



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 854**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) **A61P 7/06** (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61P 35/02** (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06730873 .4**

96 Fecha de presentación : **31.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1865058**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti-CD20.**

30 Prioridad: **31.03.2005 JP 2005-103093**
28.12.2005 JP 2005-378466

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

73 Titular/es: **BIOMEDICS Inc.**
4-18 Toyomi-cho
Chuo-ku, Tokyo, JP

72 Inventor/es: **Numazaki, Masanori;**
Nakamura, Tetsuo;
Usuda, Sadakazu y
Padlan, Eduardo A.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 359 854 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

Anticuerpo Monoclonal anti-CD20

Campo Técnico

- 5 La presente invención se relaciona con un anticuerpo monoclonal dirigido al antígeno CD20 humano. La presente invención se relaciona adicionalmente con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico y un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado producido por recombinación de gen, así como también un agente terapéutico para un tumor mediado por célula B o una enfermedad inmunológica que contiene cualquiera de estos anticuerpos como un ingrediente activo.
- 10 **Técnica Antecedente**
- Se conocen anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno CD20, B1, 2B8 (el nombre del anticuerpo quimérico es rituximab), 1F5, 2H7 y así sucesivamente. Por encima de todo, el rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico desarrollado por IDEC Pharmaceuticals Corporation, U.S., se ha establecido como un agente terapéutico estándar para linfoma no Hodgkin de baja malignidad (NHL), y se encuentra que tiene un efecto terapéutico en muchas enfermedades inmunológicas mediadas por células B. Por ejemplo, se dice que es efectiva para, en adición a tumores malignos tal como leucemia linfática crónica, enfermedad autoinmunes en las que un autoanticuerpo patogénico parece estar involucrado tal como anemia hemolítica autoinmune y púrpura trombocitopénica idiopática, y enfermedades inflamatorias tal como artritis reumatoide crónica y esclerosis múltiple (Documentos de no patente 14 a 17).
- 15 El CD20 es una molécula presente en la superficie celular de linfoma B y su expresión se ve en células B normales en sangre periférica, bazo, amígdala y médula ósea y así sucesivamente, así como también células B en la mayoría de tumores malignos. Esta molécula que comprende 297 residuos de aminoácido, penetra una membrana celular cuatro veces, y tiene el terminal C y el Terminal N dentro de la célula, y tiene solo el bucle extracelularmente expuesto con una cadena sin azúcar que consiste de 43 residuos de aminoácido entre el tercer y cuarto dominios de transmembrana (Documentos de no patente 1 y 9). Se considera que la molécula CD20 existe usualmente como un tetrámero, y forma adicionalmente un heterocomplejo con otros componentes menores (Documento no patente 18). Debido a que la proteína CD20 no se secreta de la célula o se divide, y adicionalmente, se toma fuertemente dentro de la célula mediante la unión del anticuerpo, se puede esperar que un mecanismo citotóxico basado en un anticuerpo dirigido contra una célula objetivo trabaje efectivamente (Documentos de no patente 1 a 3).
- 20 A pesar de su tamaño molecular pequeño, el CD20 muestra diversidad de epítipo parcialmente debido al efecto de su forma de expresión como un complejo fuera de la célula, y la unión de los anticuerpos a sus varias diferentes respuestas biológicas mediatas. Por ejemplo, las actividades tal como regulación por disminución de los receptores de célula B, el incremento de las expresiones de los antígenos MHC clase II y las moléculas de adhesión, la activación del Ca^{2+} liberado en la presencia de hiper-reticulación, la inhibición de antígeno 1 asociado a la función de linfocito no dependiente de adhesión homotípica, la inducción de apoptosis y la actividad opuesta, la promoción del crecimiento celular, varían significativamente (Documentos de no patente 4 a 13). Los ejemplos típicos del anticuerpo anti-CD20, rituximab, B1, 1F5 y 2H7, también tienen diferentes características y funciones biológicas, y una referencia a un "anticuerpo monoclonal que se une al CD20" no especifica solo sus propiedades biológicas.
- 30 La molécula que constituye el dominio extracelular de CD20 es insoluble. Aunque la molécula CD20 derivada de un lisato celular o como una proteína de gen recombinante se puede solubilizar al utilizar un tensoactivo o álcali fuerte, es difícil mantener la estructura tridimensional natural bajo tal una condición de tratamiento. Por lo tanto, se utiliza una célula B positiva CD20 como un inmunógeno para obtener anticuerpos. Sin embargo, su propiedad inmunoestimuladora es débil, y no es fácil obtener clones de células que producen el anticuerpo maduro.
- 40 Como de 2005, rituximab, un anticuerpo quimérico de ratón/humano, es solo el anticuerpo monoclonal anti-CD20 aprobado como un agente terapéutico. Debido a que las moléculas quiméricas con moléculas heterólogas tienen antigenicidad, ellas no se prefieren generalmente como agentes terapéuticos. Sin embargo, los anticuerpos anti-CD20 tienen una propiedad de objetivar y eliminar todas las células B que incluyen células normales, y por lo tanto se dice que ellas no tienen sustancialmente antigenicidad. Sin embargo, se han reportado ejemplos en los cuales se induce un anticuerpo neutralizante durante el periodo de tratamiento, aunque ellos cuentan solo varios porcentajes, y más fácilmente se induciría dependiendo de la dosis y el periodo de dosificación. Por lo tanto, se desea el desarrollo de un anticuerpo humanizado que tiene una secuencia más cerrada a aquella del anticuerpo humano o un humano. Otra desventaja de los anticuerpos quiméricos es la vida útil corta de la sangre, y la vida útil β es solo 3 o 4 días. El índice efectivo del rituximab solo contra la recurrencia de NHL de baja malignidad es muy inferior de 50% en un estudio clínico con los Estados Unidos, que indica que 50% o más de los pacientes no responden o responden

pobremente al rituximab. El índice de respuesta en los pacientes con malignidad NHL moderada es aún menor, siendo solo aproximadamente 30% (Documento no patente 14). Por lo tanto, es necesario investigar los factores y el antecedente de las diferentes respuestas en los pacientes, y se desea al mismo tiempo el desarrollo de un anticuerpo que tiene un efecto superior.

- 5 Documento no patente 1: Leukocyte Fact Book 2nd Edition, Academic Press
- Documento no patente 2: Stashenko P et al., J. Immunol., 1980, 125: 1678-85
- Documento no patente 3: Anderson KC et al., Blood, 1984, 63: 1424-33
- Documento no patente 4: Shan D et al., Blood, 1998, 91: 1644-52
- Documento no patente 5: Flieger D et al., Cell Immunol., 2000, 204: 55-63
- 10 Documento no patente 6: Mathas S et al., Cancer Res., 2000, 60: 7170-6
- Documento no patente 7: Cardarelli PM et al., Cancer Immunol. Immunother., 2002, 51: 15-24
- Documento no patente 8: Pedersen IM et al., Blood, 2002, 99: 1314-9
- Documento no patente 9: Deans JP et al., Immunol., 2002, 107: 176-82
- Documento no patente 10: Golay JT et al., J. Immunol., 1992, 149: 300-8
- 15 Documento no patente 11: Bourger I et al., Eur. J. Immunol., 1993, 23: 768-71
- Documento no patente 12: White MW et al., J. Immunol., 1991, 146: 846-53
- Documento no patente 13: Shan D et al., Cancer Immunol. Immunother., 2000, 48: 673-83
- Documento no patente 14: Coiffier B et al., Blood, 1998, 92: 1927-32
- Documento no patente 15: Edward JC et al., Rheumatology (Oxford), 2001, 40: 205-11
- 20 Documento no patente 16: Zaja F et al., Haematologica, 2002, 87: 189-95
- Documento no patente 17: Perrotta S et al., Br. J. Haematol., 2002, 116: 465-7
- Documento no patente 18: Polyak MJ et al., Blood, 2002, 99: 3256-62
- La WO 2005/000901 describe anticuerpos monoclonales que se unen a CD20 y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos.
- 25 Davies A.J. et al (Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging (2004) Vol 48(4) 305-316) describe las administraciones de yodo [131I] tositumomab que objetiva el antígeno CD20.
- La WO 03/068821 describe anticuerpos anti-CD20 humanos, quiméricos y humanizados y las proteínas de fusión del anticuerpo CD20 que se unen a CD20.
- 30 Uchida et al (J. Exp. Med. (2004) Vol 199, páginas 1659-1669) discute los mecanismos involucrados en la inmunoterapia del anticuerpo anti-CD20.

Descripción de la Invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que tenga funciones biológicas superiores a aquellas de los agentes terapéuticos de anticuerpo monoclonal anti-CD20 convencionales.

- 35 Los inventores de la presente invención obtienen anticuerpos monoclonales anti-CD20 de murino que se unen específicamente al antígeno CD20 humano al utilizar dos o más cepas de célula B positivas para antígeno CD20, células de mamífero hechas biotecnológicamente para expresar el antígeno CD20 humano en sus membranas celulares, y la proteína CD20 humana fusionada con la proteína glutatona S-transferasa (GST) en una combinación

5 arbitraria como un inmunógeno. Algunos de ellos tienen actividades directas inhibitoras de crecimiento celular que incluyen apoptosis en un cultivo celular que expresa CD20 in vitro sin células efectoras. Adicionalmente, independiente de la presencia o ausencia de las actividades inhibitoras del crecimiento celular tal como apoptosis, estos anticuerpos, que incluyen otros anticuerpos monoclonales anti-CD20 de murino seleccionados, se imparten con citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo o complemento efectivo mediante quimerización. Al humanizar las secuencias de aminoácido de los anticuerpos determinados por tener la mayoría de actividades biológicas deseables entre ellos, se preparan los anticuerpos monoclonales anti-CD20 que se pueden utilizar como un agente terapéutico. Así, se ha llevado a cabo la presente invención.

La presente invención proporciona los siguientes.

10 (1) Un anticuerpo monoclonal anti-CD20 de murino que tiene actividades inhibitoras de crecimiento celular que incluyen apoptosis contra células que expresan el antígeno CD20 humano en el cultivo de células que expresan el antígeno CD20 sin células efectoras, en donde las secuencias de aminoácido de la región variable de cadena H y la región variable de cadena L son la SEQ ID Nos: 1 y 7.

