	<220>		
	<223> cebador		
5	<400> 16		
	aaagcttatg gatttacaag tgcagat ttt cagcttcctg cta		43
10	<210> 17		
	<211> 29		
	<212> DNA		
15	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> cebador		
20	<400> 17		
	cataacaata tctcctctgg acattatga		29
25	<210> 18		
	<211> 36		
	<212> DNA		
30	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> cebador		
35	<400> 18		
	gttatgaccc agtctccatc aagcctgtct gcatct		36
40	<210> 19		
	<211> 36		
45	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
50	<223> cebador		
	<400> 19		
55	agacaggctt gatggagact gggtcataac aatttg		36
	<210> 20		
60	<211> 33		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
65	<220>		
	<223> cebador		

ES 2 359 567 T9

<400> 20

gcacatctgtag gggaacgggt caccatcacc tgc

33

5

<210> 21

<211> 33

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> cebador

<400> 21

20 **ggtgatggtg acccgttccc ctacagatgc aga**

33

<210> 22

<211> 33

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30 <223> cebador

<400> 22

35 **cagcagaagc caggatccgc ccccaaactc tgg**

33

<210> 23

40 <211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

45 <223> cebador

<400> 23

50 **gagtttgggg gcggatcctg gcttctgctg ata**

33

55 <210> 24

<211> 33

<212> DNA

60 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> cebador

65

ES 2 359 567 T9

<400> 24		
5	tctgggaccg atttcacttt cacaatcagc agc	33
	<210> 25	
	<211> 33	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 25	
20	gctgctgatt gtgaaagtga aatcgggtccc aga	33
	<210> 26	
	<211> 33	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 26	
35	agcagcctgc agcctgaaga tattgccact tat	33
	<210> 27	
40	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
45	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 27	
50	agtggcaata tcttcaggct gcaggctgct gat	33
	<210> 28	
55	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
60	<220>	
	<223> cebador	
65	<400> 28	
	ggagtcccat ctcgcttcag tggcagt	27

ES 2 359 567 T9

<210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 5 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> cebador
 10
 <400> 29

cccactgcc **ctgaagcgag** **atgggactcc** **30**
 15

 <210> 30
 <211> 29
 20 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 25 <223> cebador

 <400> 30

 30 **gccaccgtac** **gtttgatttc** **caccttgg** **29**

 <210> 31
 35 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 40 <223> región variable de la cadena pesada humanizada, TNHV2

 <400> 31
 45
cagg**tccag****t** **tggt****gcag****tc** **tggac****ctgag** **ctgaaga****agc** **ctggag****cgtc** **agtca****agg****tc** **60**
tcct**gcaagg** **cttct****ggata** **tacct****tcaca** **cactat****ggaa** **tgaact****gggt** **gagg****cagg****ct** **120**
 50 **ccagg****acagg** **gttt****tagagt** **gat****ggg****ctgg** **ataaac****acca** **acact****ggaga** **gcca****agata****t** **180**
gat**gaag****agt** **tcaagg****gacg** **ggt****taccatg** **actagg****gaca** **cctct****gccag** **cact****gcctat** **240**
at**ggag****ctca** **gcag****cctcag** **aagt****gaggac** **acgg****ctgtat** **attact****gtgc** **aagata****tgat** **300**
 55 **tccagg****gggat** **ttgact****gctg** **ggg****ccaaggc** **accact****gtca** **cagt****ctcctc** **a** **351**

 <210> 32
 60 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 65 <223> región variable de la cadena pesada humanizada, TNHV2k

ES 2 359 567 T9

	<400> 32	
	caggtccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagcgtc agtcaaggtc	60
5	tcctgcaagg cttctggata taccttcaca cactatggaa tgaactgggt gaggcaggct	120
	ccaggaaagg gtttagagt gatgggctgg ataaacacca aactggaga gccaagatat	180
	gatgaagagt tcaagggacg ggttaccatg actagggaca cctctgccag cactgcctat	240
10	atggagctca gcagcctcag aagtgaggac acggctgtat attactgtgc aagatatgat	300
	tccaggggat ttgactgctg gggccaaggc accactgtca cagtctcctc a	351
15	<210> 33	
	<211> 351	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> región variable de la cadena pesada humanizada, TNHV1k	
25	<400> 33	
	caggtccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagcgtc agtcaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggata taccttcaca cactatggaa tgaactgggt gaggcaggct	120
30	ccaggaaagg gtttagagt gatgggctgg ataaacacca aactggaga gccaagatat	180
	gatgaagagt tcaagggacg ggttaccatg actagggaca cctctgccag cactgcctat	240
	atggagctca gcagcctcag aagtgaggac acggctgtat attactgtgc aagatatgat	300
35	tccaggggat ttgactgctg gggccaaggc accactctca cagtctcctc a	351
40	<210> 34	
	<211> 327	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
45	<220>	
	<223> región variable de la cadena ligera humanizada, TNLV2	
50	<400> 34	
	caaattgtta tgaccagtc tccatcaagc ctgtctgcat ctgtagggga acgggtcacc	60
	atcacctgca ctgccagctc aagtataagt tacaattact ttcactggta tcagcagaag	120
55	ccaggatccg cccccaaact ctggatttat agctcatcca atctggcttc tggagtcca	180
	tctcgcttca gtggcagtg gtctgggacc gatttcactt tcacaatcag cagcctgcag	240
	cctgaagata ttgccactta ttactgccac cagtatgagc gttccccgtg gacgttcggt	300
60	ggaggcacca aggtggaaat caaacgt	327
65	<210> 35	
	<211> 327	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

