



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 266**

51 Int. Cl.:
C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99912098 .3**
96 Fecha de presentación : **02.04.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1069185**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2001**

54 Título: **Anticuerpo humanizado hacia el factor tisular humano (TF) y procedimiento para construir el anticuerpo humanizado.**

30 Prioridad: **03.04.1998 JP 10-91850**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.08.2011

73 Titular/es: **CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku, Tokyo, 115-8543, JP**

72 Inventor/es: **Sato, Koh;
Adachi, Hideki y
Yabuta, Naohiro**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 266 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 humanizado hacia el factor tisular humano (TF) y procedimiento para construir el anticuerpo humanizado

5 Campo Técnico

La presente descripción se refiere a un anticuerpo quimérico humano/de ratón que comprende la región variable (región V) de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia el factor tisular humano (TF) y la región constante (región C) de un anticuerpo humano; un anticuerpo humanizado en el que las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la región V de la cadena ligera (cadena L) y la región V de la cadena pesada (cadena H) de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano se han injertado en un anticuerpo humano; la cadena L y la cadena H de dicho anticuerpo; y un fragmento de la región V que constituye la cadena L o la cadena H de dicho anticuerpo. La presente descripción se refiere además a un procedimiento para la producción de un anticuerpo humanizado hacia TF humano.

15 La presente descripción se refiere además al ADN que codifica el anticuerpo anterior, específicamente un fragmento de la región V del mismo, y al ADN que codifica una cadena L o una cadena H que contiene una región V. La presente descripción se refiere además a un vector recombinante que comprende dicho ADN, y a un hospedador transformado con dicho vector.

20 La presente descripción se refiere además a un procedimiento de preparación de un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado hacia TF humano. La presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica y a un agente terapéutico para el síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID) que comprende como ingrediente activo un anticuerpo humanizado hacia TF humano.

25 Técnica Antecedente

El factor tisular (TF), un receptor del factor VII de la coagulación expresado en la superficie celular, desempeña un papel indispensable en la activación de los factores IX y X de la coagulación por medio de la formación de un complejo con el factor VII de la coagulación, y se ha definido como un factor iniciador factible de las reacciones de la coagulación sanguínea.

35 Se sabe que TF se expresa en los fibroblastos, las células musculares lisas, etc., que constituyen el vaso sanguíneo, y que desempeña una función hemostática activando el sistema de la coagulación al lesionarse el vaso sanguíneo.

La CID es una enfermedad en la que la activación del sistema de coagulación en un vaso sanguíneo conduce a la aparición sistémica múltiple de coágulos sanguíneos, principalmente en la microvasculatura. No es infrecuente que la reducción de plaquetas y de factores de coagulación debida a su consumo conduzca a hemorragias, que son el fenómeno opuesto a la coagulación sanguínea. Los microtrombos múltiples pueden provocar una microcirculación deficiente en los órganos principales, que, una vez desarrollada, conduce a una deficiencia funcional irreversible y a un mal pronóstico de la CID, y en este sentido la CID se considera una enfermedad importante.

45 La incidencia de enfermedades subyacentes estimada a partir de los informes de investigación de 1990 y 1992 del Ministerio de Salud y Bienestar, de la Encuesta y Grupo de Estudio de Trastornos de la Coagulación Sanguínea y Enfermedades Específicas, es: neoplasias malignas hematológicas, alrededor del 30%; tumores sólidos, alrededor del 20%; infecciones, alrededor del 15%; enfermedades del embarazo, alrededor del 10%; enfermedades hepáticas, alrededor del 6%; choques, alrededor del 5%; y enfermedades cardiovasculares, alrededor del 3%. La incidencia de CID se eleva hasta alrededor del 15% en la leucemia y alrededor del 6 al 7% en el linfoma maligno, y alrededor del 3% en los tumores sólidos.

50 La CID se desarrolla acompañada por diversas enfermedades mencionadas anteriormente, pero su agente causal es el mismo, es decir, el TF. Así, se cree que el mecanismo de inicio de la CID es: la formación y/o la expresión anormalmente elevada de TF en las células cancerosas en la leucemia aguda, el linfoma maligno, y los tumores sólidos; la formación y/o expresión incrementada de TF en los monocitos y/o las células endoteliales en las infecciones (en particular, la septicemia provocada por bacilos gramnegativos); el flujo de TF hacia la sangre desde el tejido hepático necrosado en la hepatitis fulminante; la expresión de TF en la luz del vaso sanguíneo en el aneurisma aórtico, el aneurisma cardíaco, y el hemangioma gigante; y también el flujo TF hacia la sangre en las enfermedades del embarazo (embolismo de líquido amniótico y abruptio placentae) y en procedimientos quirúrgicos, lesiones y quemaduras.

60 El tratamiento de las enfermedades originales (subyacentes) es de sumo interés, lo que, sin embargo, no es sencillo en términos prácticos.

65 Como método actual de tratamiento de la CID, se está usando la terapia anticoagulante y la terapia de sustitución. Se usan principalmente preparaciones de heparina (heparina fraccionada, heparina de bajo peso molecular) para la terapia anti-coagulante. También se usan inhibidores de proteasas sintéticos (mesilato de gabexato, mesilato de

nafamostat) y plasma concentrado (preparaciones de anti-trombina III, proteína C activada). Como terapia de sustitución, hay concentrados de plaquetas, plasmas recientes congelados (suministro de fibrinógeno), eritrocitos lavados, y similares.

5 Sin embargo, los agentes terapéuticos actuales no son satisfactorios en cuanto a la eficacia y los efectos secundarios, y en la mayoría de los casos es imposible la desaparición de la CID. Por lo tanto, existe la necesidad del uso de fármacos que tengan efectos terapéuticos elevados y efectos secundarios bajos.

10 Por otra parte, como otros intentos de tratamiento de la CID se pueden mencionar las preparaciones de trombomodulina, hirudina, y agentes anti-PAF, y el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI). Los inhibidores selectivos de FXa están atrayendo la atención como agentes anticoagulantes y/o antitrombóticos administrables oralmente. Además, como agente que neutraliza la actividad del TF, el documento WO 88/07543 describe un anticuerpo monoclonal anti-TF humano de ratón, y el documento WO 96/40921 describe un anticuerpo anti-TF humano humanizado.

15 Se espera que los anticuerpos monoclonales anti-TF humano de ratón constituyan un agente terapéutico seguro y eficaz, ya que no exhiben los síntomas de hemorragia asociados a la eficacia principal en la CID. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales de ratón son sumamente inmunógenos (a veces se denomina "antigénicos"), y así el valor terapéutico médico de los anticuerpos de ratón en seres humanos es limitado. Por ejemplo, la vida media de los anticuerpos de ratón en los seres humanos es relativamente corta, y por lo tanto no pueden exhibir completamente su efecto previsto. Además, el anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) que se desarrolla en respuesta al anticuerpo de ratón administrado provoca reacciones inmunológicas que son desfavorables y peligrosas para los pacientes. Así, no se pueden administrar repetidamente anticuerpos monoclonales de ratón a seres humanos.

25 Para resolver estos problemas, se han desarrollado métodos que pretenden reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos derivados de animales no humanos, tales como (los anticuerpos monoclonales derivados de) ratones. Uno de ellos es un método para la producción de un anticuerpo quimérico en el que una región variable (región V) del anticuerpo deriva de un anticuerpo monoclonal de ratón, y una región constante (región C) del mismo deriva de un anticuerpo humano adecuado.

30 Debido a que el anticuerpo quimérico obtenido contiene una región variable de un anticuerpo de ratón original en forma completa, se espera que se una a un antígeno con una afinidad idéntica a la del anticuerpo de ratón original. Además, en el anticuerpo quimérico la proporción de las secuencias de aminoácidos derivadas de animales no humanos está sustancialmente reducida, y por lo tanto se espera que tenga una inmunogenicidad reducida en comparación con el anticuerpo de ratón original. Sin embargo, todavía es posible que surja una respuesta inmunológica hacia la región variable de ratón (LoBuglio, A. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 4220-4224, 1989).

35 Se espera que un segundo método para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo de ratón, aunque mucho más complicado, reduzca drásticamente la inmunogenicidad potencial del anticuerpo de ratón. En este método, se injerta la región determinante de la complementariedad (CDR) sola de un anticuerpo de ratón en una región variable humana para producir una región variable humana "remodelada". Según se desee, sin embargo, algunas secuencias de aminoácidos de las regiones estructurales (FRs) que soportan las CDRs se pueden injertar de la región variable de un anticuerpo de ratón en la región variable humana para obtener la aproximación más cercana a la estructura del anticuerpo de ratón original. Después, la región variable humana remodelada humanizada se liga a la región constante humana. En el anticuerpo humanizado finalmente remodelado, las porciones derivadas de las secuencias de aminoácidos no humanas son solamente las CDRs y una pequeña porción de las FRs. Las CDRs comprenden secuencias de aminoácidos hipervariables, y no muestran secuencias específicas de especie.

40 Para un anticuerpo humanizado, véase además Riechmann, L. et al., Nature 332: 323-327, 1988; Verhoeve, M. et al., Science 239: 1534-1536, 1998; Kettleborough, C. A. et al., Protein Engng., 4: 773-783, 1991; Maeda, H., Human Antibodies and hybridoma, 2: 124-134, 1991; Gorman, S. D. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 4181-4185, 1991; Tempest, P R., Bio/Technology, 9: 226-271, 1991; Co, M. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2869-2873, 1991; Cater, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289, 1992; Co, M. S. et al., J. Immunol., 148: 1149-1154, 1992; y Sato, K. et al., Cancer Res., 53: 851-856, 1993.

55 En la técnica de humanización convencional, parte de la región estructural (FR) incluye una secuencia de aminoácidos que se injertó de la región variable de un anticuerpo de ratón en la región variable humana. Así, cuando se administra como agente terapéutico en seres humanos, existe el riesgo de que se formen anticuerpos hacia un sitio que tenga una secuencia de aminoácidos que no está presente en seres humanos, aunque consista solamente en uno a unos cuantos aminoácidos. Para evitar este riesgo, se ideó una tercera técnica de humanización. Así, el método implica, para cuatro FRs (FR1 - 4) necesarias para soportar la estructura tridimensional de tres CDRs, la sustitución de la FR de un anticuerpo humano que tiene una homología elevada con la FR del anticuerpo de ratón presente en la base de datos mediante el uso de una FR como unidad. En este caso, se seleccionan varias FRs de anticuerpos humanos presentes en la base de datos, y se reordenan secuencialmente para preparar un anticuerpo humanizado que tiene una actividad elevada.

65

Al hacerlo, es posible construir anticuerpos humanizados en los que todas las FRs excepto las CDRs de la región variable tienen secuencias de aminoácidos derivadas del anticuerpo humano. Así, el anticuerpo humanizado que porta la CDR de ratón ya no debería tener inmunogenicidad más potente que un anticuerpo humano que contiene la CDR humana.

Aunque se espera que el anticuerpo humanizado sea útil para el tratamiento, como se mencionó anteriormente, no existe ningún procedimiento fijo presente que sea aplicable universalmente a cualquier anticuerpo en el método de producción de un anticuerpo humanizado, y por lo tanto son necesarias diversas estrategias para construir un anticuerpo humanizado que exhiba una actividad de unión y actividad neutralizante suficientes hacia un antígeno específico (véase, por ejemplo, Sato, K. et al., Cancer Res., 53: 851-856, 1993).

Descripción de la Invención

Un objetivo de la presente descripción es proporcionar un anticuerpo quimérico humano/de ratón que comprende la región variable (región V) de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia el factor tisular (TF) humano y la región constante (región C) de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado en el que las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la región V de la cadena ligera (cadena L) y la región V de la cadena pesada (cadena H) de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano se han injertado en un anticuerpo humano, la cadena L y la cadena H de dicho anticuerpo, y un fragmento de la región V que constituye la cadena L o la cadena H de dicho anticuerpo. Un objetivo adicional de la presente descripción es proporcionar un procedimiento para la producción de un anticuerpo humanizado hacia TF humano.

Un objetivo adicional de la presente descripción es proporcionar un ADN que codifica el anticuerpo anterior, específicamente un fragmento de la región V del mismo, y un ADN que codifica una cadena L o una cadena H que contiene una región V. Un objetivo adicional de la presente descripción es proporcionar un vector de ADN recombinante que comprende dicho ADN, y un hospedador transformado con dicho vector. Un objetivo adicional de la presente descripción es proporcionar una composición farmacéutica y un agente terapéutico para el síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID) que comprende como ingrediente activo un anticuerpo humanizado hacia TF humano.

Tras un estudio profundo para resolver los problemas anteriores, los inventores de la presente descripción han obtenido con éxito un anticuerpo en el que la inmunogenicidad en humanos del anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano está reducida, y además han desarrollado un procedimiento para la producción de un anticuerpo humanizado nuevo, y por lo tanto han completado la presente descripción.

Así, la presente descripción se refiere a una cadena H quimérica que comprende la región C de la cadena H de un anticuerpo humano y un fragmento de la región V de la cadena H de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano. Como región V de la cadena H, se puede mencionar una que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 9, y como región C, se puede mencionar una que deriva de la región Cy4.

Además, la presente descripción se refiere a una cadena L quimérica que comprende la región C de la cadena L de un anticuerpo humano y un fragmento de la región V de la cadena L de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano. Como región V de la cadena L, se puede mencionar una que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 15, y como región C de la cadena L, se puede mencionar una que deriva de la región Ck.

Además, la presente descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal quimérico humano/de ratón hacia TF humano, y dicho anticuerpo comprende la cadena H quimérica y la cadena L quimérica anteriores.

La presente descripción se refiere además a un fragmento de la región V de la cadena H de un anticuerpo humanizado, y dicho fragmento comprende las regiones estructurales (FRs) 1-4 de la región V de la cadena H de un anticuerpo humano y las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) 1-3 de la región V de la cadena H de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano. Como CDR 1-3, se puede mencionar una que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 133-135, respectivamente. Como FR1 de la región V de la cadena H de un anticuerpo humano, se puede mencionar la FR1 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 40% o más con la FR1 de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón; como FR2, se puede mencionar la FR2 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 40% o más con la FR2 de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón; como FR3, se puede mencionar la FR3 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 40% o más con la FR3 de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón; y como FR4, se puede mencionar la FR4 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 40% o más con la FR4 de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón;

Preferiblemente, como FR1 de la región V de la cadena H de un anticuerpo humano, se puede mencionar la FR1 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 50% o más con la FR1 de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón; como FR2, se puede mencionar la FR2 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 70% o más con la FR2 de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón; como FR3, se puede mencionar la

FR3 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 65% o más con la FR3 de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón; y como FR4, se puede mencionar la FR4 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 80% o más con la FR4 de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón. Como ejemplos específicos, como FR1 de la región V de la cadena H de un anticuerpo humano, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130; como FR2, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130, el anticuerpo humano P01742, y el anticuerpo humano Z80844; como FR3, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130, el anticuerpo humano Z34963, el anticuerpo humano P01825, el anticuerpo humano M62723, el anticuerpo humano Z80844, el anticuerpo humano L04345, el anticuerpo humano S78322, el anticuerpo humano Z26827, el anticuerpo humano U95239, y el anticuerpo humano L03147; y como FR4, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130.

Como ejemplos preferidos, como FR1 de la región V de la cadena H de un anticuerpo humano, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130; como FR2, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130 y el anticuerpo humano Z80844; como FR3, se puede mencionar el anticuerpo humano Z34963, el anticuerpo humano M62723, y el anticuerpo humano U95239; y como FR4, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130. Como ejemplos más preferidos, como FR1 de la región V de la cadena H de un anticuerpo humano, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130; como FR2, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130; como FR3, se puede mencionar el anticuerpo humano Z34963 y el anticuerpo humano U95239; y como FR4, se puede mencionar el anticuerpo humano L39130.

Además, tal como se usa en la presente memoria, los números de las regiones estructurales se basan en la definición de Kabat (Kabat, E. A. et al., US Dept. Health and Services, US Government Printing Offices, 1991).

La presente descripción se refiere además a un fragmento de la región V de la cadena H de un anticuerpo humanizado, y dicho fragmento comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°: 30, 40, 42, 50, 52, 58, 60, 64, 70, 72, 76, 78, 82, y 84.

La presente descripción se refiere además a un fragmento de la región V de la cadena L de un anticuerpo humanizado, y dicho fragmento comprende las FRs 1-4 de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano y las CDRs 1-3 de la región V de la cadena L de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano. Como CDRs 1-3, se puede mencionar una que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 136-138, respectivamente. Como FR1 de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano, se puede mencionar una que tiene una homología del 40% o más con la FR1 de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón; como FR2, se puede mencionar la FR2 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 40% o más con la FR2 de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón; como FR3, se puede mencionar la FR3 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 40% o más con la FR3 de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón; y como FR4, se puede mencionar la FR4 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 40% o más con la FR4 de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón;

Preferiblemente, como FR1 de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano, se puede mencionar la FR1 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 75% o más con la FR1 de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón; como FR2, se puede mencionar la FR2 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 80% o más con la FR2 de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón; como FR3, se puede mencionar la FR3 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 70% o más con la FR3 de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón; y como FR4, se puede mencionar la FR4 de un anticuerpo humano que tiene una homología del 80% o más con la FR4 de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón; Como ejemplos específicos, como FR1 de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano, se puede mencionar el anticuerpo humano Z37332; como FR2, se puede mencionar el anticuerpo humano Z37332 y el anticuerpo humano X93625; como FR3, se puede mencionar el anticuerpo humano Z37332, el anticuerpo humano S68699, y el anticuerpo humano P01607; y como FR4, se puede mencionar el anticuerpo humano Z37332. Como ejemplos más preferidos, como FR1 de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano, se puede mencionar el anticuerpo humano Z37332; como FR2, se puede mencionar el anticuerpo humano X93625; como FR3, se puede mencionar el anticuerpo humano S68699; y como FR4, se puede mencionar el anticuerpo humano Z37332.

Además, tal como se usa en la presente memoria, los números de las regiones estructurales se basan en la definición de Kabat (Kabat, E. A. et al., US Dept. Health and Services, US Government Printing Offices, 1991).

La presente descripción se refiere además a un fragmento de la región V de la cadena L de un anticuerpo humanizado, y dicho fragmento comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°: 93, 99, 101, 107, y 109.

La presente descripción se refiere además a la cadena H de un anticuerpo humanizado hacia TF humano, y dicha cadena comprende un fragmento de la región V de la cadena H del anticuerpo humanizado anterior y un fragmento de la región C de la cadena H de un anticuerpo humano. Se puede mencionar la región Cy4 como la región C; como FRs 1-4 derivadas de un anticuerpo humano, se pueden mencionar las derivadas cada una del anticuerpo humano L39130 (FR1), el anticuerpo humano L39130 (FR2), el anticuerpo humano Z34963 (FR3) o el anticuerpo humano

U95239 (FR3), el anticuerpo humano L39130 (FR4); y como CDRs 1-3, se pueden mencionar las derivadas cada una de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 133-135, respectivamente.

La presente descripción se refiere además a la cadena L de un anticuerpo humanizado hacia TF humano, y dicha cadena comprende un fragmento de la región V de la cadena L del anticuerpo humanizado anterior y un fragmento de la región C de la cadena L de un anticuerpo humano. Se puede mencionar la región C_k como la región C; como FRs 1-4 derivadas de un anticuerpo humano, se pueden mencionar las derivadas cada una del anticuerpo humano Z37332 (FR1), el anticuerpo humano X93625 (FR2), el anticuerpo humano S68699 (FR3), y el anticuerpo humano Z37332 (FR4); y como CDRs 1-3, se pueden mencionar las derivadas cada una de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 136-138, respectivamente.

La presente descripción se refiere además a un anticuerpo humanizado hacia TF humano, y dicho anticuerpo comprende la cadena L y la cadena H del anticuerpo humanizado anterior.

La presente descripción se refiere además a un procedimiento para la producción de un anticuerpo humanizado hacia TF humano. El proceso de humanización se refiere al método de seleccionar las FRs 1-4 que soportan la estructura de las CDRs 1-3 que son el sitio de reconocimiento del antígeno para la cadena H o la cadena L. Así, la presente descripción se refiere al método de seleccionar algunas de las FRs de un anticuerpo humano que tienen una homología elevada con la FR de un anticuerpo de ratón con cada FR como unidad, y generar un anticuerpo humanizado que tiene la actividad deseada mediante un reordenamiento secuencial de las FR.

Más específicamente, la invención reivindicada se refiere a un procedimiento de preparación de un anticuerpo humanizado natural que tiene una región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de animales no humanos y una región estructural (FR) derivada de un anticuerpo humano natural, y que tiene una inmunogenicidad reducida, y dicho método comprende las etapas de:

(1) preparar un anticuerpo monoclonal no humano que responde al antígeno de interés;

(2) preparar anticuerpos humanos que tienen una homología elevada con la secuencia de aminoácidos de la FR del anticuerpo monoclonal del punto (1) anterior;

(3) sustituir las cuatro FRs del anticuerpo humano del punto (2) anterior con las FRs correspondientes del anticuerpo monoclonal no humano del punto (1) anterior para generar el primer anticuerpo humanizado;

(4) determinar la capacidad del anticuerpo humanizado generado en el punto (3) anterior de unirse al antígeno o de neutralizar la actividad biológica del antígeno;

(5) sustituir una a tres FRs del anticuerpo humanizado generado en el punto (3) anterior con las FRs correspondientes de un anticuerpo humano que es diferente del usado en el punto (3) entre los anticuerpos humanos preparados en el punto (2) para generar el segundo anticuerpo humanizado;

(6) comparar la capacidad del segundo anticuerpo humanizado generado en el punto (5) anterior y el primer anticuerpo humanizado generado en el punto (3) anterior en función de la capacidad de unirse al antígeno o de neutralizar la actividad biológica del antígeno, por lo que se selecciona un anticuerpo humanizado que tiene una actividad favorable;

(7) lleva a cabo las etapas anteriores de los puntos (3) a (6) para el anticuerpo humanizado seleccionado en el punto (6) anterior; y

(8) repetir las etapas anteriores de los puntos (3) a (6) hasta que se obtiene un anticuerpo humanizado que tiene una actividad equivalente al anticuerpo monoclonal no humano del punto (1) anterior.

La invención reivindicada se refiere además a un procedimiento según el párrafo anterior, en el que dicho antígeno de interés es el factor tisular (TF) humano.

La invención reivindicada se refiere además a un procedimiento para la producción de un anticuerpo humanizado natural según los dos párrafos previos que comprende las etapas de:

(1) obtener un anticuerpo humanizado natural mediante un procedimiento según cualquiera de los dos párrafos previos;

(2) introducir un ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado natural en una célula hospedadora; y

(3) cultivar la célula hospedadora.

Una vez que se obtiene un anticuerpo humanizado que tiene un cierto grado de actividad de neutralización de TF humano, se lleva a cabo una búsqueda de homología adicional para una FR específica en la región V de la cadena H y de la cadena L, de manera que se puede seleccionar un anticuerpo humano que tiene una homología elevada. Añadiendo el anticuerpo humano así obtenido a un grupo de anticuerpos humanos en la etapa (2) anterior y repitiendo adicionalmente las etapas de (3) a (6), se puede obtener un anticuerpo humanizado que tiene la actividad deseada.

La presente descripción se refiere además al ADN que codifica un fragmento de la región V de la cadena H o un fragmento de la región V de la cadena L de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano. Como secuencia de aminoácidos y ADN codificante del fragmento de la región V de la cadena H o del fragmento de la región V de la cadena L, se puede mencionar una que incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID N°: 9 ó 15, respectivamente.

La presente descripción se refiere además a un ADN que codifica la cadena H quimérica o la cadena L quimérica anteriores. Como ADN que codifica dicha cadena H, se puede mencionar uno que incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID N°: 9, y como ADN que codifica dicha cadena L, se puede mencionar uno que incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID N°: 15.

La presente descripción se refiere además al ADN que codifica un fragmento de la región V de la cadena H o un fragmento de la región V de la cadena L del anticuerpo humanizado anterior. Como ADN que codifica el fragmento de la región V de la cadena H, se puede mencionar uno que incluye cualquiera de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID N°: 29, 39, 41, 49, 51, 57, 59, 63, 69, 71, 75, 77, 81, o 83, y como ADN que codifica el fragmento de la región V de la cadena L, se puede mencionar uno que incluye cualquiera de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID N°: 92, 98, 100, 106, o 108.

La presente descripción se refiere además al ADN que codifica la cadena H de un anticuerpo humanizado.

La presente descripción se refiere además al ADN de la cadena H de un anticuerpo humanizado, y dicho ADN comprende el ADN que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°: 30, 40, 42, 50, 52, 58, 60, 64, 70, 72, 76, 78, 82, o 84. Como dicho ADN, se puede mencionar uno que incluye cualquiera de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID N°: 29, 39, 41, 49, 51, 57, 59, 63, 69, 71, 75, 77, 81, o 83.

La presente descripción se refiere además al ADN que codifica la cadena L del anticuerpo humanizado anterior.

La presente descripción se refiere además al ADN de la cadena L de un anticuerpo humanizado, y dicho ADN comprende el ADN que codifica las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°: 93, 99, 101, 107, o 109. Como dicho ADN, se puede mencionar uno que incluye cualquiera de las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID N°: 92, 98, 100, 106, o 108.