(2) Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con (1).

15 (3) Un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico, en donde se fusionan la secuencia de aminoácido de la región variable del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con (1) y la secuencia de aminoácido de la región constante de inmunoglobulina humana.

20 (4) Un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado al utilizar la secuencia de aminoácido de la región determinante de complementariedad (CDR) de la región variable del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con (1) y una secuencia de aminoácido de inmunoglobulina humana.

(5) El anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con una cualquiera de (3) a (4), que tiene citotoxicidad contra células que expresan el antígeno CD20 en la presencia de un complemento humano.

(6) Una célula de mamífero incorporada con una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con una cualquiera de (3) a (5).

25 (7) La célula de mamífero de acuerdo con (6), que es una célula de ovario de hámster Chino (CHO).

(8) Un agente diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con una cualquiera de (1) o (3) a (5) como un ingrediente activo.

(9) Un agente terapéutico que comprende el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con una cualquiera de (3) a (5) como un ingrediente activo.

30 Los residuos de aminoácido en las secuencias de aminoácido de los anticuerpos monoclonales definidos anteriormente se pueden reemplazar con otros residuos de aminoácido tanto como las estructuras secundarias y sus propiedades biológicas no se alteran significativamente, y tales anticuerpos monoclonales de los cuales se cambian las secuencias de aminoácido, como se mencionó anteriormente, caen dentro del alcance de la presente invención.

Breve Descripción de los Dibujos

35 [Fig. 1] Estructura de un vector para la expresión de un anticuerpo recombinante, pNOW-Ab.

[Fig. 2] Estructura de un vector para la expresión de una proteína, pNOW-Ag.

[Fig. 3] Secuencias de los cebadores para la clonación del gen humano CD20.

[Fig. 4] Secuencias de aminoácido de las regiones variables de cadena H y de cadena L de anticuerpos monoclonales anti-CD20 de murino.

40 [Fig. 5] Resultados de prueba de apoptosis utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD20 de murino.

[Fig. 6] Resultados de la prueba de inhibición de crecimiento celular utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD20 de murino.

[Fig. 7] Resultados de la prueba de citotoxicidad dependiente de complemento utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD20 quiméricos.

[Fig. 8A] Secuencias de aminoácido de las regiones variables de cadena H y de cadena L de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanizados y las secuencias de nucleótido que corresponden a ellos.

[Fig. 8B] Secuencias de aminoácido de las regiones variables de cadena H y de cadena L de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanizados y las secuencias de nucleótido que corresponden a ellos.

5 [Fig. 9] Resultados de la prueba de inhibición de crecimiento celular utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanizados.

Mejor Modo para Llevar a Cabo la Invención

En la presente invención, el término "anticuerpo" se utiliza en un significado que abarca el anticuerpo en el significado general, la cadena H y la cadena L que los constituyen, y sus fragmentos.

10 La presente invención se relaciona con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que se une al antígeno CD20 humano en una membrana celular y tiene actividades biológicas deseables para inducir un efecto terapéutico.

El anticuerpo de acuerdo con una primera realización de la presente invención es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno CD20 humano en una membrana celular y tiene actividades inhibitoras de crecimiento celular que incluyen apoptosis contra células que expresan el antígeno CD20 humano en el cultivo de células que expresan el antígeno CD20 sin la ayuda de células efectoras. Este es originalmente un anticuerpo monoclonal anti-CD20 de murino, e incluye adicionalmente un anticuerpo monoclonal anti-CD20 obtenido al quimerizar o humanizar aquel anticuerpo. Estos anticuerpos tienen actividades inhibitoras directa de crecimiento celular que incluyen apoptosis contra células que expresan el antígeno CD20 humano en cultivo in vitro de las células que expresan el antígeno CD20 sin la ayuda de células efectoras. Estos anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanizados o quimerizados tienen una citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo y/o complemento.

La propiedad de unión para un antígeno CD20 sobre una membrana celular se puede examinar mediante ELISA para células, en la que las células que expresan el CD20 tal como células SB y células Raji se adhieren a una placa y se hacen reaccionar con un anticuerpo monoclonal que se va a probar. Sin embargo, debido a que los niveles de expresión del antígeno CD20 de estas células son insuficientes, la reactividad no es alta. Por lo tanto, en la presente invención, se realiza un método de ELISA para células, en el cual las células CHO en las que se expresa el CD20 en una gran cantidad mediante la recombinación de gen (células CD20/CHO) se adhieren a una placa y se hacen reaccionar con un anticuerpo monoclonal que se va a probar. En una prueba preliminar de la presente invención, se confirma que el ELISA para células que utiliza las células CD20/CHO muestra un patrón similar a aquel observado en ELISA para células utilizando las células SB o células Raji en una prueba de reactividad de un anticuerpo monoclonal, y muestra alta sensibilidad (ver el ejemplo, Comprobación del método de detección ELISA para células CD20/CHO, Tabla 1).

Se pueden determinar las actividades inhibitoras directas de crecimiento celular en un cultivo in vitro de las células que expresan el antígeno CD20 humano sin células efectoras mediante un método usual (Miyamoto T et al., Avian Dis., Vol. 46(1), 10-16). Adicionalmente, se puede determinar la capacidad que induce la apoptosis mediante una prueba utilizando citometría de flujo (teñido de anexina V/yoduro de propidio (PI)).

Ejemplos del anticuerpo de acuerdo con la primera realización incluyen los anticuerpos monoclonales anti-CD20 de ratón que tienen una combinación de las secuencias de aminoácido de la SEQ ID NOS: 1 y 7, para la región variable de cadena H y la región variable de cadena L, así como también los anticuerpos monoclonales anti-CD20 obtenidos al quimerizar o humanizar aquellos anticuerpos. Estos anticuerpos exhiben actividades inhibitoras directas de crecimiento celular que incluyen apoptosis contra células que expresan el antígeno CD20 humano en cultivo in vitro de las células que expresan el antígeno CD20 sin la ayuda de células efectoras. Estos anticuerpos también tienen citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo y/o de complemento. La presente invención también incluye un hibridoma que produce un anticuerpo de murino, y una célula de mamífero (célula CHO en los ejemplos) incorporada con una secuencia de nucleótido que corresponde a una cualquiera de las secuencias de aminoácido de los anticuerpos quiméricos o humanizados.

Se lleva a cabo la quimerización al fusionar la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena H de un anticuerpo monoclonal de murino y la secuencia de aminoácido de región constante de cadena H de inmunoglobulina humana, y la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena L y la secuencia de aminoácido de la región constante de cadena L de inmunoglobulina humana (Ishida T et al., Nippon Rinsho, Vol. 60, No 3, 439-444). Los anticuerpos humanizados se diseñan al utilizar una secuencia de aminoácido de la región variable CDR de un anticuerpo monoclonal de murino y una secuencia de aminoácido de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanizados preferidos como agentes terapéuticos se seleccionan al

comparar las características de varios anticuerpos designados (Padlan EA, Mol. Immunol., Vol. 28, No 4/5, 489-498; Wu TT y Kabat EA, Mol. Immunol., Vol. 29, No 9, 1141-1146; Padlan EA et al., FASEB J., Vol. 9, 133-139).

5 Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanizados o quimerizados tienen citotoxicidad dependiente de complemento adicional (CDC), y citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) en la presencia de células efectoras. Para los métodos de prueba para estos CDC y ADCC, los métodos comúnmente utilizados se denominan como (Manches O et al., Blood, 2003, 101(3), 949-54; Idusogie EE et al., J. Immunol., 2000, 164, 4178-4184).

10 se puede esperar que los anticuerpos monoclonales anti-CD20 quiméricos y los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanizados descritos como los anticuerpos de la primera realización exhiban un efecto superior como un agente terapéutico para tumores malignos mediados por célula B y enfermedades inmunológicas en las cuales se involucran las células B o los anticuerpos producidos por células B, y un objeto de la presente invención es usarlos en el desarrollo de un agente terapéutico que contiene un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado o quimérico, deseablemente un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado, como un ingrediente activo. Ejemplos de las enfermedades objetivo incluyen linfoma no Hodgkin, linfoma Hodgkin, leucemia linfática crónica, leucemia linfática aguda, artritis reumatoide crónica, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido, síndrome de Sjogren, enfermedad de Crohn, escleroderma, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, y las así establecidas.

El anticuerpo monoclonal de murino de la presente invención se puede preparar mediante el siguiente método.

20 Como un inmunógeno para sensibilización, se puede utilizar la célula SB o la célula Raji como una cepa celular que expresa el antígeno CD20 humano, y la célula CHO hecha para expresar el antígeno CD20 humano en combinación. Adicionalmente, una proteína humana CD20 fusionada con GST (GST-CD20) se puede utilizar como un antígeno de sensibilización complementario.

25 Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal se puede preparar mediante una serie de procedimientos que incluyen (1) inmunización de un animal a ser inmunizado (ratón), (2) preparación de linfocitos del animal inmunizado, (3) preparación de células progenitoras, (4) fusión celular de los linfocitos y las células progenitoras, (5) detección y (6) clonación (Biochemistry Experiment Method: Monoclonal Antibody, escrito por Ailsa M. Campbell, traducido por Toshiaki Osawa, Tokyo Kagaku Dozin Co., Ltd., 1989). Un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que se une específicamente al antígeno CD20 en una superficie celular se puede clonar al hacer reaccionar un anticuerpo monoclonal que se va a probar con un sistema de ELISA para células en el cual se inmovilizan las células CD20/CHO en una placa. También se pueden utilizar vectores de expresión comercialmente disponibles. Sin embargo, debido a que el antígeno CD20 necesita ser expresado en la célula CHO en una alta densidad, se puede utilizar un vector de alta expresión de célula de mamífero, pNOW (Patente Japonesa No. 3582965). Un criterio de selección del anticuerpo monoclonal es la exhibición de la reactividad comparable con o mayor que de un control positivo.