ES 2 359 567 T9

<220>

<223> región variable de la cadena ligera humanizada, TNLV2d

5 <400> 35

```

gatattgta tgaccagtc tccatcaagc ctgtctgcat ctgtagggga acgggtcacc      60
atcacctgca ctgccagctc aagtataagt tacaattact ttcaactggta tcagcagaag      120
ccaggatccg cccccaact ctggatttat agctcatcca atctggcttc tggagtccca      180
tctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc gatttcactt tcacaatcag cagcctgcag      240
cctgaagata ttgccactta ttactgccac cagtatgagc gttccccgtg gacgttcggt      300
ggaggcacca aggtggaaat caaacgt                                           327
    
```

20 <210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> región variable de la cadena pesada humanizada, TNHV2

30 <400> 36

```

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

55

<210> 37

<211> 117

60 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

65 <223> región variable de la cadena pesada humanizada, TNHV2k

ES 2 359 567 T9

<400> 37

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

<210> 38

<211> 117

<212> PRT

30 <213> Artificial Sequence

<220>

35 <223> región variable de la cadena pesada humanizada, TNHV1k

<400> 38

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

<210> 39

65 <211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

ES 2 359 567 T9

<220>

<223> región variable de la cadena ligera humanizada, TNLV2

5 <400> 39

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

<210> 40

30 <211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

35 <220>

<223> región variable de la cadena ligera humanizada, TNLV2d

40 <400> 40

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

<210> 41

65 <211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 359 567 T9

<400> 46

5 His₁ Gln Tyr Glu Arg₅ Ser Pro Trp Thr

<210> 47

<211> 117

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

15 <400> 47

Gln₁ Val Gln Leu Val₅ Gln Ser Gly Pro Glu₁₀ Leu Lys Lys Pro Gly₁₅ Glu
 20 Thr Val Lys Ile₂₀ Ser Cys Lys Ala Ser₂₅ Gly Tyr Thr Phe Thr₃₀ His Tyr
 Gly Met Asn₃₅ Trp Val Lys Gln Ala₄₀ Pro Gly Glu Gly₄₅ Leu Lys Trp Met
 25 Gly Trp₅₀ Ile Asn Thr Asn Thr₅₅ Gly Glu Pro Arg Tyr₆₀ Asp Glu Glu Phe
 30 Lys Gly Arg Phe Ala₇₀ Phe Ser Leu Glu Thr Ser₇₅ Ala Ser Thr Ala Tyr₈₀
 Leu Gln Ile Asn Asn₈₅ Leu Arg Arg Glu Asp₉₀ Thr Ala Thr Tyr Phe₉₅ Cys
 35 Ala Arg Tyr Asp₁₀₀ Ser Arg Gly Phe Asp₁₀₅ Cys Trp Gly Gln Gly₁₁₀ Thr Thr
 Leu Thr Val₁₁₅ Ser Ser

40 <210> 48

<211> 98

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

50 Gln₁ Val Gln Leu Val₅ Gln Ser Gly Ala Glu₁₀ Val Lys Lys Pro Gly₁₅ Ala
 Ser Val Lys Val₂₀ Ser Cys Lys Ala Ser₂₅ Gly Tyr Thr Phe Thr₃₀ Gly Tyr
 55 Tyr Met His₃₅ Trp Val Arg Gln Ala₄₀ Pro Gly Gln Gly₄₅ Leu Glu Trp Met
 60 Gly Trp₅₀ Ile Asn Pro Asn Ser₅₅ Gly Gly Thr Asn Tyr₆₀ Ala Gln Lys Phe
 Gln₆₅ Gly Arg Val Thr₇₀ Met Thr Arg Asp Thr₇₅ Ser Ala Ser Thr Ala Tyr₈₀
 65 Met Glu Leu Ser Ser₈₅ Leu Arg Ser Glu Asp₉₀ Thr Ala Val Tyr Tyr₉₅ Cys
 Ala Arg

ES 2 359 567 T9

<210> 49

<211> 109

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 49

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

30

<210> 50

<211> 95

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

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

60

65