La presente descripción se refiere además a un vector de ADN recombinante que contiene cualquiera de los ADNs descritos anteriormente.

La presente descripción se refiere además a un transformante transformado con un vector de ADN recombinante descrito anteriormente.

La presente descripción se refiere además a un procedimiento para generar un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado hacia TF humano, y dicho método comprende cultivar el transformante anterior y obtener un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado hacia TF humano a partir del cultivo recogido.

La presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica y un agente terapéutico para CID que comprende el anticuerpo humanizado anterior como ingrediente activo.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un gráfico que compara la actividad de unión al antígeno de un anticuerpo de la cadena H quimérica/cadena L quimérica, un anticuerpo de la versión a de la cadena H humanizada/cadena L quimérica, y un anticuerpo de la cadena H quimérica/versión a de la cadena L humanizada.

La Figura 2 es un gráfico que compara la actividad neutralizante hacia TF humano de un anticuerpo de la cadena H quimérica/cadena L quimérica, un anticuerpo de la versión a de la cadena H humanizada/cadena L quimérica, y un anticuerpo de la cadena H quimérica/versión a de la cadena L humanizada.

La Figura 3 es un gráfico que compara la actividad de unión al antígeno de un anticuerpo de la cadena H quimérica/cadena L quimérica y un anticuerpo de la versión a de la cadena H humanizada/versión a de la cadena L quimérica.

La Figura 34 es un gráfico que compara la actividad de neutralización de TF humano (la actividad para inhibir la coagulación plasmática por el TF) de un anticuerpo de la cadena H quimérica/cadena L quimérica, un anticuerpo de la versión b de la cadena H humanizada/versión b de la cadena L humanizada, un anticuerpo de la versión i de la cadena H humanizada/versión b de la cadena L humanizada, y un anticuerpo de la versión i de la cadena H humanizada/versión b2 de la cadena L humanizada.

La Figura 35 es una figura que compara la reactividad hacia TF humano tratado bajo diversas condiciones de un anticuerpo de la cadena H quimérica/cadena L quimérica, un anticuerpo de la versión b de la cadena H humanizada/versión b de la cadena L humanizada, un anticuerpo de la versión i de la cadena H humanizada/versión b de la cadena L humanizada, y un anticuerpo de la versión i de la cadena H humanizada/versión b2 de la cadena L humanizada.

Mejor Modo de Llevar a Cabo la Descripción

La presente descripción se explicará a continuación con más detalle.

1. Preparación de un Anticuerpo Monoclonal de Ratón Hacia TF Humano

Se puede generar un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF generando un hibridoma mediante una fusión de células productoras del anticuerpo, obtenidas de animales inmunizados con el antígeno, a células de mieloma, y después seleccionando de los hibridomas obtenidos un clon que produzca el anticuerpo que inhibe de manera específica la actividad de TF.

Así, las células de bazo de un ratón inmunizado con TF como antígeno, que se purificó a partir de placenta humana, se fusionaron a células de mieloma para preparar un hibridoma. Con el fin de cribar los hibridomas, se determinó la capacidad de unión del anticuerpo a TF mediante un ELISA de células que empleaba la línea celular J82 con expresión elevada de TF, y se determinó su actividad de neutralización de TF en un sistema de ensayo que empleó como índice la actividad de inhibición de la activación del factor de coagulación X (Factor X: FX). Como resultado, se establecieron satisfactoriamente hibridomas que producían 6 anticuerpos que inhibieron intensamente la activación de FX del complejo TF/VIIa.

(1) Preparación del antígeno

Como TF para la inmunización de los animales, se puede mencionar un péptido que es parte de la secuencia de aminoácidos de TF generado mediante la técnica de ADN recombinante o mediante síntesis química, o TF derivado de placenta humana. Por ejemplo, se puede usar TF purificado a partir de placenta humana según el método de Ito et al. (Ito T. et al., J. Biochem. 114: 691-696, 1993) como antígeno.

El TF se mezcla con un adyuvante y después la mezcla se usa como antígeno. Como adyuvante, se puede mencionar el adyuvante completo de Freund o el adyuvante incompleto de Freund, cualquiera de los cuales se puede mezclar.

(2) Inmunización y recogida de las células productoras de anticuerpos

El antígeno obtenido como se describió anteriormente se puede administrar a mamíferos no humanos, por ejemplo mamíferos tales como ratones, ratas, caballos, monos, conejos, cabras, ovejas, y similares. La inmunización se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquiera de los métodos existentes, y se lleva a cabo principalmente mediante inyección intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, y similares. El periodo de inmunización se lleva a cabo, pero sin limitación, en un intervalo de unos cuantos días a unas cuantas semanas, preferiblemente un intervalo de 4-21 días.

Las células productoras de anticuerpos se pueden recoger 2-3 días después del último día de inmunización. Como células productoras de anticuerpos, se pueden mencionar las células del bazo, las células linfáticas, y las células de sangre periférica, y en general se usan las células del bazo. La cantidad de antígeno a usar para cada inmunización es 0,1-100 µg por ratón.

(3) Determinación del título de anticuerpos

Para confirmar el nivel de respuesta inmunitaria del animal inmunizado y para seleccionar el hibridoma deseado a partir de las células tras el tratamiento de fusión celular, se determina el título de anticuerpos en la sangre del animal inmunizado y en el sobrenadante del cultivo de las células productoras de anticuerpos.

Como métodos para la detección del anticuerpo, se pueden mencionar métodos conocidos, tales como el ensayo inmunoenzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y similares.

(4) Fusión celular

Como células de mieloma fusionadas a las células productoras de anticuerpos, se usan células de líneas que derivan de ratones, ratas, seres humanos, etc., y que están disponibles en general para una persona experta en la técnica. Como líneas celulares a usar, se pueden mencionar aquellas que tienen las propiedades de ser resistentes a fármacos, ser incapaces de sobrevivir en el medio de selección (por ejemplo el medio HAT) en el estado sin fusionar, y ser capaces de sobrevivir únicamente en el estado fusionado. En general se usan las cepas resistentes a 8-azaguanina, y estas líneas celulares carecen de hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa, y por lo tanto no pueden sobrevivir en el medio que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina (HAT).

Como células de mieloma, se usan preferiblemente diversas líneas celulares conocidas tales como P3 (P3X63Ag8.653) (J. Immunol. 123: 1548-1550, 1979), P3X63Ag8.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology 81: 1-7, 19778), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976), MPC-11 (Margulies, D. H., Cell 8: 405-415, 1976), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature 276: 269-270, 1978), F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21, 1980), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. 148: 313-323, 1978), R210 (Galfre, G. et al., Nature 277: 131-133, 1979), y similares.

Se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir de células de bazo, células linfáticas, y similares. Así, se extraen o se recogen de los animales anteriores los bazos, los nódulos linfáticos, etc., y estos tejidos se dispersan. Las células dispersadas se suspenden en un medio o en un tampón tal como PBS, DMEM, y RPMI1640, se filtran con una malla de acero inoxidable, etc., y se centrifugan para preparar las células productoras de anticuerpos deseadas.

Las células de mieloma anteriores y las células productoras de anticuerpos se someten a la fusión celular.

La fusión celular se puede llevar a cabo poniendo en contacto las células de mieloma y las células productoras de anticuerpos a 30-37 °C durante 1-15 minutos en presencia de un agente acelerante de la fusión a una proporción de mezcla de 1:1 a 1:10 en un medio de cultivo para el cultivo de células animales tal como MEM, DMEM, RPMI1640, y similares. Para acelerar la fusión celular, se puede usar un agente acelerador de la fusión celular o un virus de fusión, tal como polietilén glicol (PEG) de un peso molecular de 1.000-6.000, poli(alcohol vinílico), o el virus Sendai (HVJ). Además, se pueden usar instrumentos de fusión celular disponibles comercialmente (por ejemplo, la electroporación) que utilizan la estimulación eléctrica para fusionar las células productoras de anticuerpos con las células de mieloma.

(5) Selección y clonación de un hibridoma

Se puede seleccionar el hibridoma deseado a partir de las células fusionadas. A modo de ejemplo, se pueden mencionar los métodos que utilizan el crecimiento selectivo de células en un medio de selección. Así, tras la dilución de una suspensión de células con un medio adecuado, se coloca en una placa de microtitulación y se le añade un medio de selección (tal como el medio HAT), que se cultiva con la sustitución adecuada del medio de selección. Como resultado, se pueden obtener como hibridoma las células en crecimiento.

Se lleva a cabo el cribado de un hibridoma mediante el método de dilución limitante, el método de separación celular activada por fluorescencia, y similares, y finalmente se puede obtener un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal.

La selección de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal se puede llevar a cabo combinando diversos sistemas de ensayo. Por ejemplo, se combina un sistema de reconocimiento de antígenos tal como el ELISA de células, un sistema de ensayo de la actividad neutralizante de TF que utiliza la actividad del Factor Xa como índice, y un sistema de ensayo de la actividad neutralizante tal como el sistema de ensayo que mide la actividad de inhibición de la coagulación del plasma para obtener un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que tiene la actividad deseada. Así, se puede obtener un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal tal como ATR-2, ATR-3, ATR-4, ATR-5, ATR-7, y ATR-8.

(6) Recogida del anticuerpo monoclonal

Como método de recogida del anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma obtenido, se puede mencionar un método de cultivo celular convencional, un método de formación de líquido ascítico, y similares.

En el método de cultivo celular, se cultiva un hibridoma en un medio de cultivo para el cultivo de células animales tal como un medio RPMI1640 complementado con un 10-20% de suero bovino fetal, el medio DMEM, un medio exento de suero o similares, en condiciones de cultivo (por ejemplo, 37 °C, concentración del 5% de CO₂) durante 2-14 días, y después se obtiene el anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo.

En el método de formación de líquido ascítico, se administra de manera intraperitoneal un hibridoma a una especie animal similar al mamífero del que proceden las células de mieloma, y el hibridoma se hace proliferar en gran cantidad. Después, se recoge el líquido ascítico o el suero 1-4 semanas más tarde.

- 5 Cuando es necesaria la purificación del anticuerpo en el método anterior de obtención del anticuerpo, se lleva a cabo la purificación seleccionando, según sea adecuado, un método conocido tal como el fraccionamiento con sulfato de amonio, la cromatografía de intercambio iónico, y la cromatografía de afinidad, o combinándolos.

2. Clonación del ADN que codifica la región V de un anticuerpo monoclonal hacia TF humano

- 10 (i) Preparación del mARN

15 Para clonar el ADN que codifica la región V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano, se aísla el ARN total a partir del hibridoma recogido mediante un método conocido, tal como el método de ultracentrifugación con guanidina (Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry*, 18: 5294-5299, 1979), y el método AGPC (Chomczynski, P. et al., 162: 156-159, 1987), y después el mARN se purifica mediante una columna de centrifugación de oligo (dT)-celulosa asociada al equipo de purificación de mARN (Pharmacia Biotech), y similares. El mARN se puede purificar también, sin extraer el ARN total, mediante el uso del equipo de purificación de mARN QuickPrep (Pharmacia Biotech).

- 20 (ii) Preparación y amplificación de cADN

25 A partir del mARN obtenido en el punto (i) anterior, se sintetiza el cADN de la región V de la cadena L y de la cadena H, respectivamente, mediante el uso de una transcriptasa inversa. La síntesis del cADN se puede llevar a cabo mediante el uso de un cebador de Oligo-dT o un cebador adecuado (por ejemplo, el cebador sintético de cADN adjunto con el equipo) que hibrida con la región C de la cadena L o la región C de la cadena H.

30 La amplificación del cADN se puede llevar a cabo mediante PCR basada en el método 5'-RACE (Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., *Nucleic Acids Res.* 17: 2919-2932, 1989) que usa el equipo 5'-Ample FINDER RACE (CLONETECH) junto con la cadena L y la cadena H. Así, se une un adaptador de cADN a los extremos de un cADN bicatenario sintetizado anteriormente, y después se lleva a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los ADNs que codifican la región V de la cadena H y la región V de la cadena L (el ADN que codifica un fragmento de la región V de la cadena L se abrevia más adelante en la presente memoria "ADN de la región V de la cadena L" o "ADN que codifica la región V de la cadena L"; lo mismo es cierto para la región V de la cadena H, etc.).

40 Como cebador para amplificar el ADN de una región V de la cadena H, se puede usar el cebador adaptador 1 para el cebador del extremo 5', y el cebador MHC-G1 de la región constante de la cadena H del anticuerpo de ratón (SEQ ID N°: 1) (ATR-2, ATR-3, ATR-4, y ATR-5) (región cy1) o el cebador MHC-G2a (SEQ ID N°: 2) (ATR-7 y ATR-8) (región cy2a) (S. T. Jones et al., *Biotechnology*, 9: 88, 1991). Por ejemplo, para el cribado del extremo 5', se puede usar el cebador adaptador 1 adjunto con el equipo, y para el cebador del extremo 3' se puede usar el cebador de la región constante de la cadena κ de la cadena L (región Cκ) de un anticuerpo de ratón (tal como el cebador MKC que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID N°: 3).

- 45 (iii) Purificación del ADN y determinación de la secuencia de nucleótidos

Los productos de PCR se someten a electroforesis en gel de agarosa según un método conocido. Después de extraer el fragmento de ADN deseado, se recupera el ADN y se purifica, y después se liga en un vector de ADN.

50 El ADN se puede purificar mediante extracción con fenol y cloroformo (J. Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o mediante el uso de un equipo disponible comercialmente (por ejemplo, GENECLEAN II; BIO101). Un vector de ADN usado para mantener los fragmentos de ADN puede ser cualquiera de los que se conocen (por ejemplo, pUC19 y Bluescript, etc.).

55 Se liga el ADN anterior y un vector de ADN mediante el uso de un equipo de ligadura conocido (fabricado por Takara Shuzo) para obtener un vector recombinante. Después, el vector de ADN recombinante resultante se introduce en una célula competente de *Escherichia coli* JM109 (Nippongene) etc., se seleccionan las colonias resistentes a ampicilina, y después se prepara un vector de ADN basándose en un método conocido (J. Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Después de digerir el vector anterior con una enzima de restricción, se puede determinar la secuencia de nucleótidos del ADN de interés mediante un método conocido (por ejemplo, el método didesoxi) (J. Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Según la presente descripción, se puede usar un instrumento automático para la determinación de la secuencia de nucleótidos (DNA Sequencer 373A, Perkin-Elmer).

- 65 (iv) Región determinante de la complementariedad (CDR)

La región V de la cadena H y la región V de la cadena L forman el sitio de unión al antígeno, y la estructura global es similar entre sí. Así, cuatro regiones estructurales (FRs) están ligadas por tres regiones hipervariables, es decir, regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Las secuencias de aminoácidos de las FRs están muy conservadas, mientras las secuencias de aminoácidos de las CDRs son sumamente variables (Kabat, E. A. et al., "Sequence of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, 1983).

Muchas regiones de las cuatro FRs anteriores tienen la forma de una estructura de lámina β , con el resultado de que la CDR forma un bucle. La CDR puede formar parte a veces de la estructura de lámina β . Así, las tres CDRs se mantienen en estrecha proximidad tridimensional entre sí, y las FRs constituyen el sitio de unión al antígeno junto con las tres CDRs.

Basándose en estos hechos, mediante el ajuste de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano en la base de datos de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos generada por Kabat ("Sequence of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, 1983), se puede examinar su homología, y por lo tanto se pueden hallar las CDRs.

Se pueden incluir las secuencias de las CDRs alteradas mediante inserción, sustitución, o delección en la presente descripción, con tal de que mantengan la actividad de unión o de neutralización de TF humano cuando se genera un anticuerpo humanizado mediante su uso. Por ejemplo, se pueden mencionar las que tienen una homología del 90-100% con cada una de las CDRs de SEQ ID N°: 133-138 o con cada CDR de la región V de SEQ ID N°: 139-141, 143-144, 145-147, y 149-150. Preferiblemente, se pueden mencionar las secuencias que tienen una homología del 95-100%. Más preferiblemente, se pueden mencionar las secuencias que tienen una homología del 98-100%.

3. Preparación de un vector de expresión de un anticuerpo quimérico

Una vez que se han clonado los fragmentos de un ADN que codifica la cadena L de ratón (la cadena L o la cadena H del anticuerpo se pueden denominar más adelante en la presente memoria "cadena L de ratón" para el anticuerpo de ratón y "cadena H humana" para la cadena H del anticuerpo humano) y la región V de la cadena H de ratón, el ADN que codifica la región V de ratón se liga a los ADNs que codifican la región constante de un anticuerpo humano y se expresa para obtener un anticuerpo quimérico anti-TF humano.

Los métodos básicos para generar un anticuerpo quimérico comprenden unir una secuencia líder y una secuencia de la región V de ratón del cADN clonado a una secuencia que codifica la región constante de un anticuerpo humano que ya está en un vector de expresión para células mamíferas. De manera alternativa, comprenden unir una secuencia líder y una secuencia de la región V de ratón del cADN clonado a una secuencia que codifica la región C de un anticuerpo humano, y después unirlo a un vector de expresión para células mamíferas.

Los fragmentos de las regiones C de un anticuerpo humano pueden ser los de la región C de la cadena H y los de la región C de la cadena L de cualquier anticuerpo humano. Por ejemplo, se pueden mencionar $\text{cy}1$, $\text{cy}2$, $\text{cy}3$, o $\text{cy}4$ para los de la cadena H humana, y $\text{C}\lambda$ o $\text{C}\kappa$ para la cadena L, respectivamente.

Para la producción de un anticuerpo quimérico, se prepara un vector de expresión que contiene ADN que codifica una región V de la cadena H de ratón y una región C de la cadena H humana bajo el control de una región reguladora de la expresión, como un sistema potenciador/promotor, y un único vector de expresión (véase, por ejemplo, el documento WO 94/11523) que contiene un ADN que codifica una región V de la cadena L de ratón y una región C de la cadena L humana bajo el control de una región reguladora de la expresión, como un sistema potenciador/promotor. Después, el vector de expresión se usa para co-transformar una célula hospedadora tal como una célula mamífera, y las células transformadas se cultivan *in vitro* o *in vivo* para producir un anticuerpo quimérico (véase, por ejemplo, el documento WO 91/16928). Como vector simple, se puede usar un vector N5KG1(V) de expresión de anticuerpos de tipo IgG1k y un vector N5KG4P de expresión de anticuerpos de tipo IgG4k.

(i) Construcción de la cadena H de un anticuerpo quimérico

Se puede obtener un vector de expresión para una cadena H de anticuerpo quimérico introduciendo un cADN que codifica una región V de la cadena H de ratón en un vector de expresión adecuado que contiene un ADN que codifica la región C de la cadena H de un anticuerpo humano. Como región C de la cadena H, se puede mencionar, por ejemplo, la región $\text{C}\gamma 1$, $\text{C}\gamma 2$, $\text{C}\gamma 3$, o $\text{C}\gamma 4$.

Tal como se usa en la presente memoria, para introducir un cADN que codifica una región V de la cadena H de ratón en un vector de expresión, se puede introducir una secuencia de nucleótidos adecuada en dicho cADN mediante el método de PCR. Por ejemplo, tal secuencia de nucleótidos adecuada se puede introducir en un vector de expresión llevando a cabo una PCR mediante el uso de cebadores de PCR diseñados para que tengan una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción adecuada en el extremo 5' de dicho cADN, y, para una eficacia de transcripción mejorada, la secuencia consenso de Kozak (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196: 947-950, 1987) inmediata-

mente antes del codón de inicio de dicho cADN, y cebadores de PCR diseñados para que tengan una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción adecuada en el extremo 3' de dicho cADN.

Después de tratar un cADN que codifica la región V de la cadena H de ratón así construida con una enzima de restricción adecuada, se inserta en el vector de expresión anterior y después se construye un vector de expresión de la cadena H quimérica que contiene ADN que codifica la región C de la cadena H (Cy1 o Cy4).

(ii) Construcción de un vector de expresión que contiene un cADN que codifica la cadena κ de la cadena L de un anticuerpo quimérico

Se puede obtener un vector de expresión para una cadena L de anticuerpo quimérico introduciendo un cADN que codifica una región V de la cadena L de ratón en un vector de expresión adecuado que contiene un ADN que codifica la región C de la cadena L de un anticuerpo humano. Como región C de la cadena L, se puede mencionar, por ejemplo, la región C κ y C λ .

Tal como se usa en la presente memoria, para construir un vector de expresión que contiene un cADN que codifica una región V de la cadena L de ratón, se puede introducir una secuencia de nucleótidos adecuada en dicho cADN mediante el método de PCR. Por ejemplo, tal secuencia de nucleótidos adecuada se puede introducir en dicho cADN llevando a cabo una PCR mediante el uso de cebadores de PCR diseñados para que tengan una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción adecuada en el extremo 5' de dicho cADN, y, para una eficacia de transcripción mejorada, la secuencia consenso de Kozak, y cebadores de PCR diseñados para que tengan una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción adecuada en el extremo 3' de dicho cADN.

Después de tratar un cADN que codifica la región V de la cadena L de ratón así construida con una enzima de restricción adecuada, se inserta en el vector de expresión anterior y después se construye un vector de expresión de la cadena L quimérica que contiene ADN que codifica la región C de la cadena L (región C κ).

4. Preparación de un anticuerpo humanizado

(1) Búsqueda de homología de un anticuerpo humano

Para generar un anticuerpo humanizado en el que las CDRs de un anticuerpo monoclonal de ratón estén injertadas en un anticuerpo humano, existe preferiblemente una homología elevada entre las FRs de un anticuerpo monoclonal de ratón y las FRs de un anticuerpo humano. Así, las regiones V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo monoclonal anti-TF humano de ratón se comparan con la región V de todos los anticuerpos conocidos cuya estructura se ha publicado mediante el uso de un banco de datos. Al mismo tiempo, se comparan con los subgrupos de anticuerpos humanos (HSG: subgrupo humano) (Kabat, E. A. et al., US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) clasificados por Kabat et al. basándose en la longitud de las FR y en la homología de los aminoácidos.

Basándose en la clasificación de HSG de Kabat et al., las regiones V de la cadena H humana se pueden agrupar en HSGI a III; por ejemplo, la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal anti-TF humano de ratón ATR-5 tiene una homología del 67,8% con la secuencia consenso de HSGI. Por otra parte, las regiones V de la cadena κ de la cadena L humana se pueden agrupar en HSGI a IV; por ejemplo, la región V de la cadena κ de la cadena L del anticuerpo monoclonal anti-TF humano de ratón ATR-5 tiene una homología del 72,3% con la secuencia consenso de HSGI.

Cuando se humaniza un anticuerpo de ratón mediante una técnica convencional, la secuencia de aminoácidos de las FRs de la región V de un anticuerpo de ratón que soportan las CDR se puede injertar en la FR de una región V humana, según se desee, de forma que la estructura de la CDR de una región V humanizada se puede parecer más a la del anticuerpo de ratón original. Sin embargo, no existen reglas fijas en cuanto a qué aminoácidos de la FR de la región V de un anticuerpo de ratón se deben injertar en la FR de la región V de un anticuerpo humano. Por lo tanto, es necesario un gran esfuerzo para especificar los aminoácidos que son esenciales para mantener la estructura de la CDR.

Existe también el riesgo de que se pueda formar un anticuerpo humano hacia la secuencia de aminoácidos injertada en la región V humana de la región V de un anticuerpo de ratón en parte de la FR. Según la presente descripción, para cambiar todas las secuencias de aminoácidos excepto la CDR en el anticuerpo humanizado por secuencias de aminoácidos derivadas de un anticuerpo humano, se buscaron las FRs de un anticuerpo humano que tuvieran una homología elevada con la FR de los anticuerpos de ratón presentes en la base de datos, con una FR como unidad, para las cuatro FRs (FR1-4) que son necesarias para mantener la estructura tridimensional de la CDR. Lo siguiente es el resultado de la búsqueda de homología con la base de datos para cada FR de la región V de la cadena H y de la región V de la cadena L de un anticuerpo monoclonal ATR-5.

Tabla 1

Nº de FR	Nº de acceso	Homología con cada FR de la región V de la cadena H de un anticuerpo de ratón (%)	SEQ ID Nº:
FR1 de la cadena H	L39130	53,0	110
FR2 de la cadena H	L39130	92,9	111
	P01742	71,4	112
FR3 de la cadena H	Z80844	78,6	113
	L39130	62,5	114
	Z34963	71,9	115
	P01825	53,1	116
	M62723	68,8	117
	Z80844	68,8	118
	L04345	65,6	119
	S78322	75,0	120
	Z26827	56,3	121
	U95239	65,6	122
FR4 de la cadena H	L03147	65,6	123
	L39130	90,9	124

5

Tabla 2

Nº de FR	Nº de acceso	Homología con cada FR de la región V de la cadena L de un anticuerpo de ratón (%)	SEQ ID Nº:
FR1 de la cadena L	Z37332	78,3	125
FR2 de la cadena L	Z37332	80,0	126
	S65921	80,0	127
	X93625	80,0	128
FR3 de la cadena L	Z37332	71,9	129
	S68699	75,0	130
	P01607	71,9	131
FR4 de la cadena L	Z37332	90,0	132

(2) Diseño de un ADN que codifica una región V de un anticuerpo humanizado

10 La primera etapa en el diseño de un ADN que codifica una región V de un anticuerpo humanizado es seleccionar cada FR una región V de un anticuerpo humano en el que se basa el diseño. En el reordenamiento de FRs, es necesario seleccionar una FR muy variada de una región V de un anticuerpo humano para cada FR.