35 Un anticuerpo quimérico o humanizado se puede preparar de acuerdo con un método de recombinación de gen usual. Por ejemplo, pNOW-Ab, que contiene 2 conjuntos de sitios de multiclonación posicionados en tándem para producir el anticuerpo, y se incorpora anteriormente con los genes que codifican la cadena humana H y la región constante de cadena L, se puede utilizar como un vector de expresión (Fig. 1).

[Ejemplo 1]

40 Preparación, quimerización y humanización de los anticuerpos monoclonales dirigidos al antígeno CD20 así como también la prueba para características de los anticuerpos obtenidos se explicará adelante con referencia a los ejemplos.

(1) Preparación de inmunógeno para sensibilizar ratones

45 Se obtiene el gen humano CD20 se obtiene de una colección cADN al utilizar un cebador 5' de la SEQ ID NO: 13 y un cebador 3' de la SEQ ID NO: 14, que son específicos para el gen que codifica la molécula total de CD20 humano (Multiple Choice cDNA human spleen, Origene Technologies, Inc., 6 Taft Court, Suite 100, Rockville, MD 20850). Específicamente, se utilizan los cebadores mostrados en la Figura 3. El gen CD20 se incorpora dentro de pNOW-Ag (Fig. 2) como un vector de alta expresión para células de mamífero, y se transfecta dentro de células CHO como las células anfitrionas. Las células CHO recombinantes (células CD20/CHO) que expresan moléculas CD20 en un alto nivel en sus superficies celulares se establecen mediante análisis FACS. Las células que muestran 5 o más veces de intensidad de fluorescencia mayor comparado con la célula SB en teñido con anticuerpos monoclonales anti-CD20 marcados FITC se definen como aquellos que muestran alta expresión. GST-CD20, el inmunógeno complementario, se prepara al fusionar GST en el terminal N de 43 residuos de aminoácido del dominio extracelular CD20 al utilizar el vector pGEX-4T2 (G et al. AM, Electrophoresis, Vol. 20(2): 344-348).

(2) Preparación de inmunógeno

5 Las células SB o células Raji se cultivan en 10% de medio RPMI 1640 agregado a FCS. Las células CD20/CHO se cultivan en medio CHO-S-SFM II (GIBCO, Cat. No. 12052-098) agregado a 800 µg/ml de G418. Estos cultivos se centrifugan (1100 rpm, 5 minutos), entonces se agregan células con PBS(-) de Dulbecco y se suspende, y la suspensión se centrifuga de nuevo. Este procedimiento de lavado se repite una vez de nuevo, y una suspensión preparada al agregar solución salina fisiológica a las células (conteo celular: 1 a 3 x 10⁷/ml) se utiliza para inmunización. El pGEX-4T2 incorporado con GSTCD20 se introduce dentro de células competentes E. coli. Las células competentes se lisan después de cultivo, y el GST-CD20 se purifica crudamente de las células lisadas, y luego se solubiliza mediante la adición de hidróxido de sodio al 0.1 N.

10 (3) Inmunización y fusión celular

15 Como los animales que se van a inmunizar, se utilizan ratones hembra de 7- a 11 semanas de edad. Las células SB, las células Raji o las células CD20/CHO se administran repetidamente dos o tres veces en intervalos de varios números de días, luego un antígeno celular diferente (células SB, células Raji o células CD20/CHO) se selecciona y se utiliza para la inmunización final. El conteo de células administradas es 1 a 3 x 10⁷ por ratón a pesar del tipo celular. Adicionalmente, se realiza inmunización complementaria al utilizar GST-CD20 para una parte del ratón. Tres días después de la inmunización final, se extraen células de de los ratones, y se suspenden en el medio RPMI, y una reacción de fusión con mieloma de ratón (NS-1) se lleva a cabo en la presencia de PEG-1500 (Oi, VT et. Herzenberg, 1980, in: Selected Methods in Cellular Immunology; Mishell B et al. (Freeman y Co., San Francisco, CA) p.351).

20 (4) Establecimiento del método de detección ELISA de célula CD20/CHO

25 Se hacen reaccionar varios anticuerpos monoclonales anti-CD20 de murino y 2B8 al utilizar placas de 96 pozos a los cuales se adhieren las células SB, las células Raji, las células CD20/CHO y la estirpe celular progenitora CHO CD20. Se confirma que en estas pruebas ELISA de célula, se observan tendencias similares para las concentraciones del anticuerpo, y se encuentra que también son posibles las comparaciones relativas entre los anticuerpos y con un control. Debido a la alta densidad de los antígenos de célula de superficie adheridos a la placa en el ELISA para células CD20/CHO, se observa una absorbancia en un nivel que permite suficientemente la detección aún con una concentración relativamente baja de la muestra de anticuerpo de prueba, y se encuentra que es un sistema de medición sensible. Los resultados de medición específicos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Comparación de ELISA para células SB, ELISA para células Raji y ELISA para células CD20/CHO

| Anticuerpo | ELISA para células Raji (A492) | | | | ELISA para células SB (A492) | | | | | | | |
|------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Concentración de anticuerpo (ng/ml) | | | | Concentración de anticuerpo (ng/ml) | | | | | | | |
| | 1000 | 320 | 100 | 32 | 10 | 3 | 1000 | 320 | 100 | 32 | 10 | 3 |
| 1K1228 | 1.683 | 1.170 | 0.678 | 0.326 | 0.148 | Nt | 1.265 | 0.931 | 0.452 | 0.192 | 0.082 | Nt |
| 1K1257 | 1.775 | 1.263 | 0.782 | 0.445 | 0.177 | 0.096 | 1.509 | 1.143 | 0.570 | 0.276 | 0.119 | 0.055 |
| 1K1402 | 1.228 | 0.525 | 0.214 | 0.102 | 0.061 | 0.049 | 0.763 | 0.400 | 0.152 | 0.095 | 0.066 | 0.057 |
| 1K1422 | 0.748 | 0.277 | 0.121 | 0.057 | 0.046 | 0.049 | 0.403 | 0.147 | 0.071 | 0.039 | 0.036 | 0.051 |
| 1K1428 | 1.196 | 0.514 | 0.222 | 0.104 | 0.067 | 0.057 | 1.111 | 0.509 | 0.252 | 0.108 | 0.058 | 0.061 |
| 1K1936A | 0.887 | 0.376 | 0.191 | 0.105 | 0.058 | 0.058 | 0.959 | 0.445 | 0.264 | 0.120 | 0.067 | 0.065 |
| 2B8 | 0.329 | 0.121 | 0.055 | 0.038 | 0.034 | 0.046 | 0.337 | 0.091 | 0.045 | 0.038 | 0.037 | 0.053 |
| NC | 0.035 | | | | | | | | | | | |
| Anticuerpo | ELISA para células Raji (A492) | | | | ELISA para células SB (A492) | | | | | | | |
| | Concentración de anticuerpo (ng/ml) | | | | Concentración de anticuerpo (ng/ml) | | | | | | | |
| | 1000 | 320 | 100 | 32 | 10 | 3 | 1000 | 320 | 100 | 32 | 10 | 3 |
| 1K1228 | 3.056 | 2.704 | 2.091 | 1.275 | 0.572 | 0.265 | 0.081 | 0.040 | 0.038 | 0.034 | 0.038 | Nt |
| 1K1257 | 3.184 | 2.576 | 1.924 | 1.223 | 0.604 | 0.271 | 0.095 | 0.053 | 0.038 | 0.039 | 0.037 | 0.029 |
| 1K1402 | 1.877 | 1.574 | 1.486 | 0.824 | 0.389 | 0.174 | 0.385 | 0.170 | 0.085 | 0.063 | 0.070 | 0.065 |
| 1K1422 | 2.230 | 1.327 | 0.842 | 0.238 | 0.105 | 0.068 | 0.164 | 0.068 | 0.046 | 0.047 | 0.035 | 0.067 |
| 1K1428 | 2.544 | 2.448 | 2.190 | 0.967 | 0.463 | 0.283 | 0.564 | 0.213 | 0.091 | 0.056 | 0.050 | 0.060 |
| 1K1436A | 2.432 | 2.369 | 2.278 | 1.101 | 0.559 | 0.286 | 0.375 | 0.153 | 0.072 | 0.043 | 0.043 | 0.060 |
| 2B8 | 2.293 | 1.664 | 1.090 | 0.561 | 0.174 | 0.089 | 0.056 | 0.040 | 0.045 | 0.035 | 0.044 | 0.060 |
| NC | 0.070 | | | | | | | | | | | |

(5) Detección mediante ELISA para células

Se realiza ELISA para células al utilizar una placa de 96 pozos a la cual se adhieren las células CD20/CHO o las células CHO (estirpe celular progenitor CD20), y se seleccionan pozos en los cuales se producen anticuerpos específicamente reactivos para CD20. Se utiliza 2B8 como un control positivo, y un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido al antígeno CD3 humano (BD PharMingen) se utiliza como un control negativo. Específicamente, las células CD20/CHO o células CHO (estirpe celular progenitor) adheridas a una placa de 96 pozos recubierta con poli-Lisina (Asahi Techno Glass Corporation, Cat. No. 11-023-018) se utilizan para ELISA de célula. Se agrega una solución de bloqueo (0.2% de gelatina y 0.5% de solución BSA en PBS) en un volumen de 150 µl a cada pozo y se deja reposar a 37°C durante 1 hora. Luego, la placa se lava 5 veces con 150 mM de NaCl y 0.05% de solución acuosa de Tween 20, y se agrega 100 µl de cada muestra (solución diluida de sobrenadante de cultivo) a cada pozo para desarrollar la reacción primaria a 37°C durante 1 hora. Después del lavado, 100 µl de una solución diluida de un anticuerpo marcado [anticuerpo de conejo IgG(H+L) anti-ratón marcado con HRP (Jackson Lab., Código No. 315-035-003) o anticuerpo de conejo IgG(Fc) anti-ratón marcado con HRP (Jackson Lab., Código No. 315-035-008)] se agrega a cada pozo para desarrollar la reacción secundaria a 37°C durante 1 hora. Para la preparación de las mezclas de reacción para las reacciones primaria y secundaria, se utiliza una solución la misma como la solución de bloqueo. Después de lavado, se agrega 100 µl de una solución de desarrollo de color (OPD) a cada pozo, 30 minutos después, 50 µl de 4 N de H₂SO₄ se agrega para terminar la reacción, y se mide la absorbancia a 492 nm (A492). Luego, se seleccionan los pozos que muestran reactividad comparable con o significativamente mayor que aquella de 2B8.