15 Para el anticuerpo monoclonal ATR-5, según la presente descripción, se seleccionaron tres FRs de la región V de un anticuerpo humano para FR2 y 10 para FR3 basándose en el resultado de la búsqueda de homología entre la región V de la cadena H de todos los anticuerpos de ratón y cada FR para la cadena H. Para la cadena L, se pueden seleccionar tres FRs de la región V de un anticuerpo humano para FR2 y tres para FR3 basándose en el resultado de la búsqueda de homología entre la región V de la cadena L de los anticuerpos de ratón y cada FR.

20 Para las regiones V de la cadena H y de la cadena L humanizadas, es posible seleccionar las regiones V de la cadena L, L39130 y Z37332, que tienen una homología elevada con la región V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo de ratón ATR-5, respectivamente. Para permitir el reordenamiento sencillo de FR en la generación de estos anticuerpos humanizados, es posible diseñar sitios de reconocimiento para enzimas de restricción adecuadas en sitios adecuados en cada CDR y FR. Al hacerlo, se puede sustituir fácilmente solamente una de las FRs.

25 Los ejemplos de tales sitios incluyen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoT22I en la CDR1 de la cadena H humanizada, un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Ball en CDR2, un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NcoI en CDR3 y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI en FR3, por ejemplo un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción AflII en la CDR1 de la cadena L humanizada, un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SpeI en CDR2, un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción PstI en CDR3, y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción AccIII en FR3.

30

Basándose en la versión así diseñada, se puede llevar a cabo el reordenamiento de FR para cada FR para obtener un anticuerpo humanizado que tiene la actividad deseada.

(3) Preparación de un fragmento de la región V de un anticuerpo humanizado

El anticuerpo humanizado de la presente invención es tal que las FRs de la región C y de la región V de dicho anticuerpo derivan de un anticuerpo humano y la CDR de la región V deriva de un anticuerpo de ratón. Se pueden generar fragmentos de la región V del anticuerpo humanizado de la presente invención mediante un método denominado injerto de CDR mediante el método de PCR, si están disponibles los fragmentos de ADN del anticuerpo humano como molde. Tal como se usa en la presente memoria, el "injerto de CDR" es un método en el que se genera un fragmento de ADN que codifica la CDR de un anticuerpo de ratón, el cual se intercambia por la CDR de un anticuerpo humano como molde.

Cuando no hay disponibles fragmentos de ADN de un anticuerpo humano como molde, se puede sintetizar la secuencia de nucleótidos registrada en la base de datos mediante el uso de un sintetizador de ADN, y se puede generar la región V del anticuerpo humanizado mediante el uso del método de PCR. Además, cuando la secuencia de aminoácidos solamente está registrada en la base de datos, se puede deducir la secuencia de nucleótidos completa basándose en la secuencia de aminoácidos basándose en la frecuencia del uso de los codones de los anticuerpos informados por Kabat, E. A. et al. (US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991). La secuencia de nucleótidos se puede sintetizar mediante el uso de un sintetizador de ADN, y se pueden generar fragmentos de la región V del anticuerpo humanizado mediante el uso del método de PCR.

(i) Construcción del ADN y de un vector de expresión que codifica la región V de la cadena H humanizada

Según la presente descripción, se puede construir el ADN que codifica la región V de la cadena H humanizada obteniendo el gen que codifica la región V de la cadena H de un anticuerpo humano a usar como molde para el anticuerpo humanizado, y después sintetizando la secuencia de nucleótidos completa del ADN que codifica la región V de la cadena H humanizada mediante el uso de un sintetizador de ADN, seguido por el método de PCR. Por ejemplo, se puede generar L39130 que tiene una homología elevada con la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal anti-TF humano de ratón ATR-5 en forma de la versión "a" de la región V de la cadena H humanizada. Para generar la versión "a" de la región V de la cadena H humanizada, se usan por ejemplo los 5 cebadores expuestos en SEQ ID N°s: 22-26 y 2 cebadores exógenos expuestos en SEQ ID N°s: 27 y 28 por separado.

Los cebadores de injerto de CDR hR5Hv1S (SEQ ID N°: 22), hR5Hv2S (SEQ ID N°: 23), y hR5Hv4S (SEQ ID N°: 24) tienen una secuencia de ADN directa, y los cebadores de injerto de CDR hR5Hv3A (SEQ ID N°: 25) y hR5Hv5A (SEQ ID N°: 26) tienen una secuencia de ADN inversa, y cada uno tiene una secuencia complementaria de 18-35 pb en ambos extremos de los cebadores. hR5Hv1S está diseñado de manera que tenga la secuencia consenso de Kozak (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) y un sitio de reconocimiento de Sall, y hR5Hv5A está diseñado de manera que tenga un sitio de reconocimiento de NheI. Los cebadores exógenos hR5HvPrS (SEQ ID N°: 27) y hR5HvPrA (SEQ ID N°: 28) también tienen homología con los cebadores de injerto de CDR hR5Hv1S y hR5Hv5A.

Mediante el uso del método de PCR, se construyen cinco cebadores para sintetizar el cADN de tamaño completo, y después de añadir un cebador exógeno se amplifica el ADN. La construcción mediante el método de PCR tal como se usa en la presente memoria significa que hR5Hv1S, hR5Hv2S, hR5Hv4S, hR5Hv3A, y hR5Hv5A se hibridan a sus secuencias complementarias y se sintetiza el ADN de la región V de la cadena H humanizada de tamaño completo.

La región C de la cadena H del anticuerpo humano puede ser cualquier región C de la cadena H humana, y por ejemplo se pueden mencionar las cadenas H humanas Cy1, Cy2, Cy3, o Cy4.

El ADN de la región V de la cadena H del anticuerpo humanizado construido como se indicó anteriormente se puede unir al ADN de cualquier región C de la cadena H de un anticuerpo humano, por ejemplo la región C de la cadena H humana Cy1 o Cy4. Como se describió en la construcción de una cadena H del anticuerpo quimérico, después de tratar con una enzima de restricción adecuada, se une al ADN que codifica una región C de la cadena H humana bajo el control de una región reguladora de la expresión tal como un sistema potenciador/promotor para generar un vector de expresión que contiene el ADN de la región V de la cadena H humanizada y la región C de la cadena H humana.

(ii) Construcción del ADN y de un vector de expresión que codifica la región V de la cadena L humanizada

Como en el caso del ADN que codifica la región V de la cadena H, según la presente descripción, se puede construir un ADN que codifica la región V de la cadena L humanizada obteniendo un gen de la región V de la cadena L de un anticuerpo humano a usar como molde, y después sintetizar la secuencia de nucleótidos completa del ADN que codifica la región V de la cadena L humanizada mediante el uso de un sintetizador de ADN, seguido por el método de PCR. Por ejemplo, se puede generar Z37332 que tiene una homología elevada con la región V de la cadena L del

anticuerpo monoclonal anti-TF humano de ratón ATR-5 en forma de la versión "a" de la región V de la cadena L humanizada.

5 Para generar la versión "a" de la región V de la cadena L humanizada, los cebadores de injerto de CDR h5Lv1S (SEQ ID N°: 85) y h5Lv4S (SEQ ID N°: 86) tienen una secuencia de ADN directa, y los cebadores de injerto de CDR h5Lv2A (SEQ ID N°: 87), h5Lv3A (SEQ ID N°: 88), y h5Lv5A (SEQ ID N°: 89) tienen una secuencia de ADN inversa, y cada uno tiene una secuencia complementaria de 20 pb a ambos extremos del cebador. El cebador h5Lv1S está diseñado de manera que tenga la secuencia consenso de Kozak (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BgIII, y h5Lv5A está diseñado también para que tenga un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SphI. Los cebadores exógenos h5LvS (SEQ ID N°: 90) y h5LvA (SEQ ID N°: 91) tienen también homología con los cebadores de injerto de CDR h5Lv1S y h5Lv5A.

10 Como para la región V de la cadena H humanizada, mediante el uso del método de PCR, se construyen cinco cebadores para sintetizar un cADN de tamaño completo, y después de añadir un cebador exógeno se puede amplificar el ADN.

15 La región C de la cadena L del anticuerpo humano puede ser cualquier región C de la cadena L humana, y por ejemplo se puede mencionar la región C λ y la región C κ de la cadena L humana.

20 El ADN de la región V de la cadena L del anticuerpo humanizado construido como se indicó anteriormente se puede unir al ADN de cualquier región C de la cadena L humana, por ejemplo una derivada de la región C κ o de la región C λ de la cadena L humana. Después del tratamiento con una enzima de restricción adecuada, se une al ADN que codifica una región C de la cadena L humana bajo el control de una región reguladora de la expresión tal como un sistema potenciador/promotor para generar un vector de expresión que contiene el ADN que codifica la región V de la cadena L humanizada y la región C de la cadena κ de la cadena L humana.

25 Incluso si se genera un fragmento de la región V de un anticuerpo humanizado como se mencionó anteriormente, no está claro siempre si dicho fragmento de la región V tiene actividad como anticuerpo (es decir, actividad de unión al antígeno, de neutralización del antígeno, etc.). Así, es necesario investigar la presencia de la actividad combinándola con una cadena H humanizada y expresarla en una célula animal, tal como COS-7.

30 (iii) Reordenamiento de FRs de la región V de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humanizado

35 Los presentes inventores han llevado a cabo la expresión transitoria de un anticuerpo humanizado que contiene una región V de la cadena H y de la cadena L humanizada en una célula animal tal como COS-7 para investigar la actividad de unión al antígeno y la actividad neutralizante, y han descubierto que el anticuerpo tiene la actividad de unión al antígeno y la actividad neutralizante, pero la actividad no es adecuada en comparación con el anticuerpo quimérico.

40 Los presentes inventores pueden resolver este problema reordenando secuencialmente cada FR de la región V de la cadena H y de la cadena L humanizadas. El anticuerpo usado en el reordenamiento de FR se puede seleccionar a partir de las bases de datos existentes. La FR del anticuerpo humano seleccionado se puede sintetizar basándose en la secuencia de nucleótidos mostrada en las bases de datos mediante el uso de un sintetizador de ADN. En este punto, como se mencionó anteriormente, añadiendo a CDR o FR la secuencia de reconocimiento diseñada para una enzima de restricción, se puede reordenar fácilmente con la FR de la región V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo humanizado generado anteriormente. Investigando la actividad del anticuerpo humanizado así generado, se puede obtener un anticuerpo humanizado que tenga la actividad de unión al antígeno y la actividad de neutralización.

45 Por ejemplo, se puede reordenar la FR3 de la cadena H de la región V del anticuerpo humanizado hasta la FR3 derivada del anticuerpo humano Z34963 (GenBank, Borrentzen M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 12917-12921, 1994).

50 Los cebadores de reordenamiento de FR F3RFFS (SEQ ID N°: 35) y F3RFBS (SEQ ID N°: 36) tienen una secuencia de ADN directa, y F3RFFA (SEQ ID N°: 37) y F3RFBA (SEQ ID N°: 38) tienen una secuencia de ADN inversa. Los cebadores de reordenamiento de FR F3RFFS, F3RFBS, F3RFFA, y F3RFBA se pueden sintetizar mediante el uso de un sintetizador de ADN.

55 F3RFFS y F3RFFA, y F3RFBS y F3RFBA se hibridaron, y se digirieron con Ball y XhoI, y NcoI y XhoI, respectivamente. Introduciéndolos en el plásmido hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) preparado mediante digestión con Ball y NcoI, y confirmando la secuencia de nucleótidos del mismo, se puede obtener un plásmido que tiene la secuencia correcta. El plásmido así obtenido que contenía la cadena H del anticuerpo humanizado se denominó hATR5Hvb/CVIDEC, y la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvb/CVIDEC se denominó versión "b". La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestran en SEQ ID N°: 39, y la secuencia de aminoácidos de la versión "b" se muestra en SEQ ID N°: 40.

De una manera similar, la FR derivada de la cadena H y de la cadena L de la región V de otro anticuerpo humano seleccionado a partir de la base de datos se puede reordenar también con la FR de la cadena H y de la cadena L de la región V de un anticuerpo humanizado.

5 Para seleccionar un anticuerpo humano más preferible para reordenar la FR de la región V de la cadena H y la región V de la cadena L de un anticuerpo humanizado, se puede llevar a cabo lo siguiente. Así, una combinación de la versión "b" de la cadena H del anticuerpo humanizado y una cadena L del anticuerpo quimérico tiene una actividad neutralizante igual a la de un anticuerpo quimérico o un anticuerpo de ratón. Sin embargo, la combinación de la versión "b" de la cadena H del anticuerpo humanizado y la versión "a" de la cadena L del anticuerpo humanizado
10 tiene una actividad neutralizante menor que la de un anticuerpo quimérico o un anticuerpo de ratón.

En tales casos, para seleccionar un anticuerpo humano para que sea un candidato para el reordenamiento de FR, se puede llevar a cabo una búsqueda de homología, por ejemplo, para la FR3 (nº de acceso Z34963: SEQ ID N°: 115) de la versión "b" de la cadena H del anticuerpo humanizado, y se puede obtener un anticuerpo humano que tiene una homología elevada con esta secuencia. Por ejemplo, como FR3 de la región V de la cadena H del anticuerpo humano así seleccionado, se puede mencionar U95239 (SEQ ID N°: 122) y L03147 (SEQ ID N°: 123).
15

Las secuencias de aminoácidos de la cadena H de la región V del anticuerpo humanizado así generado se muestran en las Tablas 3 y 4, y la secuencia de aminoácidos de la cadena L de la región V del anticuerpo humanizado se muestra en la Tabla 5.
20

Tabla 3

Secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena H

	FR1		CDR1	FR2	CDR2	
	1	2	3	4	5	6
L39130(a)	123456789012345678901234567890	12345678901234567890	12345	67890123456789	012A3456789C12345	
Z34963(b)	QVQLLES	GAVLAR	P	G	T	S
M30885(c)	V	K	I	S	C	K
M62723(d)	A	V	L	R	P	G
Z80844(e)	T	S	V	K	I	S
L04345(f)	C	A	S	G	F	N
S78322(g)	N	I	K	D	Y	M
Z26827(h)	I	S	C	K	A	S
U95239(i)	G	F	N	I	K	D
L03147(j)	Y	M	I	H	W	V
P01742(b1)	K	D	Y	M	I	H
P01742(d1)	W	V	K	R	P	G
Z80844(b3)	L	E	S	G	A	V
Z80844(d3)	L	E	S	G	A	V

Tabla 4

Secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena H (continuación)

	FR3			FR4		
	7	8	9	10	11	
	67890123456789012ABC345678901234	5678901234	56789012	34567890123		
L39130(a)	RAKLTAAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCAR	DSCYAMDY	WGQCTLVTVSS			
Z34963(b)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-----					
M30885(c)	-VTMLVD--KNQFS-RL--V-AA-T-----					
M62723(d)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS-----F---					
Z80844(e)	-VSI--DE-TK--M-LN--RS--T--F---					
L04345(f)	-VTI--DT-T-T--M-LR--RSD-T-----					
S78322(g)	K-T---DE-S-T--MQL---RS-----S---					
Z26827(h)	-VTMS-DK-S-A---QWT--KAS-T-I-F---					
U95239(i)	-VTI--D--T-TVFM-L--RS--T-----					
L03147(j)	-VTF--D---NT--M-LR--RSA-T-----					
P01742(b1)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-----					
P01742(d1)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS-----F---					
Z80844(b3)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-----					
Z80844(d3)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS-----F---					

Tabla 5

Secuencias de aminoácidos de la región V de la cadena L

	FR1		CDR1	FR2		CDR2
	1	2	3	4	5	
	12345678901234567890123	45678901234	5678901234	567890123456789	0123456	
Z37332(a)	DIQNTQSPSSLSASVGDRTITC	KASQDIKSFLS	WYQQKPGKAPKLLIY	YATSLAD		
S68699(b)	-----	-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----	-----	-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----	-----	-----	-F-----S--T--	-----	
X93625(b2)	-----	-----	-----	-----E---S---	-----	
	FR3		CDR3	FR4		
	6	7	8	9	10	
	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567			
Z37332(a)	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDPATYYC	LQHGESPYT	FGGGTKVEIK			
S68699(b)	-----Y-----	-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----Y-----	I-----	-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----Y-----	-----	-----	-----	-----	
X93625(b2)	-----Y-----	-----	-----	-----	-----	

5

10 Cada versión de la región V de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo humanizado así construido se puede unir al ADN de cualquier región C de la cadena H humana o región C de la cadena L, por ejemplo las regiones Cy4 de la cadena H humana y Ck de la cadena L humana, respectivamente. Después del tratamiento con una enzima de restricción adecuada, se une a un ADN que codifica la región Cy4 de la cadena H humana y la región Ck de la cadena L humana bajo el control de una región reguladora de la expresión tal como un sistema potenciador/promotor, y se genera un vector de expresión que contiene un ADN que codifica cada versión de la región V de la cadena H y de la cadena L humanizadas y un ADN que codifica la región Cy4 de la cadena H humana y Ck de la cadena L humana.

15 Un ADN que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo humanizado y la región C de la cadena H humana construido como se mencionó anteriormente y un ADN que codifica la región V de la cadena L humanizada y la región C de la cadena L humana se introducen en un único vector (véase, por ejemplo, el documento WO 94/11523), y después se usa dicho vector para transformar una célula hospedadora. Después, el hospedador transformado se puede cultivar in vivo o in vitro para producir el anticuerpo humanizado deseado.

20 5. Producción de un anticuerpo quimérico y de un anticuerpo humanizado

25 Para producir un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, se puede unir un ADN que codifica una región V de la cadena H y una región C de la cadena H y un ADN que codifica una región V de la cadena L y una región C de la cadena L en un único vector, que se transforma en una célula hospedadora adecuada para producir el anticuerpo.

Así, para la expresión del anticuerpo quimérico, se introduce un ADN que codifica una secuencia líder de ratón en el cADN clonado y una región V de la cadena H de ratón y una región C de la cadena H humana y un ADN que codifica una secuencia líder de ratón y una región V de la cadena L de ratón y una región C de la cadena H humana en un único vector de expresión (véase, por ejemplo, el documento WO 94/11523) bajo el control de una región reguladora de la expresión tal como un sistema potenciador/promotor.

Para la expresión de un anticuerpo humanizado, se introduce un ADN que codifica una región V de la cadena H humanizada y una región C de la cadena H humana y un ADN que codifica una región V de la cadena L humanizada y una región C de la cadena H humana en un único vector de expresión (véase, por ejemplo, el documento WO 94/11523) bajo el control de una región reguladora de la expresión tal como un sistema potenciador/promotor. Estos vectores se usan para transformar una célula hospedadora. Después, la célula hospedadora transformada se puede cultivar in vivo o in vitro, y por lo tanto se puede producir el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado.

También se pueden generar dos vectores de expresión, y cada uno contiene una región V de la cadena H y una región V de la cadena L. Así, para un anticuerpo quimérico se genera un vector de expresión que contiene un ADN que codifica una región V de la cadena H de ratón y una región C de la cadena H humana bajo el control de un sistema potenciador/promotor y un vector de expresión que contiene un ADN que codifica una región V de la cadena L de ratón y una región C de la cadena L humana bajo el control de un sistema potenciador/promotor, y para un anticuerpo humanizado se genera un vector de expresión que contiene un ADN que codifica una región V de la cadena H humanizada y una región C de la cadena H humana bajo el control de un sistema potenciador/promotor y un vector de expresión que contiene un ADN que codifica una región V de la cadena L humanizada y una región C de la cadena L humana bajo el control de un sistema potenciador/promotor.

De manera alternativa, para el anticuerpo quimérico se genera un vector de expresión que contiene un ADN que codifica una región V de la cadena H de ratón y una región C de la cadena H humana y un ADN que codifica una región V de la cadena L de ratón y una región C de la cadena L humana bajo el control de una región reguladora de la expresión tal como un sistema potenciador/promotor, y para el anticuerpo humanizado se genera un vector de expresión que contiene un ADN que codifica una región V de la cadena H humanizada y una región C de la cadena H humana y un ADN que codifica una región V de la cadena L humanizada y una región C de la cadena L humana bajo el control de una región reguladora de la expresión tal como un sistema potenciador/promotor.

Después, estos vectores de expresión se usan para co-transformar células hospedadoras tales como células mamíferas, y las células transformadas se cultivan in vitro o in vivo para producir un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado (véase, por ejemplo, el documento WO 91/16928).

Como se indicó anteriormente en la presente memoria, se cultiva un transformante transformado con un gen que codifica el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado deseado, y el anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado producido se puede separar del interior o del exterior de la célula y purificarlo hasta homogeneidad.

El aislamiento y/o la purificación del anticuerpo quimérico o del anticuerpo humanizado, o la proteína deseada de la presente descripción, se puede llevar a cabo mediante el uso de una columna de Proteína A-Sepharose. Otros métodos incluyen, pero sin limitación, los métodos de separación y/o purificación usados para las proteínas habituales. A modo de ejemplo, se puede aislar y/o purificar un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado combinando, según sea apropiado, diversos métodos cromatográficos, ultracentrifugación, desalación, diálisis, y similares.

Para producir el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado de la presente descripción hacia TF humano, se puede usar cualquier sistema de expresión. Por ejemplo, cuando se usan células eucarióticas, se pueden usar células animales (por ejemplo, líneas celulares mamíferas establecidas), células fúngicas o células de levadura, y cuando se usan células procarióticas se pueden usar células bacterianas (tales como células de *Escherichia coli*). Preferiblemente, el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado de la presente invención se expresa en células mamíferas tales como células COS o células CHO.

En estos casos, se pueden usar promotores habituales útiles para la expresión en las células mamíferas. Por ejemplo, se usa preferiblemente el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (HCMV). Los ejemplos de vectores de expresión que contienen el promotor de HCMV incluyen HCMV-VH-HCy1, HCMV-VL-HCk, y similares, y los derivados de pSV2neo (documento WO 92-19759).

Otros promotores para la expresión génica en células mamíferas que se pueden usar en la presente descripción incluyen los promotores virales tales como los promotores de retrovirus, poliomavirus, adenovirus, y el virus simio 40 (SV40), y los promotores derivados de células mamíferas tales como el factor de elongación humano 1 α de cadenas polipeptídicas (HEF1 α). Por ejemplo, la expresión se puede llevar a cabo fácilmente mediante el método de Mulligan et al. (Nature (1979) 277: 108) cuando se usa el promotor de SV40, o mediante el método de Mizushima et al. (Nucleic Acids Res. (1990) 18: 5322) cuando se usa el promotor de HEF1 α .

Como origen de replicación, se pueden usar los de SV40, poliomavirus, adenovirus, papilomavirus bovino (BPV) y similares. Además, para la amplificación del número de copias del gen en el sistema celular hospedador, los vectores de expresión pueden incluir como marcadores seleccionables el gen de la fosfotransferasa APH (3') II o I (neo), el gen de la timidina quinasa (TK), el gen de la xantina guaninafosforribosil transferasa (Ecogpt) de *E. coli*, el gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr) y similares.

6. Evaluación de la actividad de unión al antígeno y de la actividad neutralizante del anticuerpo quimérico y del anticuerpo humanizado

(1) Medida de la concentración del anticuerpo mediante ELISA

La concentración del anticuerpo purificado obtenido se puede medir mediante ELISA.

Se pueden preparar placas de ELISA para la medida de la concentración del anticuerpo como sigue: Cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos (por ejemplo, Maxisorp, NUNC) se inmoviliza con 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana de cabra (BioSource) preparado a una concentración de 1 µg/ml.

Después de bloquear con 200 µl del tampón de dilución (denominado más adelante en la presente memoria DB; Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0,15 M, 0,05% de Tween 20, 0,02% de NaN₃, 1% de albúmina de suero bovino (BSA), pH 7,2), se diluyen en serie los sobrenadantes del cultivo de células COS-7 o de células CHO en las que se expresaba el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado, o el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado purificado, y después se añaden a cada pocillo. Después se añaden 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado a fosfatasa alcalina, se añaden 100 µl de 1 mg/ml de disolución de sustrato (Sigma104, fosfato de p-nitrofenilo, SIGMA), y después se mide la absorbancia a 405/655 nm mediante el uso del lector de microplacas (Bio-Rad). Como patrón para la medida de la concentración, se puede usar IgG4k humano (The Binding Site).

(2) Medida de la actividad de unión al antígeno

Se preparan placas de ELISA de células para la medida de la actividad de unión al antígeno como sigue: Se inoculan células de carcinoma de vejiga humana J82 (ATCC HTB-1) en 60 pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos a un recuento celular de 1×10^5 células. Esto se cultiva (medio RPMI1640 que contiene un 10% de suero bovino fetal (GIBCO)) durante un día en un incubador de CO₂ para permitir que las células se unan. Después de desechar el líquido de cultivo, cada pocillo se lava dos veces con 300 µl de PBS. Se añaden 100 µl de PBS que contiene un 4% de paraformaldehído (denominado más adelante en la presente memoria PFA/PBS) a cada pocillo, y se colocan en hielo durante 10 minutos para inmovilizar las células.

Se desecha el PFA/PBS, y cada pocillo se lava dos veces con 300 µl de PBS, y después se bloquea con 250 µl de DB. Se diluyen en serie 100 µl de los sobrenadantes de cultivo que contienen un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado purificado, y después se añaden a cada pocillo, y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar con tampón de lavado (denominado más adelante en la presente memoria RB PBS que contiene un 0,05% de Tween 20), se añaden 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (BioSource) diluido 1000 veces con DB. Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora y lavar con RB, se añade la disolución de sustrato, y después se mide la absorbancia a 405/655 nm mediante el uso del lector de microplacas (Bio-Rad).

(3) Medida de la actividad neutralizante

La actividad neutralizante de un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, y los anticuerpos humanizados se puede medir con la actividad de inhibición de la producción del Factor Xa mediante tromboplastina derivada de placenta humana, Thromborel S (Boehringer AG), como índice. Así, se añaden 60 µl del tampón (TBS que contiene CaCl₂ 5 mM y un 0,1% de BSA) a 10 µl de 1,25 mg/ml de Thromborel S y 10 µl de un anticuerpo diluido de manera adecuada, que después se incuba en una placa de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 1 hora.

Se le añaden 10 µl de 3,245 µg/ml de Factor X humano (Celsus Laboratories) y 82,5 ng/ml de Factor VIIa humano (Enzyme Research), y después se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora más. Después de añadir 10 µl de EDTA 0,5 M para parar la reacción, se añaden 50 µl de la disolución de sustrato cromogénico y se determina la absorbancia a 405/655 nm. Después de hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, se determina de nuevo la absorbancia a 405/655 nm. La actividad neutralizante se puede determinar calculando la actividad residual (%) de cada cambio de absorbancia, con el cambio de absorbancia sin adición de anticuerpo como una actividad del 100%.

La disolución de sustrato cromogénico se prepara disolviendo el sustrato cromogénico S-2222 de Testzyme (Chromogenix) según las instrucciones adjuntas, diluyendo 2 veces con agua purificada y después mezclando con una disolución de polibreno (0,6 mg/ml de bromuro de hexadimetileno, SIGMA) a 1:1.

7. Análisis cinético en la interacción del anticuerpo humanizado y TF soluble

Se pueden determinar los parámetros cinéticos, es decir, las constantes de disociación (KD), las constantes de la velocidad de disociación (kdiss), y las constantes de la velocidad de unión (kass), del anticuerpo anti-TF de la presente descripción mediante BIACORE.

Se inmoviliza Proteína G recombinante sobre un chip sensor, al que está acoplado el anticuerpo, y se usa TF recombinante purificado (un TF 1-219 soluble que se marcó con el péptido FLAG) (en adelante denominado TF soluble) como antígeno, mientras se usa TF soluble preparado a diversas concentraciones como analito. A partir del sensorgrama obtenido, se calculan los parámetros cinéticos (constante de la velocidad de disociación kdiss, y constante de la velocidad de unión kass), a partir de los cuales se puede determinar la constante de disociación. Para el análisis cinético, véase, por ejemplo, "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system" (Karlsson, R. et al., (1991) J. Immunol. Methods 145: 229-240).

Se prefiere que el anticuerpo anti-TF de la presente descripción tenga un valor menor de las constantes de disociación (KD), ya que tendrá una actividad neutralizante superior. En el anticuerpo anti-TF de la presente descripción, los valores de KD preferiblemente son menores de $2,30 \times 10^{-8}$ [1/M], más preferiblemente son menores de $2,30 \times 10^{-9}$ [1/M], y lo más preferiblemente son menores de $1,17 \times 10^{-9}$ [1/M].

Además, los valores de KD se determinan a partir de dos parámetros, la constante de la velocidad de disociación (kdiss) y la constante de la velocidad de unión (kass) ($KD = kdiss/kass$). Así, es evidente que cuando una kdiss es pequeña y una kass es grande, el valor de KD se hace pequeño.

De manera específica, en el caso del anticuerpo anti-TF de la presente descripción, los valores de kdiss pueden ser menores de $9,52 \times 10^{-3}$ [1/seg]. Preferiblemente, los valores de kdiss son menores de $9,52 \times 10^{-4}$ [1/seg], lo más preferiblemente son menores de $6,35 \times 10^{-4}$ [1/seg].

Por otra parte, los valores de kass pueden ser mayores de $4,15 \times 10^4$ [1/M·seg]. Preferiblemente, los valores de kass son mayores de $4,15 \times 10^5$ [1/M·seg], y lo más preferiblemente son mayores de $4,65 \times 10^5$ [1/M·seg].

Además, los anticuerpos anti-TF tienen preferiblemente un valor de kdiss que es menor de $9,52 \times 10^{-3}$ [1/seg] y un valor de kass que es mayor de $4,15 \times 10^4$ [1/M·seg].

Más específicamente, para el anticuerpo anti-TF de la presente descripción, los valores de KD están en el intervalo de $1,09 \times 10^{-10}$ - $2,30 \times 10^{-8}$ [1/M], preferiblemente $1,09 \times 10^{-9}$ - $2,30 \times 10^{-9}$ [1/M], y lo más preferiblemente $1,09 \times 10^{-9}$ - $1,39 \times 10^{-9}$ [1/M].

Además, los valores de kdiss están en el intervalo de $5,06 \times 10^{-4}$ - $9,52 \times 10^{-3}$ [1/seg], preferiblemente $5,06 \times 10^{-4}$ - $9,52 \times 10^{-4}$ [1/seg], y lo más preferiblemente $5,06 \times 10^{-4}$ - $6,49 \times 10^{-4}$ [1/seg].

Y los valores de kass están en el intervalo de $4,15 \times 10^4$ - $5,44 \times 10^5$ [1/M·seg], preferiblemente $4,15 \times 10^5$ - $5,44 \times 10^5$ [1/M·seg], y lo más preferiblemente $4,65 \times 10^5$ - $5,44 \times 10^5$ [1/M·seg].

Aunque estos valores de KD, valores de kdiss, y valores de kass se pueden obtener, además de BIACORE, mediante análisis de Scatchard y similares, se prefiere usar BIACORE.

8. Medida de la reactividad del anticuerpo humanizado hacia TF humano

Se puede usar el método de hibridación de transferencia puntual para investigar la reactividad del TF sin desnaturar, el TF desnaturizado en condiciones no reductoras, y el TF desnaturizado en condiciones reductoras.

El TF puede ser el que se purificó a partir de tejido humano, o que se expresó en células mamíferas, tales como células CHO, y se purificó, y se puede usar para investigación. Como agente desnaturante, se puede usar hidrócloruro de guanidina o SDS, etc., en vez de urea. Como agente reductor, se puede usar un agente reductor de SH tal como 2-mercaptoetanol en vez de DTT. Para la detección del anticuerpo humanizado, se puede usar un anticuerpo anti-IgG humana marcado con diversas sustancias. Tal como se usa en la presente memoria, los agentes marcadores pueden ser radioisótopos, biotina, sustancias fluorescentes tales como FITC, enzimas tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y similares. El anticuerpo anti-TF de la presente descripción reacciona con cualquiera de los TF sin desnaturar, TF desnaturizado en condiciones no reductoras, y TF desnaturizado en condiciones reductoras.

9. Composiciones farmacéuticas y agentes terapéuticos para CID que comprenden un anticuerpo humanizado como ingrediente activo

Para confirmar el efecto terapéutico del anticuerpo humanizado sobre el TF humano, se administra el anticuerpo anti-TF humano humanizado a un animal que tiene un síntoma de CID elevada, y después se miden los índices de CID para confirmar el efecto terapéutico.

5 El anticuerpo, tal como se usa en la presente memoria, es un anticuerpo humanizado hacia TF humano. El anticuerpo neutraliza la actividad de TF humano uniéndose al TF humano, y se puede mencionar preferiblemente un anticuerpo ATR5 humanizado. El método de generación del anticuerpo ATR5 humanizado se describe en los Ejemplos.

10 El anticuerpo, tal como se usa en la presente memoria, se puede purificar hasta una pureza elevada combinando métodos de purificación habituales tales como desalación, un método de filtración en gel tal como HPLC, cromatografía de afinidad mediante el uso de una columna de Proteína A, y similares. Se puede confirmar que el anticuerpo así purificado reconoce el TF humano con una precisión elevada mediante el uso de medios inmunológicos habituales tales como radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (EIA, ELISA), o un método con un anticuerpo inmunofluorescente (análisis de inmunofluorescencia) y similares.

15 Las composiciones farmacéuticas o los agentes terapéuticos para CID de la presente descripción que comprenden como ingrediente activo el anticuerpo humanizado hacia TF se pueden administrar de manera no oral, sistémicamente o localmente. Por ejemplo, el método de administración se puede seleccionar de inyección intravenosa tal como infusión por goteo, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, e inyección subcutánea, y se puede seleccionar, según sea adecuado, basándose en la edad y el estado del paciente. La dosis eficaz se elige del intervalo de 0,01 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración. De manera alternativa, se puede elegir la dosis de 10 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 1 a 1000 mg/kg de peso corporal por paciente.

25 Las composiciones farmacéuticas y los agentes terapéuticos para CID de la presente descripción que contienen un anticuerpo humanizado hacia TF humano como ingrediente activo pueden contener vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables dependiendo de la vía de administración. Los ejemplos de tales vehículos o aditivos incluyen agua, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato sódico, alginato sódico, dextrano hidrosoluble, carboximetil almidón sódico, pectina, metil celulosa, etil celulosa, goma de xantano, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, glicerina, propilen glicol, polietilen glicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina de suero humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, un tensoactivo farmacéuticamente aceptable y similares. Los aditivos usados se eligen, pero sin limitación, de los anteriores o de combinaciones de los mismos, según sea adecuado, dependiendo de la forma farmacéutica de la presente descripción.

35 Efectos de la Invención

Según la presente descripción, se proporciona un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado hacia TF humano, y un procedimiento reivindicado de generación de un anticuerpo humanizado. Estos anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos debido a su baja antigenicidad.

Ejemplos

La presente invención se explicará a continuación con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos.

45 Ejemplo 1. Clonación del ADN que codifica la región V de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano

(1) Preparación de mARN

50 Se preparó mARN a partir de los hibridomas ATR-2, ATR-3, ATR-4, ATR-5 (IgG1κ), ATR-7, y ATR-8 (IgG2ακ) mediante el uso del equipo de purificación de mARN QuickPrep (Pharmacia Biotech). Cada célula de hibridoma se homogeneizó completamente en el tampón de extracción según las instrucciones adjuntas con el equipo, y después se purificó el mARN mediante la columna de centrifugación de oligo (dT)-celulosa, seguido de precipitación con etanol. El precipitado de mARN se disolvió en el tampón de elución.

55 (2) Preparación y amplificación del cADN del gen que codifica una región V de un anticuerpo de ratón

(i) Clonación del cADN de la región V de la cadena H

60 Se llevó a cabo la clonación del gen que codifica la región V de la cadena H de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano mediante el uso del método 5'-RACE (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17: 2919-2932, 1989). Para el método 5'-RACE, se usó el equipo de amplificación de cADN Marathon (CLONTECH) y el procedimiento se llevó a cabo según las instrucciones adjuntas con el equipo.

65

Mediante el uso de alrededor de 1 µg de mRNA preparado como se mencionó anteriormente como molde, se añadió el cebador de síntesis de cADN adjunto con el equipo, que se hizo reaccionar con una transcriptasa inversa a 42 °C durante 60 minutos para llevar a cabo la transcripción inversa hasta el cADN. Esto se hizo reaccionar con la ADN polimerasa I, ADN ligasa, y RNasaH a 16 °C durante 1,5 hora, y con T4 ADN polimerasa a 16 °C durante 45 minutos, por lo que se sintetizó un cADN bicatenario. El cADN bicatenario se extrajo con fenol y cloroformo, y se recuperó mediante precipitación con etanol.

Mediante la reacción durante la noche con una T4 ADN ligasa a 16 °C, se ligó un adaptador de cADN a ambos extremos del cADN bicatenario. La mezcla de reacción se diluyó 50 veces con Tricina-KOH 10 mM (pH 8,5) que contenía EDTA 0,1 mM. Usando esto como molde, se amplificó del gen que codifica la región V de la cadena H mediante PCR. Se usó el cebador adaptador 1 adjunto con el equipo para el cebador del extremo 5', y para el cebador del extremo 3' se usó el cebador MHC-G1 (SEQ ID N°: 1) (ATR-2, ATR-3, ATR-4, y ATR-5) o el cebador MHC-G2a (SEQ ID N°: 2) (ATR-7 y ATR-8) (S. T. Jones, et al., *Biotechnology*, 9: 88-89, 1991).

Las disoluciones de PCR para la región V de la cadena H de los anticuerpos ATR-2, 3, 4, y 5 contuvieron, en 100 µl, Tris-HCl 120 mM (pH 8,0), KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 6 mM, 0,1% de Triton X-100, 0,001% de BSA, dNTPs 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl₂ 1 mM, 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki), 30-50 pmoles de cebador adaptador 1, así como cebador MHC-G1, y 1-5 µl de una mezcla de reacción de cADN a la que se ligó el adaptador de cADN.

Todas las PCRs se llevaron a cabo mediante el uso del termociclador de ADN 480 (Perkin-Elmer), y la PCR se realizó durante treinta ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, y 74 °C durante 1 minuto.

(ii) Clonación del cADN de la región V de la cadena L

Se llevó a cabo la clonación del gen que codifica la región V de la cadena L de un anticuerpo monoclonal de ratón hacia TF humano mediante el uso del método 5'-RACE (Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., *Nucleic Acids Res.* 17: 2919-2932, 1989). Para el método 5'-RACE, se usó el equipo de amplificación de cADN Marathon (CLONTECH) y se llevó a cabo según las instrucciones adjuntas con el equipo. Mediante el uso de alrededor de 1 µg de mRNA preparado como se mencionó anteriormente como molde, se añadió el cebador de síntesis de cADN, que se hizo reaccionar con una transcriptasa inversa a 42 °C durante 60 minutos para llevar a cabo la transcripción inversa hasta el cADN.

Esto se hizo reaccionar con la ADN polimerasa I, ADN ligasa, y RNasaH a 16 °C durante 1,5 horas, y con T4 ADN polimerasa a 16 °C durante 45 minutos, por lo que se sintetizó un cADN bicatenario. El cADN bicatenario se extrajo con fenol y cloroformo, y se recuperó mediante precipitación con etanol. Mediante la reacción durante la noche con una T4 ADN ligasa a 16 °C, se ligó un adaptador de cADN a ambos extremos del cADN bicatenario. La mezcla de reacción se diluyó 50 veces con Tricina-KOH 10 mM (pH 8,5) que contenía EDTA 0,1 mM. Usando esto como molde, se amplificó del gen que codifica la región V de la cadena L mediante PCR. Se usó el cebador adaptador 1 para el cebador del extremo 5', y para el cebador del extremo 3' se usó el cebador MKC (SEQ ID N°: 3) (S. T. Jones, et al., *Biotechnology*, 9: 88-89, 1991).

Las disoluciones de PCR contenían, en 100 µl, Tris-HCl 120 mM (pH 8,0), KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 6 mM, 0,1% de Triton X-100, 0,001% de BSA, dNTPs 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl₂ 1 mM, 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki), 30-50 pmoles de cebador adaptador 1, así como cebador MKC, y 1 µl de una mezcla de reacción de cADN a la que se ligó el adaptador de cADN.

Todas las PCRs se llevaron a cabo mediante el uso del termociclador de ADN 480 (Perkin-Elmer), y la PCR se realizó durante treinta ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, y 74 °C durante 1 minuto.

(3) Purificación y fragmentación de los productos de PCR

La mezcla de reacción de PCR anterior se extrajo con fenol y cloroformo, y los fragmentos de ADN amplificados se recuperaron mediante precipitación con etanol. Los fragmentos de ADN se digirieron con la enzima de restricción XmaI (New England Biolabs) a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de digestión de XmaI se separó mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de agarosa NuSieve GTG del 2%-3% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 500 pb de la región V de la cadena H y fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 500 pb de la región V de la cadena L. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, se precipitaron los fragmentos de ADN con etanol, que se disolvieron después en 10 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 1 mM (denominado más adelante en la presente memoria TE).

Los fragmentos de ADN digeridos con XmaI preparados como se mencionó anteriormente que contenían un gen que codifica una región V de la cadena H de ratón y una región V de la cadena L de ratón y el vector plasmídico pUC19

preparado digiriendo con XmaI se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante reacción a 16 °C durante 1 hora según las instrucciones adjuntas con el equipo.

5 La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C.

10 Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después, se colocaron en placas las células de *Escherichia coli* en un medio de agar LB (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) que contenía 100 µg/ml de ampicilina (denominado más adelante en la presente memoria medio de agar LBA), y se incubó durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*.

15 El transformante se cultivó durante la noche en 3 ml o 4 ml de un medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina (denominado más adelante en la presente memoria medio LBA) a 37 °C, y a partir de las fracciones celulares, se preparó ADN plasmídico mediante el uso del equipo QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN), y después se determinó la secuencia de nucleótidos.

(4) Determinación de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica una región V de un anticuerpo de ratón

20 Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región codificante del cADN en el plásmido anterior mediante el uso del equipo Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Perkin-Elmer) mediante el secuenciador de ADN 373A (Perkin-Elmer). Como cebadores de secuenciación, se usaron el cebador de M13 M4 (Takara Shuzo) (SEQ ID N°: 4) y el cebador de M13 RV (Takara Shuzo) (SEQ ID N°: 5), y se determinó la secuencia confirmando la secuencia de nucleótidos en ambas direcciones.

25 Los plásmidos así obtenidos que contenían el gen que codifica la región V de la cadena H de ratón derivada de los hibridomas ATR-2, ATR-3, ATR-4, ATR-5, ATR-7, y ATR-8 se denominaron ATR-xHv/pUC19 (x = 2, 3, 4, 5, 7, o 8), y los plásmidos así obtenidos que contenían el gen que codifica una región V de la cadena L de ratón derivados de los hibridomas ATR-2, ATR-3, ATR-4, ATR-5, ATR-7, y ATR-8 se denominaron ATR-xLv/pUC19 (x = 2, 3, 4, 5, 7, o 8).
30 La secuencias de nucleótidos de los genes que codifican la región V de la cadena H de cada anticuerpo de ratón contenidas en el plásmido ATR-xHv/pUC19 (x = 2, 3, 4, 5, 7, o 8) (lo que incluye las secuencias de aminoácidos correspondientes) se muestran en SEQ ID N°: 6 a 11, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican la región V de la cadena L de cada anticuerpo de ratón contenidas en el plásmido ATR-xLv/pUC19 (x = 2, 3, 4, 5, 7, o 8) (lo que incluye las secuencias de aminoácidos correspondientes) se muestran en SEQ ID N°:
35 12 a 17, respectivamente.

Ejemplo 2. Construcción de un anticuerpo quimérico

40 Se generó un anticuerpo ATR-5 quimérico en el que la región V del anticuerpo ATR-5 de ratón se ligó a la región C de un anticuerpo humano. Se construyó un vector de expresión del anticuerpo quimérico ligando el gen que codifica la región V del anticuerpo ATR-5 a un vector de expresión que codifica la región C de un anticuerpo humano.

(1) Construcción de una región V de la cadena H de un anticuerpo quimérico

45 Se modificó la región V de la cadena H del anticuerpo ATR-5 mediante el método de PCR para ligarla a un vector de expresión que codifica la región C de la cadena H del anticuerpo humano. El cebador del extremo 5' ch5HS (SEQ ID N°: 18) se diseñó para que hibridase al extremo 5' del ADN que codifica la región V y para que tuviera la secuencia consenso de Kozak (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) y una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Sall. El cebador del extremo 3' ch5HA (SEQ ID N°: 19) se diseñó para que hibridase al extremo 3' del ADN que codifica la región J y para que tuviera una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción NheI.
50

55 Las disoluciones de PCR contuvieron, en 100 µl, Tris-HCl 120 mM (pH 8,0), KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 6 mM, 0,1% de Triton X-100, 0,001% de BSA, dNTPs 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl₂ 1 mM, 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki), 50 pmoles del cebador ch5HS y del cebador ch5HA, así como 1 µl del plásmido ATR5Hv/pUC19 como molde de ADN. Para la PCR, se usó el termociclador de ADN 480 (Perkin-Elmer), y la PCR se llevó a cabo durante treinta ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, y 74 °C durante 1 minuto.

60 La mezcla de reacción de PCR se extrajo con fenol y cloroformo, y los fragmentos de ADN amplificados se recuperaron mediante precipitación con etanol. Los fragmentos de ADN se digirieron con la enzima de restricción NheI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora, y después con la enzima de restricción Sall (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 3% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de

una longitud de alrededor de 450 pb. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, y los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y después se disolvieron en 20 µl de TE.

Como vector de clonación, se usó un vector con promotor alterado (denominado más adelante en la presente memoria CVIDEC) en el que se introdujeron las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción NheI, Sall, y SphI, BglII. El fragmento del gen preparado como se mencionó anteriormente que codificaba la región V de la cadena H de ratón y el vector CVIDEC preparado digiriendo con NheI y Sall se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante una reacción a 16 °C durante 1 hora siguiendo las instrucciones adjuntas con el equipo.

La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C. Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con el medio de agar LBA y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*. El transformante se cultivó durante la noche a 37 °C en 3 ml del medio LBA, y a partir de las fracciones celulares, se preparó un plásmido de ADN mediante el uso del equipo QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN).

Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región codificante del cADN en el plásmido mediante el uso del equipo Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Perkin-Elmer) mediante el secuenciador de ADN 373A (Perkin-Elmer). Como cebadores de secuenciación, se usaron el cebador de M13 M4 (Takara Shuzo) y el cebador de M13 RV (Takara Shuzo), y se determinó la secuencia confirmando la secuencia de nucleótidos en ambas direcciones. El plásmido que contiene el gen que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo ATR-5, una secuencia de reconocimiento de Sall y la secuencia consenso de Kozak en el extremo 5', y una secuencia de reconocimiento de NheI en el extremo 3' se denominó chATR5Hv/CVIDEC.

(2) Construcción de una región V de la cadena L de un anticuerpo quimérico

Se modificó la región V de la cadena L del anticuerpo ATR-5 mediante el método de PCR para ligarla a un vector de expresión que codifica la región C de la cadena L del anticuerpo humano. El cebador del extremo 5' ch5LS (SEQ ID N°: 20) se diseñó para que hibridase al extremo 5' del ADN que codifica la región V y para que tuviera la secuencia consenso de Kozak (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) y una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción BglII. El cebador del extremo 3' ch5LA (SEQ ID N°: 21) se diseñó para que hibridase al extremo de 3' del ADN que codifica la región J y para que tuviese una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción SphI.

Las disoluciones de PCR contenían, en 100 µl, Tris-HCl 120 mM (pH 8,0), KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 6 mM, 0,1% de Triton X-100, 0,001% de BSA, dNTPs 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl₂ 1 mM, 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki), 50 pmoles del cebador ch5LS y del cebador ch5LA, así como 1 µl del plásmido ATR 5Lv/pUC19 como molde de ADN. Para la PCR, se usó el termociclador de ADN 480 (Perkin-Elmer), y la PCR se llevó a cabo durante treinta ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, y 74 °C durante 1 minuto.

La mezcla de reacción de PCR se extrajo con fenol y cloroformo, y los fragmentos de ADN amplificados se recuperaron mediante precipitación con etanol. Los fragmentos de ADN se digirieron con la enzima de restricción SphI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora, y después con la enzima de restricción BglII (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 3% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 400 pb. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y después se disolvieron en 20 µl de TE.

El fragmento del gen preparado como se mencionó anteriormente que codificaba la región V de la cadena L de ratón y el vector CVIDEC preparado digiriendo con SphI y BglII se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante una reacción a 16 °C durante 1 hora siguiendo las instrucciones adjuntas con el equipo.

La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C. Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con un medio de agar LBA de 100 µg/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*. El transformante se cultivó durante la noche a 37 °C en 3 ml del medio LBA, y a partir de las fracciones celulares, se preparó un plásmido de ADN mediante el uso del equipo QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN).

Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región codificante del cADN en el plásmido mediante el uso del equipo Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Perkin-Elmer) mediante el secuenciador de ADN 373A (Perkin-Elmer). Como cebadores de secuenciación, se usaron el cebador de M13 M4 (Takara Shuzo) y el

cebador de M13 RV (Takara Shuzo), y se determinó la secuencia confirmando la secuencia de nucleótidos en ambas direcciones. El plásmido que contiene el gen que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo ATR-5 y el que tiene una secuencia de reconocimiento de BglIII y la secuencia consenso de Kozak en el extremo 5', y una secuencia de reconocimiento de SphI en el extremo 3' se denominó chATR5Lv/CVIDEC.