(6) Clonación

Se lleva a cabo la clonación mediante el método de solución limitada. Las células se siembran en una placa de 96 pozos y se cultivan, luego se realiza ELISA para células para las células CD20/células CHO para el sobrenadante de cultivo de un pozo que contiene 1 colonia para seleccionar un clon que produce un anticuerpo específico.

(7) Preparación del anticuerpo purificado

El clon que produce un anticuerpo específico se cultiva en 10% de medio RPMI 1640 agregado a FCS. Cuando la densidad celular llega a ser aproximadamente 5×10^5 /ml, el medio se reemplaza con un medio libre de suero, ASF-104N (Ajinomoto Co. Inc.), y se continúan los cultivos. Luego, 2 a 4 días después, se centrifuga el medio de cultivo, y se recolecta el sobrenadante de cultivo y se somete a purificación utilizando una columna de proteína G. La solución de anticuerpo monoclonal eluido se dializa contra 150 mM de NaCl. La solución se somete a esterilización de filtración utilizando un filtro que tiene un tamaño de poro de 0.2 µm y se utiliza como un anticuerpo de prueba (anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano CD20).

Los clones de anticuerpo monoclonal que muestran afinidad de unión comparable con aquellos de control positivo se seleccionan mediante ELISA para células CD20/CHO. Se determinan las secuencias de gen de las regiones variables de estos anticuerpos, y se determinan sus secuencias de aminoácido como un resultado. Las secuencias de la región variable de cadena H y la región variable de cadena L de los anticuerpos típicos se muestran en las SEQ ID NOS: 1 y 7, SEQ ID NOS: 2 y 8, SEQ ID NOS: 3 y 9, SEQ ID NOS: 4 y 10, SEQ ID NOS: 5 y 11, SEQ ID NOS: 6 y 12, SEQ ID NOS: 15 y 17, y SEQ ID NOS: 16 y 18 (Figura 4). Adicionalmente, se investigan las características biológicas de estos clones.

Prueba de característica biológica (1): Prueba de inducción de apoptosis

La apoptosis que induce la capacidad de los compuestos de prueba se determina mediante citometría de flujo (teñido de anexina V/PI). Se utiliza 2B8 como un control positivo, y el anticuerpo monoclonal de ratón dirigido al CD3 humano (BD PharMingen) se utiliza como un control negativo. Los procedimientos son como sigue.

Se utiliza el Equipo de Apoptosis MEBCYTO (MBL, Cat. No. 4700, Lot. 20).

Se centrifugan las células Raji, y luego se suspenden en un medio RPMI 1640 fresco (Sigma, Cat. No. R8758, Lot 44K2416) que contiene 10% de FCS (inactivado) (ICN, Cat. No. 2916754, Lot 8005C), y 1 ml de la suspensión en una densidad de 5×10^5 células/ml se agrega a cada pozo de una placa de 12 pozos. Se utilizan veinte pozos para cada anticuerpo, y se agrega cada anticuerpo en una concentración final de 2 µg/ml o 4 µg/ml (3 pozos x 2 concentraciones diferentes x 2 puntos de tiempo, 12 pozos en total).

Un día y dos días después del inicio del cultivo, se recolecta el medio de cultivo que contiene aproximadamente 2×10^5 células, y se centrifuga, y luego las células se lavan una vez con PBS. Posteriormente, se agrega 85 µl de un amortiguador de unión a las células para suspender las células en el amortiguador. Adicionalmente, a la suspensión se agrega 10 µl de anexina V-FITC y 5 µl de PI, se mezcla suficientemente, y se le permite reaccionar a temperatura

ambiente durante 15 minutos con protección de luz. Se realiza medición mediante citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson), y los resultados se analizan al utilizar CellQuest (Becton Dickinson).

5 Los resultados de medición de 8 tipos de los anticuerpos monoclonales anti-CD20 de murino típicos, control positivo (2B8), y control negativo (anticuerpo anti-CD3) se muestran en la Figura 5. En general, la apoptosis que induce la capacidad de 2B8 se dice que es muy alta. Aún comparado con esto, el clon del que las secuencias de aminoácido de la región variable de cadena H y la región variable de cadena L son aquellos de las SEQ ID NOS: 2 y 8 (1K1791) que muestra una actividad que induce apoptosis marcadamente mayor. También se observa la muerte celular claramente debido a apoptosis con los clones de los que la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena H y la región variable de cadena L son aquellos de las SEQ ID NOS: 1 y 7 (1K1422) y SEQ ID NOS: 15 y 17 (1K0924).

Prueba de característica biológica (2): prueba de inhibición de crecimiento celular

15 Se prepara una suspensión de 5×10^4 células/ml de células Raji con 10% de medio RPMI 1640 que agrega FCS, y se agrega a una placa de 96 pozos en un volumen de 100 μ l/pozo, y se realiza cultivo. Después de 24 horas, se agrega 50 μ l/pozo de cada solución de anticuerpo en una concentración de anticuerpo de 0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml o 1 μ g/ml, y se continúa el cultivo. Setenta y dos horas después de la adición del anticuerpo, se agrega 10 μ l/pozo de una solución de desarrollo de color, Equipo 8 de Conteo Celular (Dojindo Laboratories, Cat. No. 343-07623, Lote SG076), las células se cultivan durante 4 horas adicionales, y luego se mide la absorbancia a 492 nm. Los conteos de células vivas de los 8 típicos de anticuerpos monoclonales anti-CD20 de murino y el control positivo (2B8) se muestran en la Figura 6 como porcentajes con base en aquel del control negativo (100%). Se puede estimar el efecto inhibidor de crecimiento celular en la base del índice de conteo de células vivas reducido comparado aquel del control negativo. Se observa la inhibición clara del crecimiento celular con 1K0924, 1K1422, 1K1791 y 2B8 como el control positivo, y la inhibición se marca particularmente con 1K1791. Esta tendencia es consistente con los resultados de la prueba de inducción de apoptosis.

Preparación de anticuerpos quiméricos

25 Los genes que codifican las regiones variables de cadena H y de cadena L de cada anticuerpo de murino se incorporan en pNOW-Ab, un vector de alta expresión para la célula CHO que ya contiene los genes que codifican las regiones constantes de cadena h y de cadena L (\square) de inmunoglobulina humana como un casete. Cada vector de expresión se transfecta en las células CHO, y se seleccionan clones que muestran alta productividad para cada anticuerpo.

30 Prueba para propiedad de unión al antígeno CD20 de anticuerpos quiméricos

35 Los 8 tipos preparados de anticuerpos monoclonales anti-CD20 quiméricos se examina para reactividad al antígeno CD20 humano mediante el ELISA para células CD20/CHO. Se utiliza Rituximab (c2B8) como un control positivo. Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 2. Los valores medidos en el ELISA para células (A492) reflejan la intensidad de la propiedad de unión. Estos anticuerpos muestran afinidad sustancialmente comparable con o mayor que aquella del control excepto que c1K0924 y c1K1422 tienden a mostrar afinidad ligeramente menor que aquella del control.

Tabla 2 Prueba ELISA para células CD20/CHO de anticuerpos quiméricos anti-CD20

| Anticuerpo | ELISA para células CD20/CHO (A492) | | | | | |
|------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Concentración de anticuerpo (ng/ml) | | | | | |
| | 100 | 32 | 10 | 3 | 1 | 0 |
| c1K0924 | 1.423 | 0.724 | 0.391 | 0.186 | 0.094 | 0.032 |
| c1K1228 | 2.226 | 1.580 | 0.701 | 0.289 | 0.120 | 0.032 |
| c1K1402 | 2.449 | 1.621 | 0.737 | 0.349 | 0.116 | 0.032 |
| c1K1422 | 1.919 | 0.912 | 0.357 | 0.151 | 0.077 | |
| c1K1712 | 2.292 | 1.683 | 0.793 | 0.359 | 0.145 | |

| | | | | | |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| c1K1736 | 2.428 | 1.548 | 0.748 | 0.320 | 0.122 |
| c1K1782 | 2.101 | 1.017 | 0.505 | 0.169 | 0.074 |
| c1K1791 | 2.231 | 1.458 | 0.745 | 0.276 | 0.108 |
| c2B8 | 2.147 | 1.143 | 0.536 | 0.226 | 0.088 |

Prueba CDC de anticuerpos quiméricos

Los 8 tipos preparados de anticuerpos monoclonales anti-CD20 quiméricos se examinan para la actividad CDC. Se utiliza Rituximab (c2B8) como un control positivo. Se utiliza RC-K8 (obtenido de Kochi Medical School) como las células objetivo. Como un medio para uso, RHB (medio basal: RPMI-1640, aditivos: 0.1% de BSA, 20 mM de HEPES (pH 7.2), 2 mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin) se preparan y se utilizan. Las células objetivo se lavan con RHB y se resuspenden a 10⁶ células/ml. En un volumen de 50 µl de cada una de las soluciones de los anticuerpos quiméricos de prueba y rituximab que tiene diferentes concentraciones, 50 µl de solución diluida 4 veces de un complemento humano comercialmente disponible (Quidel, San Diego, CA, Cat. A113), y 50 µl de una suspensión celular que contiene 10⁶ células/ml se agregan a cada pozo de una placa de cultivo de 96 pozos de fondo plano (negro). La concentración de anticuerpo en la mezcla de 150 µl/pozo se establece a 0.1, 1 y 10 µg/ml. Para promover la lisis de célula mediada por el complemento, la mezcla se incubaba bajo las condiciones de 37°C y 5% de CO₂ durante 2 horas. A la mezcla se agrega 50 µl de azul alamar (prescripción no diluida de AccuMed International, Biosource, Cat. DAL1100), y la reacción se le permite adicionar durante la noche bajo las mismas condiciones. La placa se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos para enfriar, y se mide la fluorescencia a 590 nm para emisión con excitación a 530 nm al utilizar un lector de microplaca de fluorescencia. Los resultados se representan en términos de intensidad de fluorescencia (RFU). Se calcula el índice de actividad CDC de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de actividad CDC} = 100 \times \{ \text{RFU (anticuerpo no agregado)} - \text{RFU (anticuerpo agregado)} \} / \{ \text{RFU (anticuerpo no agregado)} - \text{RFU (Triton X - 100 agregado)} \}$$

Los resultados se muestran en la Figura 7. Excepto para c1K1712, los anticuerpos muestran actividades CDC sustancialmente comparables con o mayores que aquellas de C2B2 como el control positivo.

Preparación de anticuerpos humanizados

Se diseñan anticuerpos humanizados con base en la región variable CDR del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de murino 1K1791. Al desarrollar análisis estructural con base en las secuencias de aminoácido y cambiar adicionalmente el método diseñado, se preparan 4 tipos de secuencias humanizadas para cada una de las cadena H y las cadenas L (Padlan EA, Mol. Immunol., Vol. 28, No 4/5, 489-498; Wu TT y Kabat EA, Mol. Immunol., Vol. 29, No 9, 1141-1146; Padlan EA et al., FASEB J., Vol. 9, 133-139). Se preparan anticuerpos con todas las combinaciones posibles de los cuatro tipos para cada una de la cadena H y la cadena L. Se muestran estas secuencias de aminoácido en las SEQ ID NOS: 19 y 23, SEQ ID NOS: 19 y 24, SEQ ID NOS: 19 y 25, SEQ ID NOS: 19 y 26, SEQ ID NOS: 20 y 23, SEQ ID NOS: 20 y 24, SEQ ID NOS: 20 y 25, SEQ ID NOS: 20 y 26, SEQ ID NOS: 21 y 23, SEQ ID NOS: 21 y 24, SEQ ID NOS: 21 y 25, SEQ ID NOS: 21 y 26, SEQ ID NOS: 22 y 23, SEQ ID NOS: 22 y 24, SEQ ID NOS: 22 y 25, y SEQ ID NOS: 22 y 26 (Figuras 8A y 8B).

Las secuencias de aminoácido de estos 4 tipos de regiones variables de cadena H y 4 tipos de regiones variables de cadena L se convierten en las secuencias de ADN (nucleótido) con codones más frecuentemente utilizados en las secuencias de gen humano, y se cambian algunos de estos nucleótidos considerados adecuadamente en las células anfitrionas CHO sin cambiar los residuos de aminoácido originales (Kim CH et al., Gene, 1997, 15; 199 (1-2): 293-301). Específicamente, se utiliza como las secuencias de nucleótido que corresponden a las secuencias de aminoácido son aquellas de la SEQ ID NO: 27 que corresponden a la SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28 que corresponden a la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 29 que corresponden a la SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 30 que corresponden a la SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 31 que corresponden a la SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 32 que corresponden a la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 33 que corresponden a la SEQ ID NO: 25, y SEQ ID NO: 34 que corresponden a la SEQ ID NO: 26 (Fig. 8A y Fig. 8B). En estas secuencias de nucleótido, se pueden reemplazar los nucleótidos con otros nucleótidos tanto cuando no se alteran las secuencias de aminoácido correspondientes.

Los 8 tipos totales de las secuencias de nucleótido de las regiones variables de cadena H (SEQ ID NOS: 27 a 30) y las regiones variables de cadena L (SEQ ID NOS: 31 a 34) se sintetizan (Takara Shuzo Co., Ltd.) y se incorporan dentro de pNOW-Ab, un vector de expresión para células de mamífero que contienen un sitio de multiclonación. Los

vectores de expresión incorporados con cada uno de estos genes de anticuerpo humanizado se transfectan en células CHO, y se seleccionan clones que muestran alta productividad para cada anticuerpo.

Característica biológica y pruebas de inhibición de crecimiento celular para anticuerpos humanizados

- 5 Se prepara una suspensión que contiene 5×10^4 /ml de las células Raji con 10% de medio RPMI 1640 agregado a FCS, y se agrega a una placa de 96 pozos en un volumen de 100 μ l/pozo, y se realiza el cultivo. Después de 24 horas, se agrega 50 μ l/pozo de cada solución de anticuerpo en una concentración de anticuerpo de 0.5 μ g/ml, y se continúa el cultivo. Setenta y dos horas después de la adición del anticuerpo, se agrega 10 μ l/pozo de una solución de desarrollo de color, Equipo 8 de Conteo Celular (Dojindo Laboratories, Cat. No. 343-07623, Lote SG076), se realiza el cultivo durante 4 horas adicionales, y luego se mide la absorbancia a 492 nm. El conteo de células vivas de 10 15 tipos (27 clones) de 16 tipos de anticuerpos humanizados derivados de 1K1791 y c2B8 (otro nombre de rituximab) como el control positivo se muestran en la Figura 9 como índices con base en aquellos del control negativo (100%). El efecto inhibitor del crecimiento celular se puede estimar en la base del índice de conteo de células vivas reducido comparado con aquel del control negativo, y se observa el efecto inhibitor del crecimiento para todos los clones en esta prueba.
- 15 Los nombres de anticuerpos monoclonales y los números de secuencia descritos en esta especificación y los dibujos adjuntos se resumen como sigue.

Tabla 3

| Nombre de anticuerpo murino | Región variable de cadena H | Región variable de cadena L | Nombre de anticuerpo quimérico | Región variable humanizada (cadena H/cadena L) |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|
| 1K1422 | SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 7 | c1K1422 | |
| 1K1791 | SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO: 8 | c1K1791 | SEQ ID NOS: 19 y 23 |
| | | | | SEQ ID NOS: 19 y 24 |
| | | | | SEQ ID NOS: 19 y 25 |
| | | | | SEQ ID NOS: 19 y 26 |
| | | | | SEQ ID NOS: 20 y 23 |
| | | | | SEQ ID NOS: 20 y 24 |
| | | | | SEQ ID NOS: 20 y 25 |
| | | | | SEQ ID NOS: 20 y 26 |
| | | | | SEQ ID NOS: 21 y 23 |
| | | | | SEQ ID NOS: 21 y 24 |
| | | | | SEQ ID NOS: 21 y 25 |
| | | | | SEQ ID NOS: 21 y 26 |
| | | | | SEQ ID NOS: 22 y 23 |
| | | | | SEQ ID NOS: 22 y 24 |
| | | | | SEQ ID NOS: 22 y 25 |
| | | | | SEQ ID NOS: 22 y 26 |
| 1K1712 | SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 9 | c1K1712 | |
| 1K1402 | SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 10 | c1K1402 | |

| | | | | |
|--------|---------------|---------------|---------|--|
| 1K1736 | SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 11 | c1K1736 | |
| 1K1782 | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 12 | c1K1782 | |
| 1K0924 | SEQ ID NO: 15 | SEQ ID NO: 17 | c1K0924 | |
| 1K1228 | SEQ ID NO: 16 | SEQ ID NO: 18 | c1K1228 | |

5 Los hibridomas que producen estos anticuerpos monoclonales se denominan en la base de los nombres de los anticuerpos producidos, y se deposita intencionalmente en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Depositario de Organismo de Patente Internacional (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) en Marzo 28, 2006 bajo las disposiciones del tratado de Budapest, y números de acceso asignados de FERM BP-10587 (1K1422), FERM BP-10591 (1K1791), FERM BP-10588 (1K1712), FERM BP-10586 (1K1402), FERM BP-10589 (1K1736), FERM BP-10590 (1K1782), FERM BP-10584 (1K0924), y FERM BP-10585 (1K1228).

Aplicabilidad Industrial

10 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que tiene actividades biológicas para uso como un agente terapéutico.

Listado de Secuencias

<110> BioMedics Inc.

<120> Anticuerpo monoclonal anti-CD20

15 <130> C6084-PCT

<150> JP 2005-103093

<151> 2005-03-31

<150> JP 2005-378466

<151> 2005-12-28

20 <160> 34

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 1

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

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

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

10 <210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

```

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

<210> 4

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

```

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

10

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

```

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

<210> 6

5 <211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

```

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

10

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

```

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

<210> 8

5 <211>

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

```

Ser Thr Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

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

10 <210> 9

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 10

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

<210> 11

<211> 106

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 12

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

<210> 13

<211> 35

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 13

15 aatgcgccg ccaccatgac aacaccaga aattc 35

<210> 14

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 14

gctctagatt aaggagagct gtcatttc 29

<210> 15

10 <211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 17

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

<210> 18

<211> 108

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

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

<210> 19

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 19

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

<210> 20

<211> 124

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 124

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

<210> 23

<211> 159

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 23

Ser Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Cys Ala Gly Cys Ala
 100 105 110
 Gly Cys Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly
 115 120 125
 Cys Gly Cys Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 130 135 140

Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala Cys Gly
 145 150 155

<210> 24

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

```

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

<210> 25

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

```

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

10 <210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

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

<210> 27

<211> 403

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 27

actagttgca gctcctattt gggttctttc tcagatccag ctggtgcaga gcggcagcga 60
 gctgaagaag cccggcgcca gcgtgaaggt gagctgcaag gccagcggct acaccttcac 120
 caacttcggc gtgaactggg tgcgccaggc ccccggcaag ggcctggagt ggatgggctg 180
 gatcaacacc tacaccggcg agcccagcta cgcccagggc ttcaccggcc gcttcgtgtt 240
 cagcctggac gccagcgtga gcaccgccta cctgcagatc agcagcctga aggccgagga 300
 caccgccacc tacttctgca cccgccgcac caactactac ggcaccagct actactacgc 360
 catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtctcg agc 403