(3) Construcción de un vector de expresión de un anticuerpo quimérico

Se construyó un vector de expresión de un anticuerpo quimérico mediante el uso de un vector de expresión de anticuerpo de IDEC Pharmaceuticals. Como vector, se usó el vector de expresión de un anticuerpo de tipo IgG1 H5KG1(V) y el vector de expresión de un anticuerpo de tipo IgG4 N5KG4P. El vector de expresión del anticuerpo ATR-5 quimérico se generó ligando un gen que codificaba la región V de la cadena H de ATR-5 al sitio Sall-NheI localizado inmediatamente antes de la región C de la cadena H del anticuerpo humano del vector de expresión N5KG1(V) o N5KG4P y ligando un gen que codificaba la región V de la cadena L de ATR-5 al sitio BglIII-SphI localizado inmediatamente antes de la región C de la cadena L del anticuerpo humano del vector de expresión N5KG1(V) o N5KG4P.

(i) Introducción de la región V de la cadena H

El plásmido chATR5Hv/CVIDEC se digirió con la enzima de restricción NheI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 3 horas, y con la enzima de restricción Sall (Takara Shuzo) a 37 °C durante 3 horas. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa mediante el uso de agarosa NuSieve GTG al 1,5% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 450 pb. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, y los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y después se disolvieron en 20 µl de TE.

Los vectores de expresión N5KG1(V) y N5KG4P se digirieron con la enzima de restricción NheI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 3 horas, y con la enzima de restricción Sall (Takara Shuzo) a 37 °C durante 3 horas. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa mediante el uso de agarosa NuSieve GTG al 1,5% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 9000 pb. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, y los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y después se disolvieron en 20 µl de TE.

El fragmento de ADN Sall-NheI preparado como se mencionó anteriormente que contenía el gen que codifica la región V de la cadena H, y N5KG1(V) o N5KG4P digerido con Sall y NheI, se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante reacción a 16 °C durante 1 hora según las instrucciones adjuntas.

La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C. Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con un medio de agar LBA de 100 µg/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*. El transformante se cultivó durante la noche a 37 °C en 3 ml del medio LBA, y a partir de las fracciones celulares se preparó un plásmido de ADN mediante el uso del equipo QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN). Estos plásmidos que contenían los genes que codifican la cadena H del anticuerpo ATR-5 quimérico se denominaron chATR5Hv/N5KG1(V) y chATR5Hv/N5KG4P, respectivamente.

(ii) Introducción de la región V de la cadena L

El plásmido chATR5Lv/CVIDEC se digirió con las enzimas de restricción BglIII (Takara Shuzo) y SphI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1,5 horas. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa mediante el uso de agarosa NuSieve GTG al 1,5% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 400 pb. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, y los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y después se disolvieron en 20 µl de TE.

Los plásmidos chATR5Hv/N5KG1(V) y chATR5Hv/N5KG4P se digirieron con las enzimas de restricción BglIII (Takara Shuzo) y SphI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1,5 horas. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa mediante el uso de agarosa NuSieve GTG al 1,5% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 9400 pb. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y después se disolvieron en 20 µl de TE.

El fragmento de ADN SphI-BglIII preparado como se mencionó anteriormente que contenía el gen que codifica la región V de la cadena L, y chATR5Hv/N5KG1(V) o chATR5Hv/N5KG4P digeridos con SphI y BglIII, se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante reacción a 16 °C durante 1 hora según las instrucciones adjuntas.

La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C. Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con un medio de agar LBA de 100 µg/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*. El transformante se cultivó durante la noche a 37 °C en 1 l del medio 2xYT que contenía 50 µg/ml de ampicilina, y a partir de las fracciones celulares, se preparó ADN plasmídico mediante el uso del equipo Plasmid Maxi (QIAGEN). Estos plásmidos que contienen el gen que codifica el anticuerpo ATR-5 quimérico se denominaron chATR5/N5KG1(V) y chATR5/N5KG4P, respectivamente.

10 (4) Transfección en células COS-7

Para determinar la actividad de unión al antígeno y la actividad neutralizante del anticuerpo quimérico, se transfectó el plásmido de expresión anterior a células COS-7 y el anticuerpo se expresó de manera transitoria.

15 El plásmido chATR5/N5KG1(V) o chATR5/N5KG4P se transdujo en células COS-7 mediante electroporación mediante el uso del instrumento Gene Pulser (Bio-Rad). Se añadieron 50 µg del plásmido a 0,78 ml de células COS-7 suspendidas en PBS Dulbecco (-) (denominado más adelante en la presente memoria PBS) a una concentración celular de 1×10^7 células/ml, que se sometieron a pulsos de 1.500 V y 25 µF de capacidad.

20 Después de 10 minutos de período de recuperación a temperatura ambiente, las células sometidas a electroporación se suspendieron en un medio DMEM que contenía un 5% de suero bovino fetal Ultra Low IgG (GIBCO), y se cultivaron mediante el uso de una placa de cultivo de 10 cm en un incubador con un 5% de CO₂. Después de cultivar durante 24 horas, se aspiró el sobrenadante del cultivo, y después se añadió un medio HBCHO exento de suero (Irvine Scientific). Después de cultivar durante otras 72 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo y se centrifugó para eliminar los restos celulares.

25 (5) Purificación del anticuerpo

30 A partir del sobrenadante del cultivo de células COS-7, se purificó el anticuerpo quimérico mediante el uso de rProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) como sigue.

Se colocó un ml de rProtein A Sepharose Fast Flow en una columna, y la columna se equilibró con 10 volúmenes de TBS. El sobrenadante del cultivo de células COS-7 se aplicó a la columna equilibrada, que después se lavó con 10 volúmenes de TBS.

35 La fracción de anticuerpo adsorbida se eluyó después con 13,5 ml de HCl 2,5 mM (pH 3,0), y el eluato se neutralizó inmediatamente mediante la adición de 1,5 ml de Tris-HCl 1 M (pH 8,0).

40 Llevando a cabo la ultrafiltración dos veces para la fracción de anticuerpo purificada mediante el uso de Centriprep 100 (Amicon), se sustituyó el disolvente por Tris-HCl 50 mM (pH 7,6) que contenía NaCl 150 mM (denominado más adelante en la presente memoria TBS), y finalmente se concentró hasta alrededor de 1,5 ml.

(6) Establecimiento de una línea celular CHO de producción estable

45 Para establecer una línea celular que produzca de manera estable el anticuerpo quimérico, el plásmido de expresión anterior se introdujo en células CHO (DG44) aclimatadas al medio CHO-S-SFMII exento de suero (GIBCO).

50 El plásmido chATR5/N5KG1(V) o chATR5/N5KG4P se escindió con la enzima de restricción Sspl (Takara Shuzo) para linealizar el ADN, y tras la extracción con fenol y cloroformo, se recuperó el ADN mediante precipitación con etanol. El plásmido linealizado se transdujo en las células DG44 mediante electroporación mediante el uso del instrumento Gene Pulser (Bio-Rad). Se añadieron 10 µg del plásmido a 0,78 ml de células DG44 suspendidas en PBS a una concentración celular de 1×10^7 células/ml, que se sometieron a pulsos de 1.500 V y 25 µF de capacidad.

55 Después de 10 minutos de período de recuperación a temperatura ambiente, las células sometidas a electroporación se suspendieron en un medio CHO-S-SFMII (GIBCO) que contenía hipoxantina/timidina (GIBCO), y se cultivaron mediante el uso de dos placas de 96 pocillos (Falcon) en un incubador con un 5% de CO₂. En el día después del inicio del cultivo, el medio se cambió por un medio de selección que contenía el medio CHO-S-SFMII (GIBCO) que contenía hipoxantina/timidina (GIBCO) y 500 µg/ml de GENETICIN (G418Sulfate, GIBCO) para seleccionar las células en las que se había introducido el gen del anticuerpo. Después de cambiar el medio de selección, se examinaron las células con un microscopio aproximadamente dos semanas más tarde. Después de observar un crecimiento celular favorable, se midió la cantidad de anticuerpo producido mediante el ELISA descrito más adelante para determinar la concentración del anticuerpo, y se seleccionaron las células que tenían un rendimiento elevado de producción de anticuerpo.

Ejemplo 3. Construcción de un anticuerpo humanizado

(1) Construcción de la cadena H de un anticuerpo humanizado

5 (i) Construcción de la versión "a" de la cadena H humanizada

Se generó la cadena H del anticuerpo ATR-5 humanizado mediante el uso del injerto de CDR con el método de PCR. Para generar la versión "a" de la cadena H del anticuerpo humanizado que tenía las FRs derivadas del anticuerpo humano L39130 (DDBJ, Gao L. et al., sin publicar, 1995), se usaron siete cebadores de PCR. Los cebadores de injerto de CDR hR5Hv1S (SEQ ID N°: 22), hR5Hv2S (SEQ ID N°: 23), y hR5Hv4S (SEQ ID N°: 24) tienen una secuencia de ADN directa, y los cebadores de injerto de CDR hR5Hv3A (SEQ ID N°: 25) y hR5Hv5A (SEQ ID N°: 26) tienen una secuencia de ADN inversa, y cada cebador tiene una secuencia complementaria de 18-35 pb en ambos extremos.

15 hR5Hv1S se diseñó para que tuviera la secuencia consenso de Kozak (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) y un sitio de reconocimiento de Sall, y hR5Hv5A se diseñó de manera que tuviera un sitio de reconocimiento de NheI. El cebador exógeno hR5HvPrS (SEQ ID N°: 27) tiene homología con el cebador de injerto de CDR hR5Hv1S, y hR5HvPrA (SEQ ID N°: 28) tiene homología con el cebador de injerto de CDR hR5Hv5A.

20 Los cebadores de injerto de CDR hR5Hv1S, hR5Hv2S, hR5Hv3A, hR5Hv4S, y hR5Hv5A, y los cebadores exógenos hR5HvPrS y hR5HvPrA fueron sintetizados y purificados por Pharmacia Biotech.

25 La PCR se llevó a cabo mediante el uso de la KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki) y mediante el uso del tampón adjunto que contenía Tris-HCl 120 mM (pH 8,0), KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 mM, 0,1% de Triton X100, 0,001% de BSA, dNTPs 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl_2 1 mM, 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki), y 5 pmoles de cada uno de los cebadores de injerto de CDR hR5Hv1S, hR5Hv2S, hR5Hv3A, hR5Hv4S, y hR5Hv5A en 98 μl , durante 5 ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 1 minuto. Tras la adición posterior de 100 pmoles de los cebadores exógenos hR5HvPrS y hR5HvPrA, se llevó a cabo la PCR durante 25 ciclos en un sistema de 100 μl con el mismo ciclo de temperaturas.

30 Los fragmentos de ADN amplificados mediante el método de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 2% (FMC BioProducts).

35 Se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 430 pb, se les añadieron 3 volúmenes (ml/g) de TE, y después se extrajeron con fenol, fenol/cloroformo, y cloroformo para purificar los fragmentos de ADN. Después de precipitar el ADN purificado con etanol, se disolvió un tercio del volumen del mismo en 17 μl de agua. La mezcla de la reacción de PCR obtenida se digirió con NheI y Sall, y se ligó al vector plasmídico CVIDEC preparado mediante digestión con NheI y Sall, mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) según las instrucciones adjuntas con el equipo.

40 La mezcla de ligadura se añadió a 100 μl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C. Después, se le añadieron 300 μl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con el medio de agar LBA y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*. El transformante se cultivó durante la noche a 37 °C en 3 ml del medio LBA, y a partir de las fracciones celulares, se preparó un plásmido de ADN mediante el uso del equipo QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN).

45

Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región codificante del cADN en el plásmido mediante el uso del equipo Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Perkin-Elmer) mediante el secuenciador de ADN 373A (Perkin-Elmer). Como cebadores de secuenciación, se usaron el cebador de M13 M4 (Takara Shuzo) y el cebador de M13 RV (Takara Shuzo), y se determinó la secuencia confirmando la secuencia de nucleótidos en ambas direcciones.

50

Debido a que se observaron mutaciones y/o deleciones antes o después del sitio de reconocimiento de EcoT221, cada uno de los fragmentos que tenían la secuencia correcta se ligaron y después se subclonaron de nuevo en CVIDEC para determinar la secuencia de nucleótidos. El plásmido que tenía la secuencia correcta se denominó hATR5Hva/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "a" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hva/CVIDEC se muestran en SEQ ID N°: 29. La secuencia de aminoácidos de la versión "a" se muestra también en SEQ ID N°: 30.

55

60 (ii) Construcción de las versiones "b" y "c" de la cadena H humanizada

Las versiones "b" y "c" se generaron sustituyendo la FR3 de la versión "a" con la FR3 derivada de otro anticuerpo humano mediante el uso del método de reordenamiento de FR. Para sustituir la FR3 en la versión "b" con una derivada del anticuerpo humano Z34963 (DDBJ, Borretzen M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 12917-12921, 1994), se generaron los cuatro cebadores de ADN que codificaban la FR3. Los cebadores de reordenamiento de FR

65

F3RFFS (SEQ ID N°: 31) y F3RFBS (SEQ ID N°: 32) tienen una secuencia de ADN directa, y F3RFFA (SEQ ID N°: 33) y F3RFBA (SEQ ID N°: 34) tienen una secuencia de ADN inversa. F3RFFS y F3RFFA tienen una secuencia complementaria entre sí, y tienen secuencias de reconocimiento de Ball y XhoI en ambos extremos. F3RFBS y F3RFBA tienen una secuencia complementaria entre sí, y tienen secuencias de reconocimiento de XhoI y NcoI en ambos extremos.

Para sustituir la FR3 en la versión "c" con una derivada del anticuerpo humano P01825 (SWISS-PROT, Poljak R.J. et al., *Biochemistry*, 16: 3412-3420, 1977), se generaron cuatro cebadores de ADN que codificaban FR3. Los cebadores de reordenamiento de FR F3NMFS (SEQ ID N°: 35) y F3NMBS (SEQ ID N°: 36) tienen una secuencia de ADN directa, y F3NMFA (SEQ ID N°: 37) y F3NMBA (SEQ ID N°: 38) tienen una secuencia de ADN inversa.

F3NMFS y F3NMFA tienen una secuencia complementaria entre sí, y tienen secuencias de reconocimiento de Ball y XhoI en ambos extremos.

F3NMBS y F3NMBA tienen secuencias de reconocimiento de XhoI y NcoI en ambos extremos.

F3RFFS, F3RFBS, F3RFFA, F3RFBA, F3NMFS, F3NMBS, F3NMFA, y F3NMBA fueron sintetizados por Pharmacia Biotech. F3RFFS y F3RFFA, y F3RFBS y F3RFBA se hibridaron, y se digirieron con Ball y XhoI, y NcoI y XhoI, respectivamente. Se introdujeron en el plásmido hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) preparado mediante digestión con Ball y NcoI, y se determinó la secuencia de nucleótidos. El plásmido que tenía la secuencia correcta se denominó hATR5Hvb/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "b" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvb/CVIDEC se muestran en SEQ ID N°: 39. La secuencia de aminoácidos de la versión "b" se muestra también en SEQ ID N°: 40.

F3NMFS y F3NMFA, y F3NMBS y F3NMBA se hibridaron, y se digirieron con Ball y XhoI, y NcoI y XhoI, respectivamente. Se introdujeron en el plásmido hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) preparado mediante digestión con Ball y NcoI, y se determinó la secuencia de nucleótidos. El plásmido que tenía la secuencia correcta se denominó hATR5Hvc/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "c" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvc/CVIDEC se muestran en SEQ ID N°: 41. La secuencia de aminoácidos de la versión "c" se muestra también en SEQ ID N°: 42.

(iii) Construcción de las versiones "d" y "e" de la cadena H humanizada

Las versiones "d" y "e" se generaron sustituyendo la FR3 de la versión "a" con la FR3 derivada de otro anticuerpo humano mediante el uso del método de reordenamiento de FR. Para sustituir la FR3 en la versión "d" con una derivada del anticuerpo humano M62723 (DDBJ, Pascual V. et al., *J. Clin. Invest.*, 86: 1320-1328, 1990), se generaron cuatro cebadores de ADN que codificaban FR3. El cebador de reordenamiento de FR F3EPS (SEQ ID N°: 43) tiene una secuencia de ADN directa, y F3EPA (SEQ ID N°: 44) tiene una secuencia de ADN inversa, y el extremo 3' de los cebadores tiene una secuencia complementaria de 18 pb.

Los cebadores exógenos F3PrS (SEQ ID N°: 45) y F3PrA (SEQ ID N°: 46) tienen homología con los cebadores de reordenamiento de FR F3EPS y F3EPA, y se pueden usar también para otros reordenamientos de FR de FR3. Para sustituir la FR3 en la versión "e" con una derivada del anticuerpo humano Z80844 (DDBJ, Thomsett A.R. et al., sin publicar), se generaron dos cebadores de ADN que codificaban FR3. El cebador de reordenamiento de FR F3VHS (SEQ ID N°: 47) tiene una secuencia de ADN directa, y F3VHA (SEQ ID N°: 48) tiene una secuencia de ADN inversa, y el extremo 3' de los cebadores tiene una secuencia complementaria de 18 pb. F3EPS, F3EPA, F3PrS, F3PrA, F3VHS y F3VHA fueron sintetizados por Pharmacia Biotech.

La PCR se llevó a cabo mediante el uso de la KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki) mediante el uso del tampón adjunto que contenía 5 µl de cada uno de los cebadores de reordenamiento de FR F3EPS y F3EPA 1 µM, o F3VHS y F3VHA, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,0 mM, y 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa en 100 µl de mezcla de reacción, durante 5 ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 minuto, y 74 °C durante 1 minuto. Después de la adición posterior de 100 pmoles de los cebadores exógenos F3PrS y F3PrA, se llevó a cabo la PCR durante 25 ciclos con el mismo ciclo de temperaturas.

Los fragmentos de ADN amplificados mediante el método de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa Nu Sieve GTG al 2% (FMC BioProducts). Se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 424 pb, se les añadieron 3 volúmenes (ml/g) de TE, y después se extrajeron con fenol, fenol/cloroformo, y cloroformo para purificar los fragmentos de ADN. Después de precipitar el ADN purificado con etanol, se disolvió un tercio del volumen del mismo en 14 µl de agua. La mezcla de reacción de PCR obtenida se digirió con Ball y NcoI, y se introdujo en el plásmido hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) preparado mediante digestión con Ball y NcoI, y se determinó la secuencia de nucleótidos.

Los plásmidos que tenían la secuencia correcta se denominaron hATR5Hvd/CVIDEC y hATR5Hve/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "d" de la cadena H humani-

zada contenida en el plásmido hATR5Hvd/CVIDEC se muestran en SEQ ID N°: 49, y la secuencia de aminoácidos de la versión "d" se muestra también en SEQ ID N°: 50. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "e" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hve/CVIDEC se muestran en SEQ ID N°: 51, y la secuencia de aminoácidos de la versión "e" se muestra también en SEQ ID N°: 52.

5 (iv) Construcción de las versiones "f" y "g" de la cadena H humanizada

Las versiones "f" y "g" se generaron sustituyendo la FR3 de la versión "a" con la FR3 derivada de otro anticuerpo humano mediante el uso del método de reordenamiento de FR. Para sustituir la FR3 en la versión "f" con una derivada del anticuerpo humano L04345 (DDBJ, Hillson J L. et al., J. Exp. Med., 178: 331-336, 1993) y para sustituir la FR3 en la versión "g" con una derivada del anticuerpo humano S78322 (DDBJ, Bejcek BE. et al., Cancer Res., 55: 2346-2351, 1995), se sintetizaron dos cebadores que codificaban cada uno la FR3. El cebador de reordenamiento de FR F3SSS (SEQ ID N°: 53) de la versión "f" tiene una secuencia de ADN directa, y F3SSA (SEQ ID N°: 54) tiene una secuencia de ADN inversa, y el extremo 3' de los cebadores tiene una secuencia complementaria de 18 pb.

15 F3CDS (SEQ ID N°: 55) de la versión "g" tiene una secuencia de ADN directa, y F3CDA (SEQ ID N°: 56) tiene una secuencia de ADN inversa, y el extremo 3' de los cebadores tiene una secuencia complementaria de 18 pb. F3SSS, F3SSA, F3CDS, y F3CDA fueron sintetizados y purificados por Pharmacia Biotech. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de la KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki) mediante el uso del tampón adjunto que contenía 5 µl de cada uno de los cebadores de reordenamiento de FR F3SSS y F3SSA 1 µM, o F3CDS y F3CDA, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,0 mM, y 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa en 100 µl de mezcla de reacción, durante 5 ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 minuto, y 74 °C durante 1 minuto. Después de la adición posterior de 100 pmoles de los cebadores exógenos F3PrS y F3PrA, se llevó a cabo la PCR durante 25 ciclos con el mismo ciclo de temperaturas.

25 Los fragmentos de ADN amplificados mediante el método de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 2% (FMC BioProducts). Se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 424 pb, se les añadieron 3 volúmenes (ml/g) de TE, y después se extrajeron con fenol, fenol/cloroformo, y cloroformo para purificar los fragmentos de ADN. Después de precipitar el ADN purificado con etanol, se disolvió un tercio del volumen del mismo en 14 µl de agua. La mezcla de reacción de PCR obtenida se digirió con Ball y NcoI, y se introdujo en el plásmido hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) preparado mediante digestión con Ball y NcoI, y se determinó la secuencia de nucleótidos.

30 Los plásmidos que tenían la secuencia correcta se denominaron hATR5Hvf/CVIDEC y hATR5Hvg/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "f" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvf/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "f" se muestran en SEQ ID N°: 57 y 58. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "g" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvg/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "g" se muestran en SEQ ID N°: 59 y 60.

40 (v) Construcción de la versión "h" de la cadena H humanizada

La versión "h" se generó sustituyendo la FR3 de la versión "a" con la FR3 derivada de otro anticuerpo humano mediante el uso del método de reordenamiento de FR. Para sustituir la FR3 en la versión "h" con otra derivada del anticuerpo humano Z26827 (DDBJ, van Der Stoep et al., J. Exp. Med., 177: 99-107, 1993), se sintetizaron dos cebadores que codificaban cada uno la FR3. El cebador de reordenamiento de FR F3ADS (SEQ ID N°: 61) de la versión "h" tiene una secuencia de ADN directa, y F3ADA (SEQ ID N°: 62) tiene una secuencia de ADN inversa, y el extremo 3' de los cebadores tiene una secuencia complementaria de 18 pb.

45 F3ADS y F3ADA fueron sintetizados y purificados por Pharmacia Biotech. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de la KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki) mediante el uso del tampón adjunto que contenía 5 µl de cada uno de los cebadores de reordenamiento de FR F3ADS y F3ADA 1 µM, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,0 mM, y 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa en 100 µl de mezcla de reacción, durante 5 ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 minuto, y 74 °C durante 1 minuto. Después de la adición posterior de 100 pmoles de los cebadores exógenos F3PrS y F3PrA, se llevó a cabo la PCR durante 25 ciclos con el mismo ciclo de temperaturas. Los fragmentos de ADN amplificados mediante el método de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 2% (FMC BioProducts).

50 Se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 424 pb, se les añadieron 3 volúmenes (ml/g) de TE, y después se extrajeron con fenol, fenol/cloroformo, y cloroformo para purificar los fragmentos de ADN. Después de precipitar el ADN purificado con etanol, se disolvió un tercio del volumen del mismo en 14 µl de agua. La mezcla de reacción de PCR obtenida se digirió con Ball y NcoI, y se introdujo en el plásmido hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) preparado mediante digestión con Ball y NcoI, y se determinó la secuencia de nucleótidos. Los plásmidos que tenían la secuencia correcta se denominaron hATR5Hvh/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "h" de la cadena H humanizada conte-

nida en el plásmido hATR5Hvh/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "h" se muestran en SEQ ID N°: 63. La secuencia de aminoácidos de la versión "h" se muestra en SEQ ID N°: 64.

(vi) Construcción de las versiones "i" y "j" de la cadena H humanizada

Las versiones "i" y "j" se generaron sustituyendo la FR3 de la versión "a" con la FR3 derivada de otro anticuerpo humano mediante el uso del método de reordenamiento de FR. Para sustituir la FR3 en la versión "i" con una derivada del anticuerpo humano U95239 (DDBJ, Manheimer-Lory AAJ., sin publicar) y para sustituir la FR3 en la versión "j" con una derivada del anticuerpo humano L03147 (DDBJ, Collect TA. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10026-10030, 1992), se sintetizaron dos cebadores que codificaban cada uno la FR3. El cebador de reordenamiento de FR F3MMS (SEQ ID N°: 65) de la versión "i" tiene una secuencia de ADN directa, y F3MMA (SEQ ID N°: 66) tiene una secuencia de ADN inversa, y el extremo 3' de los cebadores tiene una secuencia complementaria de 18 pb.

F3BMS (SEQ ID N°: 67) de la versión "j" tiene una secuencia de ADN directa, y F3BMA (SEQ ID N°: 68) tiene una secuencia de ADN inversa, y el extremo 3' de los cebadores tiene una secuencia complementaria de 18 pb. F3MMS, F3MMA, F3BMS, y F3BMA fueron sintetizados y purificados por Pharmacia Biotech. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer) mediante el uso del tampón adjunto que contenía 5 µl de cada uno de los cebadores de reordenamiento de FR F3MMS y F3MMA 1 µM, o F3BMS y F3BMA, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,0 mM, y 2,5 unidades de Ampli Taq Gold en 100 µl de mezcla de reacción, durante 5 ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 minuto, y 74 °C durante 1 minuto. Después de la adición posterior de 100 pmoles de los cebadores exógenos F3PrS y F3PrA, se llevó a cabo la PCR durante 25 ciclos con el mismo ciclo de temperaturas.