<210> 28

<211> 403

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 28

actagttgca gctcctattt gggttctttc tcagatccag ctggtgcaga gcggcagcga 60
 gctgaagaag cccggcgcca gcgtgaaggt gagctgcaag gccagcggct acaccttcac 120
 caacttcggc gtgaactggg tgaagcaggc ccccggcaag ggcctgaagt ggatgggctg 180
 gatcaacacc tacaccggcg agcccagcta cgccgacgac ttcaagggcc gcttcgcctt 240
 cagcctggac gccagcgcga gcaccgccta cctgcagatc agcagcctga aggccgagga 300
 catggccacc tacttctgca cccgccgcac caactactac ggcaccagct actactacgc 360

catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtctcg agc 403

<210> 29

<211> 403

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 29

```

actagttgca gctcctatth gggttctttc tcagatccag ctggtgcaga gcggcagcga    60
gctgaagaag cccggcgcca gcgtgaaggt gagctgcaag gccagcggct acaccttcac    120
caacttcggc gtgaactggg tgcgccaggc ccccgcaag ggcctgaagt ggatgggctg    180
gatcaacacc tacaccggcg agcccagcta cggccagggc ttaccggcc gcttcgcctt    240
cagcctggac gccagcgtga gcaccgccta cctgcagatc agcagcctga aggccgagga    300
caccgccacc tacttctgca cccgccgcac caactactac ggcaccagct actactacgc    360
catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtctcg agc                        403
    
```

5

<210> 30

<211> 403

<212> ADN

<213> Mus musculus

10 <400> 30

```

actagttgca gctcctatth gggttctttc tcagatccag ctggtgcaga gcggccccga    60
gctgaagaag cccggcgcca gcgtgaagat cagctgcaag gccagcggct acaccttcac    120
caacttcggc gtgaactggg tgaagcaggc ccccgcaag ggcctgaagt ggatgggctg    180
gatcaacacc tacaccggcg agcccagcta cggccagcac ttcaagggcc gcttcgcctt    240
cagcctggac gccagcgtga gcaccgccta cctgcagatc agcagcctga aggccgagga    300
caccagcacc tacttctgca cccgccgcac caactactac ggcaccagct actactacgc    360
catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtctcg agc                        403
    
```

<210> 31

<211> 340

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 31

```

ccgcggtgcc agaagcaccg tgatgaccca gagccccgac agcctggccg tgagcctggg    60
cgagcgcgcc accatcaact gcaagagcag ccagagcgtg agcaacgacg tggcctggta    120
ccagcagaag cccggccaga gcccgaaggf gctgatctac ttcgccagca accgctacag    180
cggcgtgccc gaccgcttca gcggcagcgg ctacggcacc gacttcaccc tgaccatcag    240
cagcctgcag gccagggacg tggccgtgta cttctgccag caggactaca gcagcccct    300
gaccttcggc gccggcacca agctggagat caagcgtacg                          340
    
```

<210> 32

<211> 340

20 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 32

```

ccgcggtgcc agaagcaccg tgatgaccca gagccccagc ttcctgagcg ccagcgtggg    60
cgaccgctg accatcacct gcaaggccag ccagagcgtg agcaacgacg tggcctggta    120
ccagcagaag cccggccaga gcccgaaggt gctgatctac ttcgccagca accgctacac    180
cggcgtgccc gaccgcttca gcggcagcgg ctacggcacc gacttcaccc tgaccatcag    240
cagcctgcag gccgaggacg tggccgtgta cttctgccag caggactaca gcagcccct    300
gaccttcggc gccggcacca agctggagat caagcgtacg    340
    
```

<210> 33

5 <211> 340

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 33

```

ccgcggtgcc agaagcaccg tgatgaccca gagccccgac agcctggccg ttagcctggg    60
cgagcgcgcc accatcaact gcaagagcag ccagagcaac agcaacgacg tggcctggta    120
ccagcagaag cccggccaga gcccgaaggt gctgatctac ttcgccagca accgctacag    180
cggcgtgccc gaccgcttca gcggcagcgg ctacggcacc gacttcaccc tgaccatcag    240
cagcctgcag gccgaggacg tggccgtgta cttctgccag caggactaca gcagcccct    300
gaccttcggc gccggcacca agctggagct gaagcgtacg    340
    
```

10 <210> 34

<211> 340

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 34

```

ccgcggtgcc agaagcaccg tgatgaccca gagccccgac agcctggccg ttagcctggg    60
cgagcgcgtg accatcaact gcaaggccag ccagagcgtg agcaacgacg tggcctggta    120
ccagcagaag cccggccaga gcccgaaggt gctgatctac ttcgccagca accgctacac    180
cggcgtgccc gaccgcttca gcggcagcgg ctacggcacc gacttcacct tcaccatcag    240
cagcgtgcag gccgaggacg tggccgtgta cttctgccag caggactaca gcagcccct    300
gaccttcggc gccggcacca agctggagct gaagcgtacg    340
    
```

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-CD20 de murino que tiene actividades inhibitoras de crecimiento celular que incluyen apoptosis contra células que expresan el antígeno CD20 humano en el cultivo de células que expresan el antígeno CD20 sin células efectoras, en donde las secuencias de aminoácido de la región variable de cadena H y la región variable de cadena L son la SEQ ID NOS: 1 y 7.
2. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico, en donde se fusionan la secuencia de aminoácido de la región variable del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con la reivindicación 1 y la secuencia de aminoácido de la región constante de inmunoglobulina humana.
4. Un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado al utilizar la secuencia de aminoácido de la región variable CDR del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con la reivindicación 1 y una secuencia de aminoácido de inmunoglobulina humana.
5. El anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, que tiene citotoxicidad contra células que expresan el antígeno CD20 en la presencia de un complemento humano.
6. Una célula de mamífero aislada incorporada con una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. La célula de mamífero de acuerdo con la reivindicación 6, que es una célula CHO.
8. Un agente diagnóstico que comprende el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, o 3 a 5, como un ingrediente activo.
9. Un agente terapéutico que comprende el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 como un ingrediente activo.