Los fragmentos de ADN amplificados mediante el método de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa Nu Sieve GTG al 2% (FMC BioProducts). Se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 424 pb, se les añadieron 3 volúmenes (ml/g) de TE, y después se extrajeron con fenol, fenol/cloroformo, y cloroformo para purificar los fragmentos de ADN. Después de precipitar el ADN purificado con etanol, se disolvió un tercio del volumen del mismo en 14 µl de agua. La mezcla de reacción de PCR obtenida se digirió con Ball y NcoI, y se introdujo en el plásmido hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) preparado mediante digestión con Ball y NcoI, y se determinó la secuencia de nucleótidos.

Los plásmidos que tenían la secuencia correcta se denominaron hATR5Hvi/CVIDEC y hATR5Hvj/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "i" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvi/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "i" se muestran en SEQ ID N°: 69 y 70. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "j" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvj/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "j" se muestran en SEQ ID N°: 71 y 72.

(vii) Construcción de las versiones "b1" y "d1" de la cadena H humanizada

Las versiones "b1" y "d1" se generaron sustituyendo la FR2 de las versiones "b" y "d" con la FR2 derivada de otro anticuerpo humano mediante el uso del método de reordenamiento de FR. Para sustituir la FR2 con una derivada del anticuerpo humano P01742 (SWISS-PROT, Cunningham BA. et al., Biochemistry, 9: 3161-3170, 1970), se sintetizaron dos cebadores de ADN que codificaban cada uno la FR2. El vector de reordenamiento de FR F2MPS (SEQ ID N°: 73) tiene una secuencia de ADN directa, y F2MPA (SEQ ID N°: 74) tiene una secuencia de ADN inversa. También tienen una secuencia complementaria entre sí, y tienen secuencias de reconocimiento de EcoT221 y Ball a ambos extremos.

F2MPS y F2MPA fueron sintetizados y purificados por Pharmacia Biotech. F2MPS y F2MPA se hibridaron, y se digirieron con EcoT221 y Ball. Se introdujeron en los plásmidos hATR5Hvb/CVIDEC (EcoT221/Ball) y hATR5Hvd/CVIDEC (EcoT221/Ball) preparados mediante digestión con EcoT221 y Ball, y se determinó la secuencia de nucleótidos. Los plásmidos que tenían la secuencia correcta se denominaron hATR5Hvb1/CVIDEC y hATR5Hvd1/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "b1" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvb1/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "b1" se muestran en SEQ ID N°: 75 y 76. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "d1" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvd1/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "d1" se muestran en SEQ ID N°: 77 y 78.

(viii) Construcción de las versiones "b3" y "d3" de la cadena H humanizada

Las versiones "b3" y "d3" se generaron sustituyendo la FR2 de las versiones "b" y "d" con la FR2 derivada de otro anticuerpo humano mediante el uso del método de reordenamiento de FR. Para sustituir la FR2 con una derivada del anticuerpo humano Z80844 (DDDJ, Thomsett A R. et al., sin publicar), se sintetizaron dos cebadores que codificaban la FR2. El vector de reordenamiento de FR F2VHS (SEQ ID N°: 79) tiene una secuencia de ADN directa, y F2VHA (SEQ ID N°: 80) tiene una secuencia de ADN inversa. También tienen una secuencia complementaria entre sí, y

tienen secuencias de reconocimiento de EcoT221 y Ball a ambos extremos. La síntesis y la purificación de F2VHS y F2VHA se encomendó a Pharmacia Biotech.

5 F2VHS y F2VHA se hibridaron, y se digirieron con EcoT221 y Ball. Se introdujeron en los plásmidos hATR5Hvb/CVIDEC (EcoT221/Ball) y hATR5Hvd/CVIDEC (EcoT221/Ball) preparados mediante digestión con EcoT221 y Ball, y se determinó la secuencia de nucleótidos. Los plásmidos que tenían la secuencia correcta se denominaron hATR5Hvb3/CVIDEC y hATR5Hvd3/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "b3" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvb3/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "b3" se muestran en SEQ ID N°: 81 y 82. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "d3" de la cadena H humanizada contenida en el plásmido hATR5Hvd3/CVIDEC, y la secuencia de aminoácidos de la versión "d3" se muestran en SEQ ID N°: 83 y 84.

(2) Construcción de una región V de la cadena L de un anticuerpo humanizado

15 (i) Versión "a"

Se generó la región V de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado mediante injerto de CDR mediante el uso del método de PCR. Para la generación de la cadena L (versión "a") de un anticuerpo humanizado que tiene regiones estructurales derivadas del anticuerpo humano Z37332 (DDBJ, Welschof M. et al., J. Immunol. Methods, 179: 203-214, 1995), se usaron siete cebadores de PCR.

20 Los cebadores de injerto de CDR h5Lv1S (SEQ ID N°: 85) y h5Lv4S (SEQ ID N°: 86) tienen una secuencia de ADN directa, los cebadores de injerto de CDR h5Lv2A (SEQ ID N°: 87), h5Lv3A (SEQ ID N°: 88), y h5Lv5A (SEQ ID N°: 89) tienen una secuencia de ADN inversa, y cada cebador tiene secuencias complementarias de 20 pb en ambos extremos. Los cebadores exógenos h5LvS (SEQ ID N°: 90) y h5LvA (SEQ ID N°: 91) tienen homología con los cebadores de injerto de CDR h5Lv1S y h5Lv5A. La síntesis y la purificación de los cebadores de injerto de CDR h5Lv1S, h5Lv4S, h5Lv2A, h5Lv3A, h5Lv5A, h5LvS, y h5LvA se encomendó a Pharmacia Biotech.

30 Las disoluciones de PCR contienen, en 100 µl, Tris-HCl 120 mM (pH 8,0), KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 6 mM, 0,1% de Triton X-100, 0,001% de BSA, dNTPs 0,2 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), MgCl₂ 1 mM, 2,5 unidades de KOD ADN polimerasa (Toyo Boseki), 50 pmoles de los cebadores de injerto de CDR h5Lv1S, h5Lv2A, h5Lv3A, h5Lv4S, y h5Lv5A.

35 La PCR se llevó a cabo mediante el uso del termociclador de ADN 480 (Perkin-Elmer) durante 5 ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 1 minuto para construir 5 cebadores de injerto de CDR. Tras la adición posterior de 100 pmoles de los cebadores exógenos h5LvS y h5LvA a la mezcla de reacción, se llevó a cabo la PCR durante 30 ciclos con un ciclo de temperaturas de 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 1 minuto para amplificar los fragmentos de ADN construidos.

40 La mezcla reacción de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 3% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 400 pb. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, y los fragmentos de ADN se recuperaron mediante precipitación con etanol. Los fragmentos de ADN recuperados se digirieron con las enzimas de restricción SpI (Takara Shuzo) y BgIII (Takara Shuzo) a 37 °C durante 4 horas. La mezcla de digestión se extrajo con fenol y cloroformo, y tras la precipitación con etanol de los fragmentos de ADN, se disolvieron en 10 µl de TE. El fragmento de ADN SpI-BgIII preparado como se mencionó anteriormente que codificaba la región V de la cadena L humanizada y el vector CVIDEC preparado digiriendo con SpI y BgIII se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante una reacción a 16 °C durante 1 hora siguiendo las instrucciones adjuntas con el equipo.

50 La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C. Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con el medio de agar LBA y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*. El transformante se cultivó durante la noche en 3 ml del medio LBA, y a partir de las fracciones celulares, se preparó un plásmido de ADN mediante el uso del equipo QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN).

60 Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región codificante del cADN en el plásmido mediante el uso del equipo Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Perkin-Elmer) mediante el secuenciador de ADN 373A (Perkin-Elmer). Como cebadores de secuenciación, se usaron el cebador de M13 M4 (Takara Shuzo) y el cebador de M13 RV (Takara Shuzo), y se determinó la secuencia confirmando la secuencia de nucleótidos en ambas direcciones. El plásmido que contiene el gen que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo humanizado y el que tiene una secuencia de reconocimiento de BgIII y la secuencia consenso de Kozak en el extremo 5', y una secuencia de reconocimiento de SpI en el extremo 3' se denominó hATR5Lva/CVIDEC. La secuencia de nucleótidos

(que incluye la secuencia de aminoácidos correspondiente) de la versión "a" de la cadena L humanizada se muestra en SEQ ID N°: 92. La secuencia de aminoácidos de la versión "a" se muestra también en SEQ ID N°: 93.

(ii) Versiones "b" y "c"

Se generaron las versiones "b" y "c" sustituyendo (reordenamiento de FR) la FR3 de la versión "a". Para la versión "b", se usó la FR3 derivada del anticuerpo humano S68699 (DDBJ, Hougs L. et al., Exp. Clin. Immunogen, 10: 141-151, 1993), y para la versión "c" se usó la FR3 derivada del anticuerpo humano P01607 (SWISS-PROT, Epp O et al., Biochemistry, 14:4943-4952, 1975), respectivamente.

Los cebadores F3SS (SEQ ID N°: 94) y F3SA (SEQ ID N°: 95) que codifican la FR3 de la versión "b", o los cebadores F3RS (SEQ ID N°: 96) y F3RA (SEQ ID N°: 97) que codifican la FR3 de la versión "c" tienen complementariedad de secuencias entre sí, y tienen las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción KpnI y PstI en ambos extremos. La síntesis y la purificación de F3SS, F3SA, F3RS, y F3RA se encomendó a Pharmacia Biotech. Se hibridaron 100 pmoles de cada uno de F3SS y F3SA, o F3RS y F3RA, mediante tratamiento a 96 °C durante 2 minutos y a 50 °C durante 2 minutos, y se generaron los fragmentos de ADN bicatenarios.

Estos fragmentos de ADN bicatenarios se digirieron con la enzima de restricción KpnI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora, y después con la enzima de restricción PstI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de digestión se extrajo con fenol y cloroformo, y después se precipitó con etanol, y se disolvió en TE.

El plásmido hATR5Lva/CVIDEC se digirió con la enzima de restricción KpnI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora, y después con la enzima de restricción PstI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 1,5% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 3000 pb. La tira de agarosa se extrajo con fenol y cloroformo, y después los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y se disolvieron en TE.

El fragmento de ADN KpnI-PstI preparado como se mencionó anteriormente que codificaba la FR3 de las versiones "b" o "c" y el vector hATR5Lva/CVIDEC en el que se eliminó la FR3 mediante digestión con KpnI y PstI se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante reacción a 16 °C durante 1 hora según las instrucciones adjuntas con el equipo.

La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42 °C. Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con el medio de agar LBA y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*. El transformante se cultivó durante la noche en 3 ml del medio LBA, y a partir de las fracciones celulares, se preparó un plásmido de ADN mediante el uso del equipo QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN).

Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región codificante del cADN en el plásmido mediante el uso del equipo Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Perkin-Elmer) mediante el secuenciador de ADN 373A (Perkin-Elmer). Como cebadores de secuenciación, se usaron el cebador de M13 M4 (Takara Shuzo) y el cebador de M13 RV (Takara Shuzo), y se determinó la secuencia confirmando la secuencia de nucleótidos en ambas direcciones.

Los plásmidos que contenían el gen que codifica las versiones "b" o la versión "c" en las que se sustituyó la FR3 de la versión "a" de la cadena L del anticuerpo humanizado se denominaron hATR5Lvb/CVIDEC o hATR5Lvc/CVIDEC, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "b" de la cadena L humanizada contenida en el plásmido hATR5Lvb/CVIDEC y la secuencia de aminoácidos de la versión "b" se muestran en SEQ ID N°: 98 y 99. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "c" de la cadena L humanizada contenida en el plásmido hATR5Lvc/CVIDEC y la secuencia de aminoácidos de la versión "c" se muestran en SEQ ID N°: 100 y 101.

(iii) Versiones "b1" y "b2"

Se generaron las versiones "b1" y "b2" sustituyendo la FR2 de la versión "b". Para la versión "b1" se usó la FR2 derivada del anticuerpo humano S65921 (DDBJ, Tonge DW et al., Immunol., 7:56-62, 1993), y para la versión "b2" se usó la FR2 derivada del anticuerpo humano X93625 (DDBJ, Cox J P et al., Eur. J. Immunol., 24:827-836, 1994), respectivamente.

Los cebadores F2SS (SEQ ID N°: 102) y F2SA (SEQ ID N°: 103) que codifican la FR2 de la versión "b1", o los cebadores F2XS (SEQ ID N°: 104) y F2XA (SEQ ID N°: 105) que codifican la FR2 de la versión "b2" tienen complementariedad de secuencias entre sí, y tienen las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción AflII y SpeI en ambos extremos. F2SS, F2SA, F2XS, y F2XA fueron sintetizados por Pharmacia Biotech. Se hibridaron 100

pmoles de cada uno de F2SS y F2SA, o F2XS y F2XA, mediante tratamiento a 96 °C durante 2 minutos y a 50 °C durante 2 minutos, y se generaron los fragmentos de ADN bicatenarios.

5 Estos fragmentos de ADN bicatenarios se digirieron con las enzimas de restricción AflII (Takara Shuzo) y SpeI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de digestión se extrajo con fenol y cloroformo, y después los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y se disolvieron en TE.

10 El plásmido hATR5Lv/CVIDEC se digirió con las enzimas de restricción AflII (Takara Shuzo) y SpeI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 1 hora. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 1,5% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 3000 pb. La tira de agarosa se extrajo con fenol y cloroformo, y después los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y se disolvieron en TE.

15 El fragmento de ADN AflII-SpeI preparado como se mencionó anteriormente que codificaba la FR2 de las versiones "b1" o "b2" y el vector hATR5Lv/CVIDEC en el que se eliminó la FR2 mediante digestión con AflII y SpeI se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante reacción a 16 °C durante 1 hora según las instrucciones adjuntas con el equipo.

20 La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C. Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con el medio de agar LBA y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*. El transformante se cultivó durante la noche a 37 °C en 4 ml del medio LBA, y a partir de las fracciones celulares, se preparó un plásmido de ADN mediante el uso del equipo QIAprep Spin Plasmid (QIAGEN).

25 Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región codificante del cADN en el plásmido mediante el uso del equipo Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction (Perkin-Elmer) mediante el secuenciador de ADN 373A (Perkin-Elmer). Como cebadores de secuenciación, se usaron el cebador de M13 M4 (Takara Shuzo) y el cebador de M13 RV (Takara Shuzo), y se determinó la secuencia confirmando la secuencia de nucleótidos en ambas direcciones.

35 Los plásmidos que contenían el gen que codifica las versiones "b1" o "b2" en las que se sustituyó la FR2 de la versión "b" de la cadena L del anticuerpo humanizado se denominaron hATR5Lv1/CVIDEC y hATR5Lv2/CVIDEC, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "b1" de la cadena L humanizada contenida en el plásmido hATR5Lv1/CVIDEC y la secuencia de aminoácidos de la versión "b1" se muestran en SEQ ID N°: 106 y 107. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la versión "b2" de la cadena L humanizada contenida en el plásmido hATR5Lv2/CVIDEC y la secuencia de aminoácidos de la versión "b2" se muestran en SEQ ID N°: 108 y 109.

40 (3) Construcción del vector de expresión del anticuerpo humanizado

(i) Combinación de la cadena H humanizada y la cadena L quimérica

45 El plásmido hATR5Hva/CVIDEC que contenía una región V de la cadena H se digirió con NheI y Sall, y se recuperó un fragmento de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujo en chATR5/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión de chATR5/N5KG4P, un vector plasmídico de expresión del anticuerpo chATR-5, con NheI y Sall. El plásmido así generado se denominó hHva-chLv/N5KG4P.

50 El plásmido hATR5Hvb/CVIDEC que contenía una región V de la cadena H se digirió con NheI y Sall, y se recuperó un fragmento de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujo en chATR5/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión de chATR5/N5KG4P, un vector plasmídico de expresión del anticuerpo chATR-5, con NheI y Sall. El plásmido así generado se denominó hHvb-chLv/N5KG4P.

55 Los plásmidos hATR5Hvc/CVIDEC, hATR5Hvd/CVIDEC, y hATR5Hve/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y se recuperaron los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujeron en chATR5/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión de chATR5/N5KG4P, un vector plasmídico de expresión del anticuerpo chATR-5, con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvc-chLv/N5KG4P, hHvd-chLv/N5KG4P, y hHve-chLv/N5KG4P.

60 Los plásmidos hATR5Hvf/CVIDEC y hATR5Hvh/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y se recuperaron los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujeron en chATR5/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión de chATR5/N5KG4P, un vector plasmídico de expresión del anticuerpo chATR-5, con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvf-chLv/N5KG4P y hHvh-chLv/N5KG4P.

65

Los plásmidos hATR5Hvi/CVIDEC y hATR5Hvj/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y se recuperaron los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujeron en chATR5/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión de chATR5/N5KG4P, un vector plasmídico de expresión del anticuerpo chATR-5, con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvi-chLv/N5KG4P y hHvj-chLv/N5KG4P.

Los plásmidos hATR5Hb1/CVIDEC y hATR5Hvd1/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y se recuperaron los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujeron en chATR5/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión de chATR5/N5KG4P, un vector plasmídico de expresión del anticuerpo chATR-5, con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvb1-chLv/N5KG4P y hHvd1-chLv/N5KG4P.

(ii) Combinación de la cadena L humanizada y la cadena H quimérica

Mediante el uso de un vector de expresión de anticuerpos N5KG4P, se combinó con una cadena H quimérica y se expresó, y se estudió la cadena L humanizada.

Los plásmidos hATR5Lva/CVIDEC, hATR5Lvb/CVIDEC, hATR5Lvc/CVIDEC, hATR5Lvb1/CVIDEC, y hATR5Lvb2/CVIDEC se digirieron con las enzimas de restricción BglII (Takara Shuzo) y SplI (Takara Shuzo) a 37 °C durante 2-3 horas. La mezcla de digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa con el uso de una agarosa NuSieve GTG al 1,5% o 2% (FMC BioProducts), y se cortaron las tiras de agarosa que contenían fragmentos de ADN de una longitud de alrededor de 400 pb. Las tiras de agarosa se extrajeron con fenol y cloroformo, y después los fragmentos de ADN se precipitaron con etanol, y se disolvieron en TE.

El fragmento de ADN SplI-BglII que contenía el gen que codifica la región V de la cadena L humanizada de cada una de estas versiones y el hATR5Hv/N5KG4P digerido con SplI y BglII se ligaron mediante el uso del equipo de ligadura de ADN ver.2 (Takara Shuzo) mediante reacción a 16 °C durante 1 hora según las instrucciones adjuntas con el equipo.

La mezcla de ligadura se añadió a 100 µl de células competentes de *E. coli* JM109 (Nippongene) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo y durante 1 minuto a 42° C. Después, se le añadieron 300 µl del caldo Hi-Competence (Nippongene), se incubó a 37 °C durante 1 hora, y después las *E. coli* se colocaron en placas con el medio de agar LBA y se incubaron durante la noche a 37 °C para obtener un transformante de *E. coli*.

El transformante se cultivó durante la noche a 37 °C en 250 ml o 500 ml del medio LBA, y a partir de las fracciones celulares, se preparó ADN plasmídico mediante el uso del equipo Plasmid Maxi (QIAGEN). Los plásmidos en los que se introdujo un gen que codificaba la cadena H quimérica y la cadena L humanizada se denominaron chHv-hLva/N5KG4P, chHv-hLvb/N5KG4P, chHv-hLvc/N5KG4P, chHv-hLvb1/N5KG4P, y chHv-hLvb2/N5KG4P.

(iii) Combinación de la cadena H humanizada y la cadena L humanizada

El plásmido hATR5Hva/CVIDEC que contenía una región V de la cadena H se digirió con NheI y Sall, y se recuperó un fragmento de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujo en hLva/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante la digestión del plásmido chHv-hLva/N5KG4P que contenía la secuencia de cADN de la versión "a" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado con NheI y Sall. El plásmido así generado se denominó hHva-hLva/N5KG4P.

Los plásmidos hATR5Hvb/CVIDEC y hATR5Hvc/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y se recuperaron los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujeron en hLva/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante la digestión del plásmido chHv-hLva/N5KG4P que contenía la secuencia de cADN de la versión "a" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvb-hLva/N5KG4P y hHvc-hLva/N5KG4P.

Los plásmidos hATR5Hvb/CVIDEC, hATR5Hvd/CVIDEC, y hATR5Hve/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada se recuperaron y se introdujeron en hLvb/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión del plásmido chHv-hLvb/N5KG4P que contenía la secuencia de cADN de la versión "b" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvb-hLvb/N5KG4P, hHvd-hLvb/N5KG4P, y hHve-hLvb/N5KG4P.

Los plásmidos hATR5Hvf/CVIDEC, hATR5Hvg/CVIDEC, y hATR5Hvh/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada se recuperaron y se introdujeron en hLvb/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión del plásmido chHv-hLvb/N5KG4P que contenía la secuencia de cADN de la versión "b" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humani-

zados con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvf-hLvb/N5KG4P, hHvg-hLvb/N5KG4P, y hHvh-hLvb/N5KG4P.

5 Los plásmidos hATR5Hvi/CVIDEC y hATR5Hvj/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y se recuperaron los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujeron en hLvb/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante la digestión del plásmido chHv-hLvb/N5KG4P que contenía la secuencia de cADN de la versión "b" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvi-hLvb/N5KG4P y hHvj-hLvb/N5KG4P.

10 Los plásmidos hATR5Hvb1/CVIDEC y hATR5Hvd1/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y se recuperaron los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujeron en hLvb/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante la digestión del plásmido chHv-hLvb/N5KG4P que contenía la secuencia de cADN de la versión "b" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvb1-hLvb/N5KG4P y hHvd1-hLvb/N5KG4P.

15 Los plásmidos hATR5Hvb3/CVIDEC y hATR5Hvd3/CVIDEC que contenían una región V de la cadena H se digirieron con NheI y Sall, y se recuperaron los fragmentos de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujeron en hLvb/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante la digestión del plásmido chHv-hLvb/N5KG4P que contenía la secuencia de cADN de la versión "b" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvb3-hLvb/N5KG4P y hHvd3-hLvb/N5KG4P.

20 El plásmido hATR5Hvb/CVIDEC que contenía una región V de la cadena H se digirió con NheI y Sall, y se recuperó un fragmento de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujo en hLvb1/N5KG4P (Sall/NheI) y hLvb2/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión de los plásmidos chHv-hLvb1/N5KG4P y chHv-hLvb2/N5KG4P que contenían la secuencia de cADN de las versiones "b1" y "b2" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvb-hLvb1/N5KG4P y hHvb-hLvb2/N5KG4P.

25 El plásmido hATR5Hvi/CVIDEC que contenía una región V de la cadena H se digirió con NheI y Sall, y se recuperó un fragmento de cADN de la región V de la cadena H humanizada y se introdujo en hLvb1/N5KG4P (Sall/NheI) y hLvb2/N5KG4P (Sall/NheI) preparado mediante digestión de los plásmidos chHv-hLvb1/N5KG4P y chHv-hLvb2/N5KG4P que contenían la secuencia de cADN de las versiones "b1" y "b2" de la cadena L del anticuerpo ATR-5 humanizado con NheI y Sall. Los plásmidos así generados se denominaron hHvi-hLvb1/N5KG4P y hHvi-hLvb2/N5KG4P.

35 (4) Transfección en células COS-7

Para estudiar la actividad de unión al antígeno y la actividad neutralizante del anticuerpo humanizado, el anticuerpo anterior se expresó de manera transitoria en células COS-7.

40 El vector de expresión plasmídico construido se transdujo en células COS-7 mediante electroporación con el uso del instrumento Gene Pulser (Bio-Rad). Se añadieron 50 µg o 20 µg del plásmido a 0,78 ml de células COS-7 suspendidas en PBS a una concentración celular de 1×10^7 células/ml, que se sometieron a pulsos de 1.500 V y 25 µF de capacidad.

45 Después de 10 minutos de período de recuperación a temperatura ambiente, las células sometidas a electroporación se suspendieron en un medio DMEM (GIBCO) que contenía un 5% de suero bovino fetal Ultra Low IgG (GIBCO), y se cultivaron mediante el uso de una placa de cultivo de 10 cm o una placa de cultivo de 15 cm en un incubador con un 5% de CO₂. Después de cultivar durante 24 horas, se aspiró el sobrenadante del cultivo, y después se añadió un medio HBCHO exento de suero (Irvine Scientific). Después de cultivar posteriormente durante 72 horas o 96 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo y se centrifugó para eliminar los restos celulares.

(5) Purificación del anticuerpo

55 A partir del sobrenadante del cultivo de las células COS-7, el anticuerpo se purificó mediante el uso del equipo AffiGel Protein A MAPSII (Bio-Rad) o de rProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech). La purificación mediante el uso del equipo AffiGel Protein A MAPSII se llevó a cabo según las instrucciones adjuntas con el equipo. La purificación mediante el uso de rProtein A Sepharose Fast Flow se llevó a cabo como sigue:

60 Se colocó un ml de rProtein A Sepharose Fast Flow en una columna, y la columna se equilibró con 10 volúmenes de TBS. El sobrenadante del cultivo de células COS-7 se aplicó a la columna equilibrada, que después se lavó con 10 volúmenes de TBS. La fracción de anticuerpo adsorbido se eluyó mediante 13,5 ml de HCl 2,5 mM (pH 3,0). El eluato se neutralizó añadiendo 1,5 ml de Tris-HCl 1 M (pH 8,0).