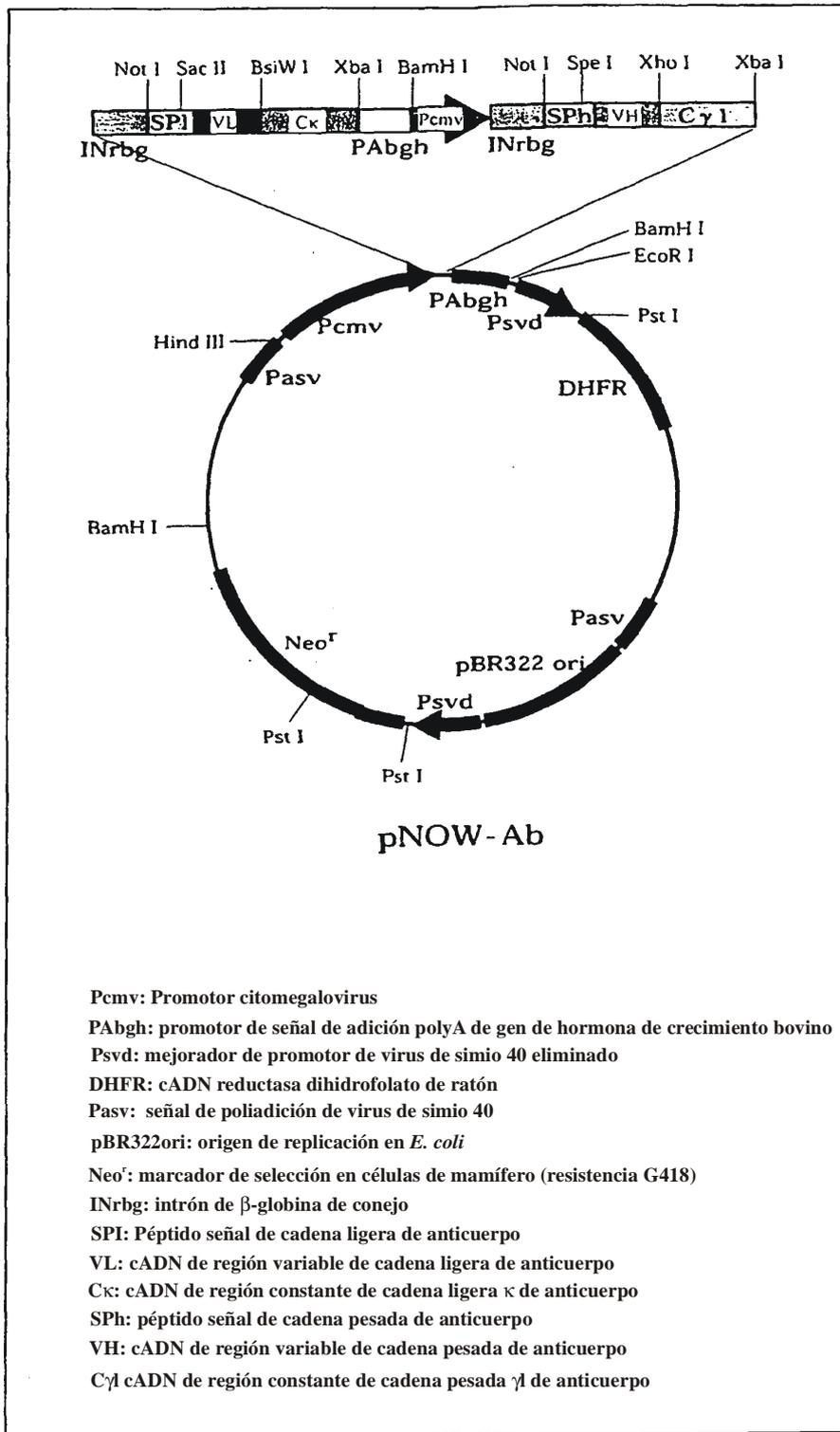


Fig. 1

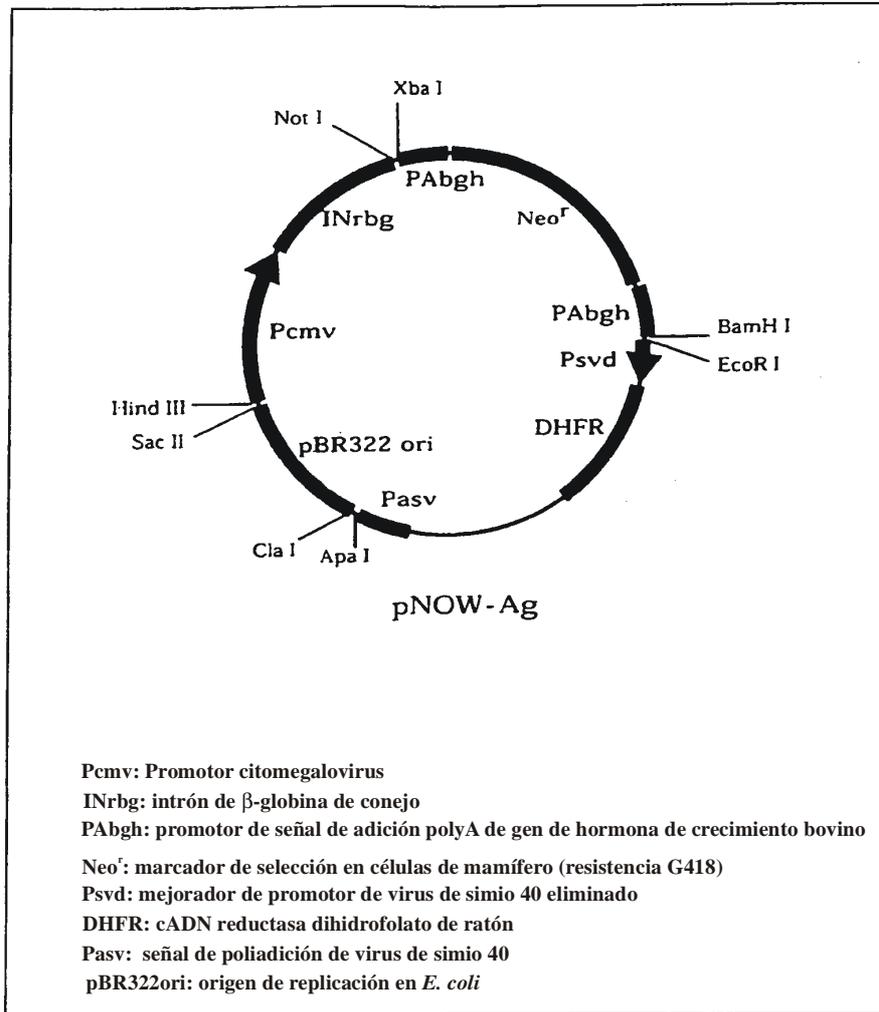


Fig. 2

Cebador CD20 5' Humano (SEQ ID NO: 13)
hCD20-S-GK-Not aatgcgccgcccaccatgacaacaccagaaattc
Cebador CD20 3' Humano (SEQ ID NO: 14)
hCD20-E-Xba gctctagattaaggagagctgtcattttc

Fig. 3

1K1422 Secuencia de región V de cadena H (SEQ ID NO: 1)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCRASGYFTFTNYNMHWIKQTPQGGLWIGAIYPCGSDTSYNRKFVKGKATLTADTS
 SSTAYMQFSSLTSDSAVYYCARFTYYYGGTYGAMDYWGQGTSVTVSL

1K1791 Secuencia de región V de cadena H (SEQ ID NO: 2)
 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNFCVNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPYADDFKGRFAFSLEAS
 ANTAYLQINNLNKNDMSTYFCTRRTNYYGTSYYYAMDYWGQGTSVTVSS

1K1712 Secuencia de región V de cadena H (SEQ ID NO: 3)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMCKASGFTFTSYNLHWVKQTPQGGLWIGAIYPCGSDTSYNQQFKGKATLTADKS
 SNTAYMQLNSLTSEDSAVYYCCARSAMISTGNWYFDYWGQGTTLTVSS

1K1402 Secuencia de región V de cadena H (SEQ ID NO: 4)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMCKASGFTFTSYNMHWVKQTPQGGLWIGGIYPCNGDTSYNQKFKGKATLTADKS
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARFYCYGSMGAMDYWGQGTSVTVSS

1K1736 Secuencia de región V de cadena H (SEQ ID NO: 5)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMCKASGYFTFTSYNLHWVKQTPQGGLWIGGIYPCNGDTSYNQKFKVKATLTADKS
 SNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWIYYGNYEGTLDYWGQGTSVTVSS

1K1782 Secuencia de región V de cadena H (SEQ ID NO: 6)
 QVQLQQSGAELAKPGASVKMCKASGYFTFTSYMHWVKQRPQGGLWIGYITPSTGYTDYNNKFKDKATLTADRS
 SSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARSGPYFDVWGAGTTVTVSS

1K1422 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 7)
 QIVLTQSPPIMSASLGEEITLTCASSSRVSYMLWYQQKSGTSPKLLIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTIFYSLTIS
 SVEAEDAADYYCHQWTSNPCTFGGKLEIK

1K1791 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 8)
 STVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKVLIIYFASNRYTGVDPDRFTGSGYGTDFFTI
 NTVQAEDLAVYFCQQDYSSPLTFGAGTKLELK

1K1712 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 9)
 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS
 RVEAEDATYYCQQWTFNPPTFGSGTKLEIK

1K1402 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 10)
 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIT
 RVEAEDAATYYCQQWTFNPPTFGAGTKLELK

1K1736 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 11)
 QIVLSQSPAILSSPGEKVTMTCRASSSVSYMLWYQQKPGSSPEPWIYATSNLASGVPARFSGGSGTSYSLTIS
 RVEAEDAATYYCQQWTFNPPTFGGKLEIK

1K1782 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 12)
 DILLTQSPAILFVSPGERVLSRCRASQNIQTSIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESFGIPSRFSGSGSGTDFTLISI
 NSVEEDIADYYCQNSWPPTFGSGTKLEIK

1K0924 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 15)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMCKASGYFTFTSYNIHWVKQTPQGGLWIGAIYPCNGDTSYNQKFKGKATLTSKKS
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARMSTMITGFDYWGQGTTLTVSS

1K1228 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 16)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKVSKASGFTFTSYNLHWVKQTPQGLVWIGAIYPCNGDTSYNQKFRGKATLTADIS
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYYGYDAMDYWGQGTSVTVSS

1K0924 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 17)
 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQRPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYYFTIS
 RVEAEDAATYYCQQWNSNPPTHGGKLEIK

1K1228 Secuencia de región V de cadena L (SEQ ID NO: 18)
 EIILTQSPITMAASPGEKITITCSASSISSYYLRWYQQKPGFSPKVLIIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIG
 TMEAEDVATYYCQQNTVPLTFGSGTKLEIK