Llevando a cabo una ultrafiltración dos o tres veces para la fracción de anticuerpo purificado mediante el uso de Centriprep 30 ó 100 (amicon), se sustituyó el disolvente por TBS, y finalmente se concentró hasta alrededor de 1,5 ml.

5 Ejemplo 4. Cuantificación del anticuerpo y determinación de la actividad

(1) Medida de la concentración de anticuerpo mediante ELISA

10 Se prepararon placas de ELISA para la medida de la concentración del anticuerpo como sigue: Cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos (Maxisorp, NUNC) se inmovilizó mediante 100 µl de anticuerpo anti-IgGy humana de cabra (BIO SOURCE) preparado a una concentración de 1 µg/ml en el tampón de inmovilización (NaHCO₃ 0,1 M, 0,02% de NaN₃, pH 9,6) (denominado más adelante en la presente memoria CB). Después de bloquear con 200 µl del tampón de dilución (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0,1 M, 0,05% de Tween 20, 0,02% de NaN₃, 1% de albúmina de suero bovino (BSA), pH 8,1) (denominado más adelante en la presente memoria DB), el sobrenadante del cultivo de las células COS-7 en el que se expresó el anticuerpo o en el que se purificó el anticuerpo se diluyó en serie con DB, y después se añadió a cada pocillo.

20 Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora seguido por el lavado con PBS Dulbecco que contenía un 0,05% de Tween 20 (denominado más adelante en la presente memoria RB), se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-IgGy humana de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (Biosource) que se diluyó 1000 veces con DB. Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora seguido de lavado con RB, se añadió Sigma104 (fosfato de p-nitrofenilo, SIGMA) disuelto en el tampón de sustrato (NaHCO₃ 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9,8) a 1 mg/ml, y después se midió la absorbancia a 405/655 nm mediante el uso de un lector de microplacas (Bio-Rad). Como patrón para la medida de la concentración se usó IgG4k (Binding Site).

25

(2) Medida de la actividad de unión al antígeno

30 Las placas de ELISA de células para la medida de la unión al antígeno se prepararon como sigue. Las células usadas fueron células J82 de carcinoma de vejiga humana (ATCC HTB-1). Se inocularon 1 x 10⁵ células J82 en 60 pocillos de una placa de cultivo de células de 96 pocillos. Esto se cultivó (medio RPMI1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal (GIBCO)) durante un día en un incubador de CO₂ para permitir que las células se uniesen a la placa. Después de desechar el líquido de cultivo, cada pocillo se lavó dos veces con 300 µl de PBS. Se añadieron 100 µl de PBS que contenía un 4% de paraformaldehído (denominado más adelante en la presente memoria PFA/PBS) a cada pocillo, y se colocaron en hielo durante 10 minutos para inmovilizar las células.

35 Se desechó el PFA/PBS, y cada pocillo se lavó dos veces con 300 µl de PBS, y después se bloqueó con 250 µl de DB. El sobrenadante del cultivo o el anticuerpo purificado se diluyó en serie con DB, 100 µl del cual se añadió a cada pocillo. Después de incubar a temperatura ambiente durante 2 horas seguido de lavado con RB, se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-IgGy humana de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (BioSource) diluido 1000 veces con DB. Después de incubar durante 1 hora seguido de lavado con RB, se añadió la disolución de sustrato, y después se midió la absorbancia a 405/655 nm mediante el uso del lector de microplacas (Bio-Rad).

40

(3) Medida de la actividad neutralizante

45 La actividad neutralizante de un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, y un anticuerpo humanizado se midió con la actividad de inhibición de la actividad de producción de Factor Xa mediante tromboplastina derivada de placenta humana, Thromborel S (Boehringer AG), como índice. Así, se añadieron 60 µl del tampón (TBS que contenía CaCl₂ 5 mM y un 0,1% de BSA) a 10 µl de 1,25 mg/ml de Thromborel S y 10 µl de un anticuerpo diluido de manera adecuada, que después se incubó en una placa de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 1 hora. Se le añadieron 10 µl de 3,245 µg/ml de Factor X humano (Celsus Laboratories) y 82,5 ng/ml de Factor VIIa humano (Enzyme Research), y después se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora más.

50 Se añadieron 10 µl de EDTA 0,5 M para parar la reacción, a la cual se le añadieron 50 µl de la disolución de sustrato cromogénico y se determinó la absorbancia a 405/655 nm mediante el uso del lector de microplacas (Bio-Rad). Después de hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, se determinó de nuevo la absorbancia a 405/655 nm. La actividad neutralizante se puede determinar calculando la actividad residual (%) de cada cambio de absorbancia con el cambio de absorbancia cada hora sin adición de anticuerpo como una actividad del 100%.

55 La disolución de sustrato cromogénico se preparó disolviendo el sustrato cromogénico S-2222 de Testzyme (Chromogenix) según las instrucciones adjuntas, diluyendo 2 veces con agua purificada y después mezclando con una disolución de polibreno (0,6 mg/ml de bromuro de hexadimetileno, SIGMA) a 1:1.

60

(4) Evaluación de la actividad

65 (i) Combinación de la versión "a" de la cadena H humanizada y de la cadena L quimérica

Se generó un anticuerpo (a-ch) que es la versión "a" de la cadena H humanizada combinada con una cadena L quimérica, y se ensayó la actividad de unión al antígeno mediante el ELISA de células. Se descubrió que la cantidad unida al antígeno disminuía a la concentración elevada (Figura 1). La actividad neutralizante hacia el antígeno mediante la inhibición de la producción de FXa fue débil en comparación con la del anticuerpo quimérico de control positivo (ch-ch) (Figura 2). Por lo tanto, se decidió llevar a cabo la siguiente versión de la cadena H humanizada mediante reordenamiento de FR. El anticuerpo quimérico usado en la presente memoria fue el que se expresaba en células COS-7, se purificó y se estudió.

(ii) Combinación de la versión "a" de la cadena L humanizada y una cadena H quimérica

Se generó un anticuerpo (ch-a) que es la versión "a" de la cadena L humanizada combinada con una cadena H quimérica, y se ensayó la actividad de unión al antígeno mediante el ELISA de células. Se descubrió que tenía una actividad de unión igual o mayor que la del anticuerpo quimérico (Figura 1). Por otra parte, la actividad neutralizante hacia el antígeno fue débil en comparación con la del anticuerpo quimérico de control positivo (Figura 2). Por lo tanto, se decidió llevar a cabo la siguiente versión de la cadena L humanizada mediante reordenamiento de FR. El anticuerpo quimérico usado en la presente memoria fue el que se expresaba en células COS-7, se purificó y se estudió.

(iii) Combinación de la versión "a" de la cadena H humanizada y la versión "a" de la cadena L humanizada

Se generó un anticuerpo (a-a) que es la versión "a" de la cadena H humanizada combinada con la versión "a" de la cadena L humanizada, y se ensayó la actividad de unión al antígeno mediante el ELISA de células. Se descubrió que la cantidad unida al antígeno disminuía en el lado de concentración elevada (Figura 3). La actividad neutralizante hacia el antígeno mediante la inhibición de la producción de FXa fue débil en comparación con la del anticuerpo quimérico de control positivo (Figura 4). Por lo tanto, se decidió llevar a cabo la siguiente versión de la cadena H y de la cadena L humanizadas mediante reordenamiento de FR. El anticuerpo quimérico usado en la presente memoria fue el que se expresaba en células COS-7, se purificó y se estudió.

(iv) Combinación de las versiones "b", "c", y "d" de la cadena H humanizada y una cadena L quimérica

Se generaron los anticuerpos ("b-ch", "c-ch", y "d-ch", respectivamente) que son la cadena H humanizada sometida la siguiente versión mediante reordenamiento de FR combinada con una cadena L quimérica, y se ensayó la actividad de unión al antígeno mediante ELISA de células. "d-ch" exhibió una actividad de unión igual a la del anticuerpo quimérico, y "b-ch" y "c-ch" exhibieron una actividad de unión ligeramente menor (Figuras 5 y 6). Por otra parte, la actividad neutralizante hacia el antígeno en comparación con la del anticuerpo quimérico de control positivo fue casi igual en "b-ch", y ligeramente débil en "d-ch". En la versión "c-ch", fue significativamente más débil que la del anticuerpo quimérico (Figura 7). Por lo tanto, las versiones "b" y "d" de la cadena H humanizada se consideraron las de la cadena H humanizada que exhibían una actividad elevada.

(v) Combinación de la versión "b" de la cadena H humanizada y la versión "a" de la cadena L humanizada

Se generó un anticuerpo (b-a) que es la versión "b" de la cadena H humanizada sometida a la siguiente versión mediante reordenamiento de FR combinada con la versión "a" de la cadena L humanizada, y se ensayó la actividad de unión al antígeno mediante el ELISA de células. Se descubrió que la cantidad unida al antígeno disminuía a la concentración elevada (Figura 5). Por otra parte, la actividad neutralizante hacia el antígeno fue significativamente débil en comparación con la del anticuerpo quimérico de control positivo (Figura 8). Por lo tanto, "b-a" y "a-a" son las que exhiben una actividad elevada. El anticuerpo quimérico usado en la presente memoria fue el que se expresaba en células COS-7, se purificó y se estudió.

(vi) Combinación de las versiones "b" y "c" de la cadena L humanizada, y una cadena H quimérica

Se generaron los anticuerpos ("ch-b" y "ch-c", respectivamente) que son las versiones "b" y "c" de la cadena L humanizada combinadas con una cadena H quimérica, y se descubrió que ambos tenían la misma actividad de unión al antígeno y la misma actividad neutralizante hacia el antígeno que el anticuerpo quimérico (Figuras 9 y 10). Por lo tanto, se eligieron las versiones "b" y "c" como candidatos para una cadena L de un anticuerpo humanizado. Se considera que la versión "b" derivada de un anticuerpo de ratón que tiene un aminoácido menos en el número de residuos de aminoácidos es superior a la versión "c" en cuanto a la antigenicidad. El anticuerpo quimérico usado en la presente memoria fue el que se expresó en las células CHO DG44, se purificó y se estudió. En el estudio más adelante en la presente memoria se usó el anticuerpo como control positivo.

(vii) Combinación de la versión "b" de la cadena H humanizada y las versiones "b" y "c" de la cadena L humanizada

Se generaron los anticuerpos ("b-b" y "b-c", respectivamente) que son la versión "b" de la cadena H humanizada combinada con las versiones "b" y "c" de la cadena L humanizada, y se ensayó la actividad de unión al antígeno y la

actividad neutralizante hacia el antígeno. Ambos tuvieron una actividad ligeramente menor que la del anticuerpo quimérico tanto en la actividad de unión como en la actividad neutralizante (Figuras 11 y 12).

(viii) Combinación de las versiones "b" y "d" de la cadena H humanizada, y la versión "b" de la cadena L humanizada

Se generaron los anticuerpos ("b-b" y "d-b", respectivamente) que son la cadena H humanizada sometida a la siguiente versión mediante reordenamiento de FR combinada con la versión "b" de la cadena L humanizada, y se ensayó la actividad de unión al antígeno mediante el ELISA de células. "d-b" exhibieron una actividad de unión igual a la del anticuerpo quimérico, y "b-b" exhibieron una actividad de unión ligeramente menor a la concentración elevada (Figura 13). Por otra parte, la actividad neutralizante hacia el antígeno en comparación con la del anticuerpo quimérico de control positivo fue ligeramente baja en "b-b", y significativamente débil en "d-b" (Figura 14). Por lo tanto, se demostró que "b-b" es una versión con una elevada actividad neutralizante, mientras "d-b" es una versión con una elevada actividad de unión.

(ix) Combinación de la versión "e" de la cadena H humanizada, y una cadena L quimérica y la versión "b" de la cadena L humanizada

Se generaron los anticuerpos ("e-ch" y "e-b", respectivamente) que son la versión "e" de la cadena L humanizada combinada con una cadena L quimérica y la versión "b" humanizada. "e-ch" exhibió una actividad de unión hacia el antígeno igual a la del anticuerpo quimérico, pero en "e-b" la cantidad de anticuerpo expresado fue muy pequeña, y se perdió la mayor parte de la actividad de unión (Figura 15). La actividad neutralizante hacia el antígeno de "e-ch" fue significativamente baja en comparación con la del anticuerpo quimérico (Figura 16). Por lo tanto, se concluyó que la versión "e" de la cadena H combinada con la versión "b" de la cadena L no funcionó bien.

(x) Combinación de las versiones "f", "g", y "h" de la cadena H humanizada, y la versión "b" de la cadena L humanizada

Se generaron los anticuerpos ("f-b", "g-b", y "h-b", respectivamente) que son las versiones "f", "g", y "h" de la cadena H humanizada combinadas con la versión "b" de la cadena L humanizada. En los anticuerpos "f-b" y "h-b", la cantidad de anticuerpo expresada fue muy pequeña. Para las versiones "f" y "h", se generaron anticuerpos combinados con la cadena L quimérica, pero no se expresaron. "g-b" alcanzó la saturación a una concentración baja, y exhibió una actividad de unión más débil que la del anticuerpo quimérico (Figura 17). La actividad neutralizante hacia el antígeno de "g-b" fue significativamente débil en comparación con la del anticuerpo quimérico (Figura 18).

(xi) Combinación de las versiones "b1" y "d1" de la cadena H humanizada, y la versión "b" de la cadena L humanizada

Se generaron los anticuerpos ("b1-b" y "d1-b", respectivamente) que son las versiones "b1" y "d1" de la cadena H humanizada combinadas con la versión "b" de la cadena L humanizada. Casi no se expresó anticuerpo en ninguno de ellos. Para éstos, se generaron anticuerpos combinados con una cadena L quimérica, pero no se expresaron.

(xii) Combinación de las versiones "b3" y "d3" de la cadena H humanizada, y la versión "b" de la cadena L humanizada

Se generaron los anticuerpos ("b3-b" y "d3-b", respectivamente) que son las versiones "b3" y "d3" de la cadena H humanizada combinadas con la versión "b" de la cadena L humanizada. La actividad de unión al antígeno de "d3-b" fue ligeramente más baja que la del anticuerpo quimérico, y la de "b3-b" fue mucho más baja (Figura 19). La actividad neutralizante hacia el antígeno de "b3-b" fue mayor que la de "b-b", pero fue menor que la del anticuerpo quimérico, y "d3-b" y "b-b" tuvieron la misma actividad (Figura 20).

(xiii) Combinación de las versiones "i" y "j" de la cadena H humanizada, y una cadena L quimérica y la versión "b" de la cadena L humanizada

Se generaron los anticuerpos ("i-ch" y "j-ch", respectivamente) que son las versiones "i" y "j" de la cadena H humanizada combinadas con una cadena L quimérica, y los anticuerpos ("i-b" y "j-b", respectivamente) combinados con la versión "b" de la cadena L humanizada, y se ensayó la actividad de unión al antígeno y la actividad neutralizante hacia el antígeno. La actividad de unión de cualquiera de los anticuerpos fue casi igual a la del anticuerpo quimérico (Figuras 21 y 22). "i-ch" exhibió una actividad neutralizante mayor que la del anticuerpo quimérico, y "j-ch" fue significativamente menor que la del anticuerpo quimérico (Figura 23). "i-b" exhibió una actividad neutralizante igual a la del anticuerpo quimérico, y "j-b" exhibió una actividad neutralizante significativamente más débil que la del anticuerpo quimérico (Figura 24).

(xiv) Las versiones "b1" y "b2" de la cadena L humanizada

Cuando se generaron los anticuerpos ("ch-b1" y "ch-b2", respectivamente) que son las versiones "b1" y "b2" de la cadena L humanizada combinadas con una cadena H quimérica, ambos exhibieron una actividad de unión al antígeno igual a la del anticuerpo quimérico (Figura 25). Para la actividad neutralizante hacia el antígeno, "ch-b1" exhibió una actividad de unión igual a la del anticuerpo quimérico, mientras "ch-b2" exhibió una actividad ligeramente mayor que la del anticuerpo quimérico a la concentración elevada (Figura 26). Las versiones "b1" y "b2" pueden ser candidatos para una cadena L de un anticuerpo humanizado, pero "b2" es superior ya que tiene una actividad más intensa.

(xv) Combinación de la versión "b" de la cadena H humanizada y la versión "b2" de la cadena L humanizada

Se generó un anticuerpo ("b-b2") que es la versión "b" de la cadena H humanizada combinada con la versión "b2" de la cadena L humanizada, y se ensayó la actividad de unión al antígeno y la actividad neutralizante hacia el antígeno. La actividad de unión fue ligeramente menor que la del anticuerpo quimérico (Figura 27). La actividad neutralizante, aunque ligeramente mayor que la de "b-b", fue menor que la de "i-b" (Figura 28).

(xvi) Combinación de la versión "i" de la cadena H humanizada y la versión "b1" o "b2" de la cadena L humanizada

Se generaron los anticuerpos ("i-b1" y "i-b2", respectivamente) que son la versión "i" de la cadena H humanizada combinada con la versión "b1" o "b2" de la cadena L humanizada, y se ensayó la actividad de unión al antígeno y la actividad neutralizante hacia el antígeno. La actividad de unión de "i-b2" fue casi igual a la del anticuerpo quimérico, y la de "i-b1" fue ligeramente menor que la del anticuerpo quimérico (Figura 29). La actividad neutralizante de "i-b1" y "i-b2" fue mayor que la del anticuerpo quimérico y "i-b", que estaba en un orden decreciente de "i-b2" > "i-b1" (Figura 30).

Ejemplo 5. Preparación de células CHO que producen un anticuerpo humanizado y estudio de su actividad

(1) Establecimiento de una línea celular que produce de manera estable un anticuerpo

Para establecer líneas celulares que producen de manera estable un anticuerpo humanizado (b-b, i-b, e i-b2), se introdujo un vector de expresión génica de anticuerpo en células CHO (DG44) aclimatadas en un medio exento de suero.

El ADN plasmídico, hHvb-hLvb/N5KG4P, hHvi-hLvb/N5KG4P, y hHvi-hLvb2/N5KG4P se digirió con la enzima de restricción SspI (Takara Shuzo) y se linealizó, y se extrajo con fenol y cloroformo, y se purificó mediante precipitación con etanol. El vector de expresión génica linealizado se introdujo en las células DG44 mediante el uso de un instrumento de electroporación (Gene Pulser; Bio-Rad). Las células DG44 se suspendieron en PBS a una concentración celular de 1×10^7 células/ml, y a alrededor de 0,8 ml de esta suspensión se le añadieron 10 ó 50 µg del ADN, que se sometió a pulsos de 1.500 V y 25 µF de capacidad.

Después de 10 minutos de periodo de recuperación a temperatura ambiente, las células tratadas se suspendieron en un medio CHO-S-SFMII (GIBCO) que contenía hipoxantina/timidina (GIBCO) (denominada más adelante en la presente memoria HT), que se inoculó en dos placas de 96 pocillos (Falcon) a 100 µl/pocillo, y se cultivó en un incubador de CO₂. Ocho a nueve horas después del inicio del cultivo, se añadieron 100 µl/pocillo del medio CHO-S-SFMII que contenía HT y 1 mg/ml de Geneticina (GIBCO) para cambiar a 500 µg/ml del medio de selección de Geneticina, y se seleccionaron las células en las que se había introducido el gen del anticuerpo. El medio se cambió por uno reciente una vez cada 3-4 días con ½ del volumen. Alrededor de 2 semanas después de cambiar al medio de selección, se recuperó una alícuota del sobrenadante del cultivo del pocillo en el que se observó un crecimiento celular favorable 4-5 días más tarde. Se midió la concentración del anticuerpo expresado en el sobrenadante del cultivo mediante el ELISA descrito anteriormente para la medición de la concentración del anticuerpo, y se seleccionaron las células que tenían un rendimiento elevado de producción del anticuerpo.

(2) Purificación a gran escala del anticuerpo humanizado

Después de cultivar las líneas celulares DG44 seleccionadas como se mencionó anteriormente que producían el anticuerpo humanizado ("b-b", "i-b", y "i-b2") durante varios días en un frasco de 500 ml del medio CHO-S-SFMII mediante el uso de un frasco de 2 L (CORNING) de un mezclador de rodillos, se recogió el medio de cultivo y se añadió un medio CHO-S-SFMII reciente y se cultivó de nuevo. El medio de cultivo se centrifugó para eliminar los restos celulares, y se filtró con un filtro de 0,22 µm o de 0,45 µm. Repitiendo esto se obtuvo un total de alrededor de 2 L de cada sobrenadante de cultivo. A partir del sobrenadante obtenido, se purificó el anticuerpo mediante el sistema ConSep LC100 (Millipore) conectado a una columna de afinidad de Proteína A (Poros).

(3) Medida de la concentración de anticuerpo mediante ELISA

Se prepararon placas de ELISA para la medida de la concentración del anticuerpo como sigue: Cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos (Maxisorp, NUNC) se inmovilizó con 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana de cabra

(BioSource) preparado a una concentración de 1 µg/ml con CB. Después de bloquear con 200 µl de DB, el sobrenadante del cultivo de las células CHO en las que se había expresado el anticuerpo o el anticuerpo purificado se diluyó en serie con DB, y se añadió a cada pocillo.

5 Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora y lavar con RB, se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (BioSource) diluido 1000 veces con DB. Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora y lavar con RB, se añadieron 100 µl de la disolución de sustrato, y después se midió la absorbancia a 405/655 nm mediante el uso del lector de microplacas (Bio-Rad). Como patrón para la medida de la concentración, se usó IgG4k humana (The Binding Site).

10

(4) Medida de la actividad de unión al antígeno

Las placas de ELISA de células para la medida de la unión al antígeno se prepararon como sigue. Las células usadas fueron células J82 de carcinoma de vejiga humana (ATCC HTB-1), que se inocularon en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a un recuento celular de 1×10^5 células. Esto se cultivó (medio RPMI1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal (GIBCO)) durante un día en un incubador de CO₂ para permitir que las células se uniesen a la placa. Después de desechar el líquido de cultivo, cada pocillo se lavó dos veces con PBS. Se añadieron 100 µl de PFA/PBS a cada pocillo, y se colocaron sobre hielo durante 10 minutos para inmovilizar las células.

15

20 Se desechó el PFA/PBS, y cada pocillo se lavó dos veces con 300 µl de PBS y después se bloqueó con 250 µl de DB. Basándose en el resultado de la medida anterior, el anticuerpo purificado se diluyó en serie con DB comenzando en 10 µg/ml mediante un factor de 2, y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Después de incubar a temperatura ambiente durante 2 horas y lavar con RB, se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (BioSource) diluido 1000 veces con DB. Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 hora y lavar con RB, se añadieron 100 µl de la disolución de sustrato, y después se midió la absorbancia a 405/655 nm mediante el uso del lector de microplacas (Bio-Rad).

25

(5) Medida de la actividad neutralizante hacia TF (actividad de inhibición de la producción de factor FXa)

30 Se midió la actividad de inhibición de la producción de Factor Xa del anticuerpo humanizado con la actividad de inhibición de la actividad de producción del Factor Xa mediante la tromboplastina derivada de placenta humana, Thromborel S (Boehringer AG), como índice. Así, se añadieron 60 µl del tampón (TBS que contenía CaCl₂ 5 mM y un 0,1% de BSA) a 10 µl de 5 mg/ml de Thromborel S y 10 µl del anticuerpo, que después se incubó en una placa de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo se diluyó en serie con el tampón comenzando a 200 µg/ml mediante un factor de 5.

35

Se le añadieron 10 µl de 3,245 µg/ml de Factor X humano (Celsus Laboratories) y 82,5 ng/ml de Factor VIIa humano (Enzyme Research), y se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se le añadieron 10 µl de EDTA 0,5 M para parar la reacción. Se le añadieron 50 µl de la disolución de sustrato cromogénico y se determinó la absorbancia a 405/655 nm mediante el lector de microplacas (Bio-Rad). Después de hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se midió de nuevo la absorbancia a 405/655 nm. Se determinó la actividad residual (%) a partir de cada cambio de absorbancia, con el cambio de absorbancia durante 30 minutos sin adición de anticuerpo como una actividad del 100%.

40

45 Se preparó la disolución de sustrato cromogénico disolviendo el sustrato cromogénico Testzyme S-2222 (Chromogenix) según las instrucciones adjuntas, y mezclando con una disolución de polibreno (0,6 mg/ml de bromuro de hexadimetileno, SIGMA) a 1:1.

45

(6) Medida de la actividad neutralizante hacia TF (actividad de inhibición de la unión de FX)

50

La actividad de inhibición de la unión de FX del anticuerpo humanizado se midió mediante el uso de tromboplastina derivada de placenta humana, Thromborel S (Boehringer AG), en la que se había formado previamente un complejo de TF y Factor VIIa, y la actividad de inhibición de la unión de FX se midió con la actividad de producción de Factor Xa del complejo TF-FVIIa como índice. Así, se añadieron 60 µl del tampón (TBS que contenía CaCl₂ 5 mM y 0,1% de BSA) a 10 µl de 5 mg/ml de Thromborel S y 10 µl de 82,5 ng/ml de Factor VIIa humano (Enzyme Research), que se preincubó en una placa de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 1 hora.