Fig. 4

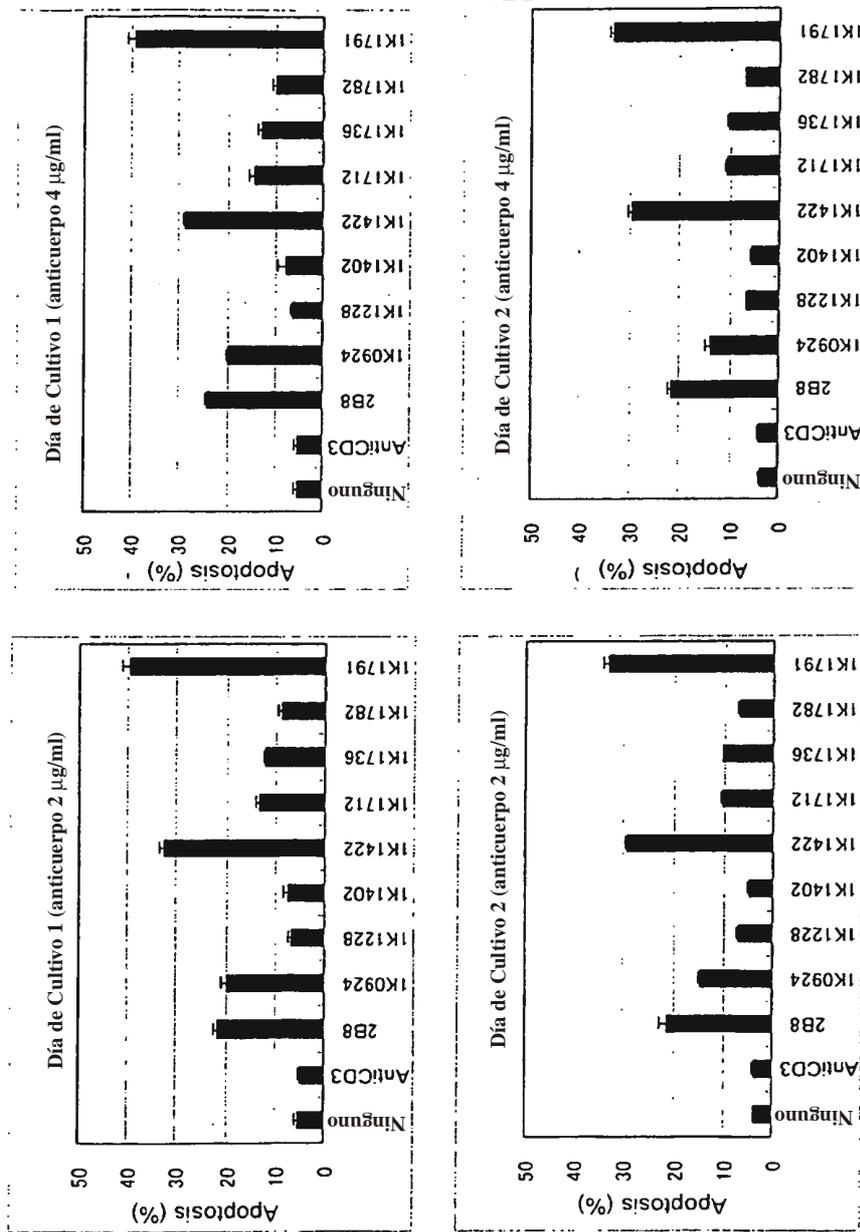


Fig. 5

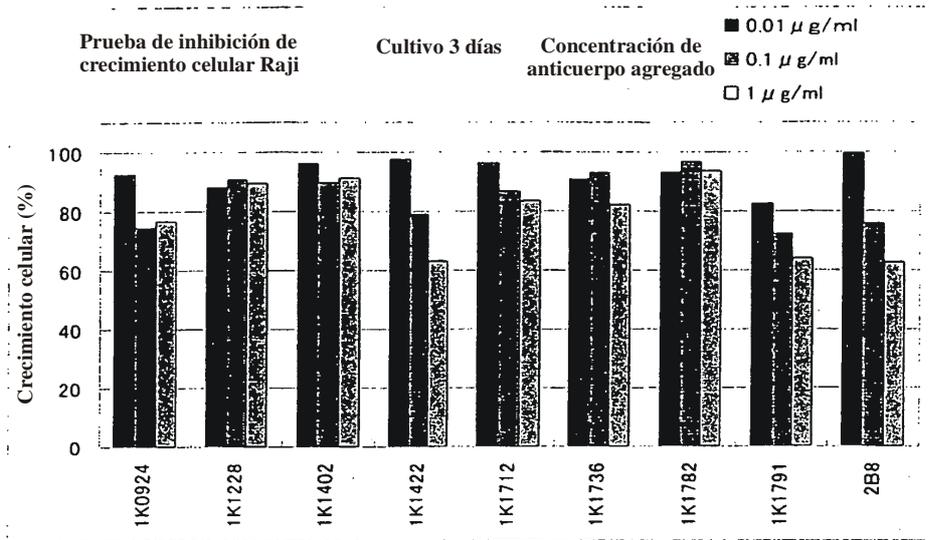


Fig. 6

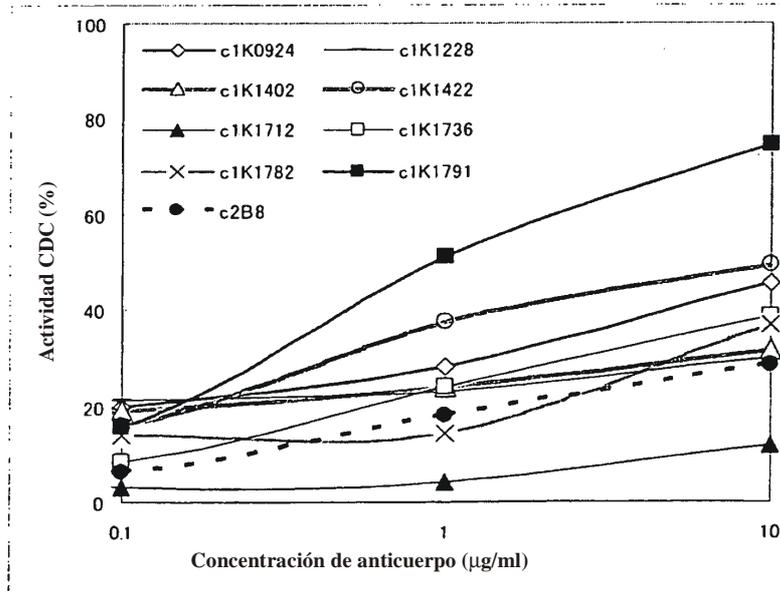


Fig. 7

Secuencia de región V cadena H de anticuerpo humanizado (abbH1791) (SEQ ID NO: 19)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLEWMGW INTYTGEPSTY
 AQGFTGRFVF SLDASVSTAY LQISLKAED TATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV
 TVSS

Ejemplo de secuencia de región V cadena H de anticuerpo humanizado (abbH1791) (SEQ ID NO: 27)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTTCTCAGATCCAGCTGGTGACAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGCG
 CCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGGAGCCAGCTACGCCA
 GGGTTACCGGCGCTTCGTGTTACGCTGGACGCCAGCGTGAGCACCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCACCGCGCCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

Secuencia de región V cadena H de anticuerpo humanizado (fraH1791) (SEQ ID NO: 20)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSTY
 ADDFKGRFAF SLDASASTAY LQISLKAED MATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV
 TVSS

Ejemplo de secuencia de región V cadena H de anticuerpo humanizado (fraH1791) (SEQ ID NO: 28)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTTCTCAGATCCAGCTGGTGACAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGAA
 GCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGGAGCCAGCTACGCCA
 CGACTTCAAGGGCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGCCAGCACCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACATGGCCACCTACTTCTGCACCGCGCCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

Secuencia de región V cadena H de anticuerpo humanizado (sdrH1791) (SEQ ID NO: 21)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSTY
 AQGFTGRFAF SLDASVSTAY LQISLKAED TATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV
 TVSS

Ejemplo de secuencia de región V cadena H de anticuerpo humanizado (sdrH1791) (SEQ ID NO: 29)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTTCTCAGATCCAGCTGGTGACAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGCG
 CCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGGAGCCAGCTACGCCA
 GGGCTTACCGGCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGTGAGCACCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCACCGCGCCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

Secuencia de región V cadena H de anticuerpo humanizado (venH1791) (SEQ ID NO: 22)

QIQLVQSGPE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSTY
 ADDFKGRFAF SLDASVSTAY LQISLKAED TSTYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV
 TVSS

Ejemplo de secuencia de región V cadena H de anticuerpo humanizado (venH1791) (SEQ ID NO: 30)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTTCTCAGATCCAGCTGGTGACAGCGGCCCCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGAA
 GCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGGAGCCAGCTACGCCA
 CGACTTCAAGGGCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGTGAGCACCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCACCGCGCCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

Fig. 8A

Secuencia de región V cadena L de anticuerpo humanizado (abbL1791) (SEQ ID NO:23)
 STVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVL IYF ASNRYSGVPD
 RFSGSGYGT D FTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLT FGA GTKLEIK
 Ejemplo de secuencia de región V cadena L de anticuerpo humanizado (abbL1791) (SEQ ID NO:31)
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGCCAC
 CATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
 CAAGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACAGCGCGTGCCCGACCGCTTACAGCGCAGCGGCTACGG
 CACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAGCTGGAGATCAAGCGTACG

Secuencia de región V cadena L de anticuerpo humanizado (fraL1791) (SEQ ID NO:24)
 STVMTQSPSF LSASVDRVT ITCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVL IYF ASNRYTGVPD
 RFSGSGYGT D FTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLT FGA GTKLEIK
 Ejemplo de secuencia de región V cadena L de anticuerpo humanizado (fraL1791) (SEQ ID NO:32)
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTTCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAGCCGCTGAC
 CATCACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
 CAAGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACACCGCGTGCCCGACCGCTTACAGCGCAGCGGCTACGG
 CACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAGCTGGAGATCAAGCGTACG

Secuencia de región V cadena L de anticuerpo humanizado (sdrL1791) (SEQ ID NO:25)
 STVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSNS NDVAWYQQKP GQSPKVL IYF ASNRYSGVPD
 RFSGSGYGT D FTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLT FGA GTKLELK
 Ejemplo de secuencia de región V cadena L de anticuerpo humanizado (sdrL1791) (SEQ ID NO:33)
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGCCAC
 CATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCAACAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
 CAAGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACAGCGCGTGCCCGACCGCTTACAGCGCAGCGGCTACGG
 CACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAGCTGGAGCTGAAGCGTACG

Secuencia de región V cadena L de anticuerpo humanizado (venL1791) (SEQ ID NO:26)
 STVMTQSPDS LAVSLGERVT INCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVL IYF ASNRYTGVPD
 RFSGSGYGT D FTFTISSVQA EDVAVYFCQQ DYSSPLT FGA GTKLELK
 Ejemplo de secuencia de región V cadena L de anticuerpo humanizado (venL1791) (SEQ ID NO:34)
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGTGAC
 CATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
 CAAGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACACCGCGTGCCCGACCGCTTACAGCGCAGCGGCTACGG
 CACCGACTTACCCTTACCATCAGCAGCGTGACGCCGAGGACGTGGCCGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAGCTGGAGCTGAAGCGTACG

Fig. 8B

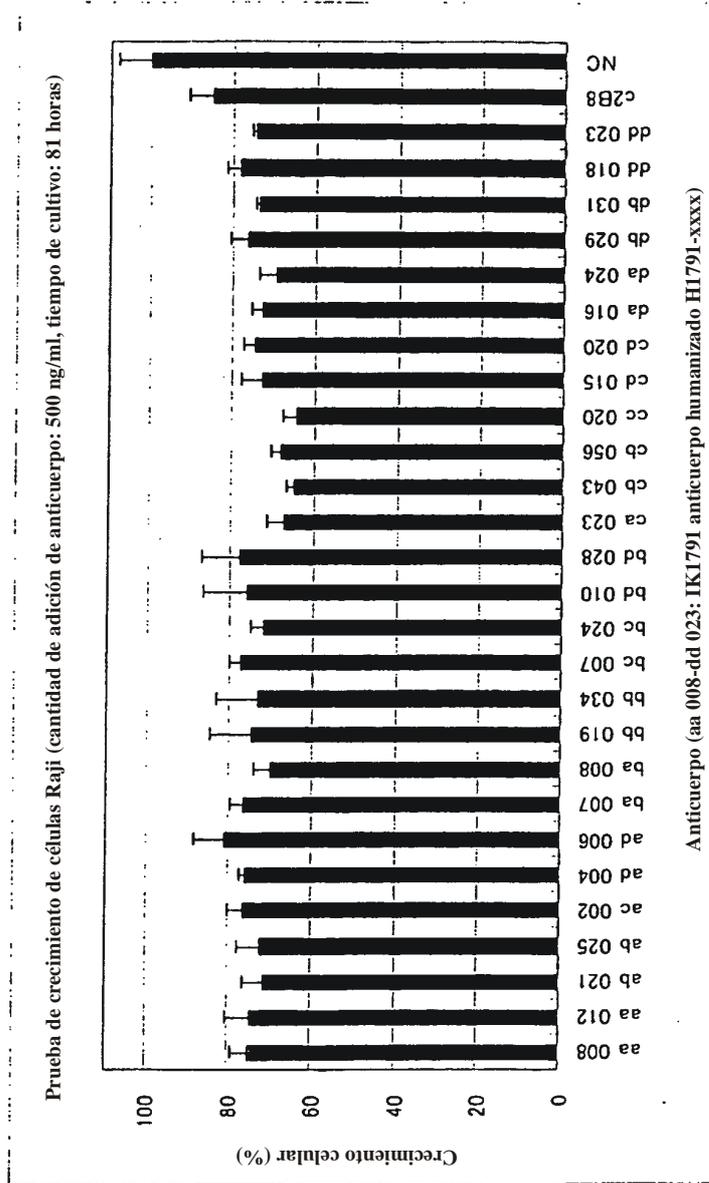


Fig. 9