55

Se le añadieron 10 µl de la disolución de anticuerpo, incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos, y 10 µl de 3,245 µg/ml de Factor X humano (Celsus Laboratories), y se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 45 minutos. El anticuerpo se diluyó en serie con el tampón comenzando a 200 µg/ml mediante un factor de 2. Se le añadieron 10 µl de EDTA 0,5 M para parar la reacción. Se le añadieron 50 µl de la disolución de sustrato cromogénico y se determinó la absorbancia a 405/655 nm mediante el lector de microplacas (Bio-Rad). Después de hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se midió de nuevo la absorbancia a 405/655 nm. Se determinó la actividad residual (%) a partir de cada cambio de absorbancia, con el cambio de absorbancia durante 30 minutos sin adición de anticuerpo como una actividad del 100%.

60

65

Se preparó la disolución de sustrato cromogénico disolviendo el sustrato cromogénico Testzyme S-2222 (Chromogenix) según las instrucciones adjuntas, y mezclando con una disolución de polibreno (0,6 mg/ml de bromuro de hexadimetileno, SIGMA) a 1:1.

5

(7) Medida de la actividad neutralizante hacia TF (actividad de inhibición de la coagulación plasmática)

La actividad neutralizante hacia TF (actividad de inhibición de la coagulación plasmática) del anticuerpo humanizado se midió mediante el uso, como índice, del tiempo de protrombina determinado mediante el uso de la tromboplastina derivada de placenta humana, Thromborel S (Boehringer AG). Así, se colocaron 100 µl de plasma humano (Cosmo Bio) en una cubeta de muestra, a la que se le añadieron 50 µl del anticuerpo diluido a diversas concentraciones, y se calentó a 37 °C durante 3 minutos. Se añadieron 50 µl de 1,25 mg/ml de Thromborel S que se habían precalentado previamente a 37 °C para iniciar la coagulación plasmática. El tiempo de coagulación se midió mediante el uso del Amelung KC-10A conectado al Amelung CR-A (ambos de M. C. Medical).

10

15

El anticuerpo se diluyó en serie con TBS que contenía un 0,1% de BSA (denominado más adelante en la presente memoria BSA-TBS) comenzando a 80 µg/ml mediante un factor de 2. Con el tiempo de coagulación sin adición de anticuerpo como el 100% de actividad de coagulación plasmática del TF, se calculó la actividad de TF residual a partir de cada tiempo de coagulación en la adición del anticuerpo basándose en una curva patrón obtenida representando la concentración de Thromborel S y el tiempo de coagulación.

20

La curva patrón se creó a partir de las diversas concentraciones de Thromborel S y del tiempo de coagulación medido. Se añadieron 50 µl de BSA-TBS a 50 µl de Thromborel S diluido de manera adecuada, que se calentó a 37 °C durante 3 minutos, y se añadieron 100 µl de plasma humano precalentado a 37 °C para comenzar la coagulación, y se determinó el tiempo de coagulación. Thromborel S se diluyó en serie con el tampón de Hank (GIBCO) que contenía CaCl₂ 25 mM comenzando a 6,25 mg/ml mediante un factor de 2. Se representó la concentración de Thromborel S en el eje de abscisas, y el tiempo de coagulación en el eje de ordenadas en un papel log-log, lo que representó una curva patrón.

25

(8) Estudio de la actividad

Todos los anticuerpos humanizados, "b-b", "i-b", y "i-b2" tuvieron una actividad igual o mayor que la del anticuerpo quimérico (Figura 31). Para la actividad de inhibición de la producción de FXa, la actividad de inhibición de la unión de FX, y también la actividad de inhibición de la coagulación plasmática, los anticuerpos humanizados, "b-b", "i-b", y "i-b2" tuvieron una actividad igual o mayor que la del anticuerpo quimérico, y la actividad fue en un orden decreciente "i-b2" > "i-b" > "b-b" (Figuras 32, 33, y 34).

35

Ejemplo 6. Análisis cinético de la interacción de TF y del anticuerpo anti-TF mediante el uso de BIACORE

Se llevó a cabo el análisis cinético de la reacción antígeno-anticuerpo mediante el uso de BIACORE. La Proteína G recombinante se inmovilizó sobre un chip sensor, al cual estaba acoplado el anticuerpo. Se usó como antígeno el TF recombinante purificado (un TF soluble en el que el péptido FLAG se utilizó como marcador en 1-219), y se usó como analito el TF soluble preparado a diversas concentraciones. A partir del sensorgrama obtenido, se calcularon los parámetros cinéticos (constantes de velocidad de disociación k_{diss} , y constantes de velocidad de unión k_{ass}). Para el análisis cinético, se hizo referencia a "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system" (Karlsson, R. et al., (1991) J. Immunol. Methods 145: 229-240).

40

45

(1) Inmovilización de la Proteína G al chip sensor

La Proteína G (ZYMED) se inmoviliza en el chip sensor CM5 (BIACORE).

50

Como tampón de funcionamiento se usó el tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% de polisorbato 20 (v/v)) (BIACORE), y el caudal fue de 5 µl/min. Los grupos carboxilo del carboximetil dextrano en el chip sensor CM5 se activaron mediante la inyección de N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,05 M/hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 0,2 M. Posteriormente, se inyectaron 10 µl de 50 µg/ml de Proteína G, y esto se repitió tres veces para la inmovilización. La Proteína G se preparó disolviéndola en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) a una concentración de 10 mg/ml, y diluyendo hasta 50 µg/ml con tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,0). Se inyectaron otros 100 µl de hidrocloruro de etanolamina 1,0 M (pH 8,5) para bloquear el exceso de grupos activos. A esto se le inyectaron 10 µl de tampón de glicina-ácido clorhídrico 0,1 M (pH 2,5) y 10 µl de ácido clorhídrico 10 mM para eliminar mediante lavado las sustancias unidas de manera no covalente. Llevando a cabo esto para cada celda de flujo e inyectando 10 µl de la versión "ib2" del anticuerpo anti-TF humanizado 72 nM, se confirmó que se unieron alrededor de 1000 RU.

55

60

(2) Interacción del anticuerpo anti-TF inmovilizado y TF humano

65

Se expresó TF humano en el que se había unido el péptido FLAG al extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos 1-219 en células CHO, y se purificó. Esto se usó como TF soluble.

5 Como tampón de funcionamiento, se usó el tampón HBS-EP. Se inyectaron 10 μ l de disolución de anticuerpo 72 mM a un caudal de 20 μ l/min para inmovilizar el anticuerpo. El anticuerpo se diluyó con el tampón HBS-EP. A esto se le inyectaron 40 μ l de disolución de TF humano soluble a diversas concentraciones a un caudal de 30 μ l/min. En el análisis, se establecieron 80 segundos para la inyección como fase de unión, y después se cambió al tampón HBS-EP para establecer la fase de disociación de 120 segundos. Después de finalizar la fase de disociación, se inyectaron 10 μ l de ácido clorhídrico 20 mM para reconstituir el chip sensor. La unión, disociación, y reconstitución se establecieron en forma de un ciclo, y se obtuvo el sensorgrama para cada anticuerpo. La disolución de TF humano soluble se preparó a concentraciones de 250 nM, 125 nM, 62,5 nM, 31,3 nM, 15,6 nM, 7,81 nM, y 3,91 nM mediante el uso del tampón HBS-EP. Como blanco, se usó el sensorgrama obtenido inyectando el tampón HBS-EP usado para la dilución.

15 El procedimiento anterior se llevó a cabo para cada una de las celdas de flujo nº 1 a 3.

(3) Análisis cinético de la interacción

20 Se realizó la lectura del fichero de datos de interés, y se llevó a cabo la comparación de los patrones de reacción mediante una superposición con el uso como línea base del sensorgrama del tampón HBS-EP. Además, mediante el uso del programa informático con aplicaciones analíticas "BIAevaluation 2.1" (Pharmacia) exclusivamente para BIACORE que calcula los parámetros cinéticos (constantes de velocidad de unión k_{ass} y constantes de velocidad de disociación k_{diss}) mediante ajuste de curvas, se llevó a cabo el análisis cinético de la interacción. Para determinar las constantes de la velocidad de unión k_{ass} , se usó el modelo de análisis de tipo 4 (BIAevaluation 2.1 Software Handbook, A1-A5). Basándose en los valores calculados a partir de cada celda de flujo, se obtuvieron los parámetros cinéticos para cada anticuerpo. El resultado (media de los valores calculados a partir de cada celda de flujo \pm desviación estándar) se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6
Parámetros cinéticos del anticuerpo anti-TF quimérico y humanizado (n = 3)

	quimérico	b-b	i-b	i-b2
k_{diss} [$\times 10^{-4}$ 1/s]	5,06 \pm 0,12	9,52 \pm 0,22	6,49 \pm 0,17	6,35 \pm 0,15
k_{ass} [$\times 10^5$ 1/Ms]	4,65 \pm 0,32	4,15 \pm 0,27	4,67 \pm 0,30	5,44 \pm 0,36
KD [$\times 10^{-9}$ M]	1,09 \pm 0,09	2,30 \pm 0,15	1,39 \pm 0,13	1,17 \pm 0,11

30 Ejemplo 7. Medida de la reactividad del anticuerpo anti-TF humanizado hacia TF humano

Mediante el uso del método de hibridación de transferencia puntual ("Protein Experimental Method for Molecular Biological Research, Revised", Yodosha, editado por Takenawa Tadaomi, pág. 101), se investigó la reactividad hacia TF sin desnaturalizar, TF desnaturalizado en condiciones no reductoras, y TF desnaturalizado en condiciones reductoras. Se expresó en células CHO el TF en el que se había utilizado como marcador FLAG en la región extracelular, y se purificó (shTF). shTF se diluyó con cada uno de tres tampones (tampón A: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; tampón B: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), urea 8 M; tampón C: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, urea 8 M, DTT 5 mM). El TF sin desnaturalizar se trató con el tampón A, mientras el TF desnaturalizado de manera no reductora se trató con el tampón B, y el TF desnaturalizado de manera reductora se trató con el tampón C. Cada muestra se trató durante 24 horas a temperatura ambiente. Después del tratamiento, la muestra se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se transfirieron 0,5 μ l, 1 μ l, y 2 μ l de la muestra (3 μ g/ml) a la membrana, y la membrana se secó al aire. Se bloqueó con DB (Tris-HCl 50 mM, pH 8,1, NaCl 0,15 M, MgCl₂ 1 mM, 0,05% (v/v) de Tween 20, 0,02% (p/v) de Na₃, 1%(p/v) de BSA). La membrana se hizo reaccionar en DB que contenía el anticuerpo anti-TF humanizado o DB (control). Después de lavar con PBS que contenía un 0,05% (v/v) de Tween 20, se hizo reaccionar con DB que contenía un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa (DAKO). Después de lavar con PBS que contenía un 0,05% (v/v) de Tween 20, se trató con el reactivo de transferencia de Western ECL (Amersham), y se expuso a una película de rayos X durante 30 segundos.

50 Como se muestra en la Figura 35, el anticuerpo anti-TF quimérico y los anticuerpos anti-TF humanizados (versiones "bb", "ib", y "ib2" reaccionaron todos con el TF sin desnaturalizar, el TF desnaturalizado de manera no reductora, y el TF desnaturalizado de manera reductora.

Ejemplo 8. Confirmación del efecto antitrombótico en un modelo de rata de CID aguda - a título meramente informativo

5 El efecto antitrombótico del anticuerpo anti-TF se confirmó en un modelo de CID inducido con tromboplastina mediante el uso de ratas. Así, se inyectó continuamente una disolución de tromboplastina humana en la vena de ratas macho SD a 40 mg/kg a lo largo de 3 horas para crear un modelo de CID. El anticuerpo anti-TF (el anticuerpo i-b2 anti-TF quimérico y humanizado) se administró de manera intravenosa a una dosis de 0,2 mg/kg cinco minutos antes del inicio de la inyección de la disolución de tromboplastina. Quince minutos tras la finalización de la inyección continua de la disolución de tromboplastina, se extrajo sangre de la aorta abdominal en un tubo de citrato, en la cual se midió el recuento de plaquetas, el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), la concentración de fibrinógeno (Fib), la concentración de complejos de monómeros de fibrina solubles (sFMC), y el complejo trombina/antitrombina III (TAT).

15 El resultado mostrado en la Tabla 7 indicó que la inyección continua de tromboplastina provocó un recuento de plaquetas disminuido, un aPTT prolongado, una concentración de fibrinógeno disminuida, concentraciones incrementadas de sFMC y TAT, y un estado hipercoagulado evidente. En contraste, los anticuerpos anti-TF tanto quiméricos como humanizados inhibieron estos cambios con igual intensidad.

20 Los resultados revelaron que el anticuerpo anti-TF humanizado es útil como agente antitrombótico.

Tabla 7

Objeto de la medida	Grupo normal de administración sin tromboplastina	Grupo de control con administración de disolvente	Grupo de administración de anticuerpo quimérico	Grupo de administración de anticuerpo humanizado
Recuento de plaquetas ($\times 10^4 / \text{mm}^3$)	115,5 \pm 11,8	82,9 \pm 14,3	100,7 \pm 12,9	96,1 \pm 13,3
aPTT (seg)	20,1 \pm 1,1	36,2 \pm 13,9	22,3 \pm 0,7 ^{a)}	21,8 \pm 1,3 ^{a)}
Concentración de fibrinógeno (grupo normal = 100%)	100,0 \pm 4,2	64,8 \pm 20,0	101,0 \pm 6,6 ^{a)}	98,9 \pm 5,7 ^{a)}
Concentración de sFMC ($\mu\text{g/ml}$)	74,2 \pm 5,5	3517 \pm 3645	129,9 \pm 46,8 ^{a)}	66,5 \pm 23,0 ^{a)}
Concentración de TAT (ng/ml)	3,4 \pm 0,6	29,6 \pm 31,0	3,8 \pm 0,7 ^{b)}	4,2 \pm 0,9

(Media \pm desviación estándar)

Significación de la diferencia respecto del grupo de control de administración del disolvente: a): $p < 0,01$, b): $p < 0,05$

25 Ejemplo de Referencia 1. Preparación de un anticuerpo monoclonal anti-TF

1. Purificación de TF humano

30 Se llevó a cabo la purificación de TF a partir de placenta humana según el método de Ito (Ito, T. et al., J. Biol. Chem., 114: 691-696, 1993). Así, se homogeneizó placenta humana en solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,5) que contenía hidrocloreuro de benzamidina 1,0 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, fosfato de diisopropilfluoro 1 mM, y 0,02% de azida sódica, y después se eliminaron los lípidos del precipitado con acetona fría. El polvo sin lípidos obtenido se suspendió en el tampón indicado anteriormente que contenía un 2% de Triton X-100 para solubilizar el TF.

35 El sobrenadante se sometió a cromatografía de afinidad mediante el uso de una columna de Concanavalina A-Sepharose 4B (Pharmacia) y una columna de Sepharose 4B unida a anticuerpo anti-TF (Pharmacia), y se obtuvo el TF purificado. Se concentró con una membrana de ultrafiltración (PM-10, Amicon) y se almacenó como una muestra purificada a 4° C.

40 Se cuantificó el contenido de TF en la muestra purificada mediante ELISA de tipo sándwich que se combinó con un anticuerpo monoclonal anti-TF disponible comercialmente (American Diagnostica) y un anticuerpo policlonal (American Diagnostica) con TF recombinante como patrón.

45 La pureza de la muestra purificada se confirmó sometiendo a la muestra a SDS-PAGE mediante el uso de un gel de poliacrilamida con un gradiente de densidad del 4-20%, y tinción con plata del producto.

2. Inmunización y preparación del hibridoma

Después de mezclar el TF humano purificado (alrededor de 70 µg/ml) con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Difco), se inmunizó de manera subcutánea en el abdomen de ratones macho Balb/c de 5 semanas (Nippon Charles River) a 10 µg de TF/ratón. En los días 12, 18, y 25, se llevó a cabo una inyección de refuerzo subcutánea con TF mezclado con adyuvante incompleto de Freund a 5 µg/ratón, y como inmunización final se administró de manera intraperitoneal la disolución de TF diluida con PBS a 5 µg/ratón en el día 32.

Tres días después de la inmunización final, se prepararon células del bazo a partir de cuatro ratones, y se fusionaron a la línea de células de mieloma de ratón P3U1 a 1/5 del recuento celular de las mismas mediante el método de polietilén glicol. Las células fusionadas se suspendieron en el medio RPMI-1640 (denominado más adelante en la presente memoria medio RPMI) (Lifetech Oriental) que contenía un 10% de suero bovino fetal, que se inoculó en 400 pocillos por ratón (alrededor de 400 células/pocillo) de una placa de 96 pocillos. En los días 1, 2, 3, y 5 tras la fusión, se intercambiaba la mitad del volumen del medio por el medio RPMI (denominado más adelante en la presente memoria medio HAT) que contenía HAT (Dainippon Seiyaku) y H1 (Boehringer Mannheim GmbH) para llevar a cabo la selección mediante HAT del hibridoma.

Los hibridomas seleccionados mediante el método de cribado descrito más adelante se clonaron llevando a cabo una dilución limitante dos veces.

Para la dilución limitante, se inocularon 0,8 células por pocillo en dos placas de 96 pocillos. Para los pocillos en los que se confirmó una única colonia mediante examen microscópico, se seleccionaron los clones mediante la siguiente medida de la actividad de unión a TF y de la actividad neutralizante hacia TF. Los clones obtenidos se transfirieron del medio HAT al medio RPMI. Después de confirmar la ausencia de reducción en la capacidad de producción de anticuerpos debida a la aclimatación, se llevó a cabo de nuevo una dilución limitante para la clonación completa. Mediante el procedimiento anterior, se establecieron hibridomas que producen seis anticuerpos (ATR-2, 3, 4, 5, 7, y 8) que inhiben intensamente la unión del complejo TF/Factor VIIa y el Factor X.

3. Formación de líquido ascítico y purificación de anticuerpos

Se llevó a cabo la formación de líquido ascítico de los hibridomas establecidos según el método habitual. Así, se injertaron de manera intraperitoneal 10⁶ hibridomas que se subcultivaron in vitro en ratones macho BALB/c que habían recibido previamente dos veces una administración intravenosa de aceite mineral. Se recogió el líquido ascítico de los ratones que mostraron un abdomen inflamado 1-2 semanas después del injerto.

La purificación del anticuerpo a partir del líquido ascítico se llevó a cabo mediante el uso del sistema ConSepLC100 (Millipore) equipado con una columna de Proteína A (Nippon Gaishi).

4. ELISA de células

Se obtuvieron células J82 de carcinoma de vejiga humana (Fair D. S. et al., J. Biol. Chem., 262: 11692-11698, 1987) que se sabe que expresan TF a nivel elevado de la ATCC, y se subcultivaron y se mantuvieron en el medio RPMI a 37 °C, 5% de CO₂, y un 100% de humedad.

Las placas de ELISA de células se prepararon inoculando células J82 en una placa de 96 pocillos a 10⁵ células/pocillo, cultivando durante un día en las condiciones anteriormente mencionadas, eliminando el medio y después lavando dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), añadiendo una disolución al 4% de paraformaldehído (PFA), y dejando reposar sobre hielo durante 10 minutos para la inmovilización. Después de eliminar el PFA, la placa se lavó con PBS, se le añadió el tampón Tris (tampón de bloqueo) que contenía un 1% de BSA y un 0,02% de azida sódica, y la placa se almacenó a 4 °C hasta su uso.

El ELISA de células se llevó a cabo de la siguiente manera. Así, el tampón de bloqueo se eliminó de la placa preparada como se mencionó anteriormente, a la que se le añadió una disolución de anticuerpo anti-TF o un sobrenadante de cultivo de hibridomas, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de lavar con PBS que contenía un 0,05% de Tween 20, se hizo reaccionar un anticuerpo anti-IgG de ratón (H+L) de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (Zymed) durante 1 hora. Después de lavar, se añadió 1 mg/ml de p-nitrofenil fosfato disódico (Sigma), y una hora más tarde se midió la absorbancia a 405/655 nm para determinar la cantidad de anticuerpo anti-TF que se unió a las células J82.

5. Sistema de ensayo de la actividad neutralizante hacia TF con la actividad del Factor Xa como índice

A 50 µl de solución salina tamponada con Tris (TBS: pH 7,6) que contenía CaCl₂ 5 mM y 0,1% de albúmina de suero bovino, se le añadieron 10 µl de una disolución de tromboplastina derivada de placenta humana (5 mg/ml) (Thromborel S) (Boehringer) y 10 µl de una disolución de Factor VIIa (82,5 ng/ml) (American Diagnostics), y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir la formación del complejo TF/Factor VIIa. Después de añadir 10 µl de una concentración predeterminada de una disolución de anticuerpo anti-TF diluido o del sobrenadante del cultivo de hibridoma y 10 µl de una disolución de Factor X (3,245 µg/ml) (Celsus Laboratories) y hacerlos

reaccionar durante 45 minutos, se añadieron 10 µl de EDTA 0,5 M para parar la reacción. Se le añadieron 50 µl de una disolución de S-2222 2 mM (Daiichi Kagaku Yakuhin), y se midieron los cambios de la absorbancia a 405/655 nm a lo largo de 30 minutos y se estableció la actividad de producción de Factor X del TF. En este método, se puede determinar la actividad del anticuerpo que inhibe la unión del complejo TF/Factor VIIa y del Factor X.

5

6. Sistema de ensayo de la actividad de inhibición de la coagulación plasmática

Se mezclaron 50 µl de una disolución de anticuerpo anti-TF diluida de manera adecuada con 100 µl de un plasma humano normal disponible comercialmente (Kojin Bio), y se hizo reaccionar a 37 °C durante 3 minutos. Después se le añadieron 50 µl de disolución de tromboplastina derivada de placenta humana (1,25 mg/ml), y se midió el tiempo de coagulación del plasma mediante el uso del instrumento de medida de la coagulación plasmática (CR-A: Amelung).

10

7. Determinación del isotipo del anticuerpo

15

Para el sobrenadante del cultivo del hibridoma y para el anticuerpo purificado, se usó el equipo de análisis del isotipo de anticuerpo monoclonal (fabricado por Amersham) para confirmar el isotipo del anticuerpo. El resultado se muestra más adelante.

20

ATR-2	IgG1, k
ATR-3	IgG1, k
ATR-4	IgG1, k
ATR-5	IgG1, k
ATR-7	IgG2a, k
ATR-8	IgG2a, k

Ejemplo de Referencia 2. Método de preparación de TF humano soluble

25 Se preparó TF humano soluble (shTF) de la siguiente manera.

El gen que codifica la región penetrante del TF humano en el que los aminoácidos de la posición 220 y posteriores se han sustituido por el polipéptido FLAG M2 se insertó en el vector de expresión de células mamíferas (que contiene el gen de resistencia a neomicina y el gen DHFR), y se introdujo en las células CHO. Para la secuencia de cADN de TF humano, se hizo referencia a un artículo de James H. Morrissey et al. (Cell (1987) 50: 129-135). La secuencia del gen y la secuencia de aminoácidos de este TF humano soluble se muestran en SEQ ID N°: 151. Tras la selección con fármacos con G418, se seleccionaron las células expresadas, que después se sometieron a la amplificación de la expresión con metotrexato, y se establecieron las células que expresaban shTF.

30

35 Las células se cultivaron en el medio exento de suero CHO-S-SFMII (GIBCO) para obtener un sobrenadante de cultivo que contenía shTF. Se diluyó 2 veces con un volumen igual de un tampón Tris-HCl 40 mM (pH 8,5), que se añadió a la columna Q-Sepharose Fast Flow (100 ml, Pharmacia Biotech) equilibrada con un tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,5). Después de lavar con el mismo tampón que contenía NaCl 0,1 M, la concentración de NaCl se cambió a 0,3 M, y se eluyó el shTF de la columna. A la fracción de shTF obtenida, se le añadió sulfato amónico a una concentración final de 2,5 M, y se centrifugó (10.000 rpm, 20 minutos) para precipitar las proteínas contaminantes. El sobrenadante se añadió a Butyl TOYOPEARL (30 ml, TOSOH), y después se lavó con un tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6,8) que contenía sulfato amónico 2,5 M. En el tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), se redujo la concentración de sulfato amónico de manera lineal desde 2,5 M a 0 M para permitir la elución de shTF. Las fracciones de los picos que contenían shTF se concentraron mediante Centri-Prep 10 (Amicon). El concentrado se añadió a la columna TSKgel G3000SWG (21,5 x 600 mm, TOSOH) equilibrada con un tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 150 mM, y se recogió la fracción del pico de shTF. Se esterilizó mediante filtración con un filtro de membrana de 0,22 µm y el producto se estableció como el TF humano soluble (shTF). La concentración de la muestra se calculó suponiendo un coeficiente de extinción molar de la muestra $\epsilon = 40.130$ y un peso molecular = 43.210.

40

45

50 Texto libre del listado de secuencias

El contenido de <223> del listado de secuencias es el siguiente:

SEQ ID N°: 1: Cebador MHC-G1

55

SEQ ID N°: 2: Cebador MHC-G2a

SEQ ID N°: 3: Cebador MKC

- SEQ ID Nº: 4: Cebador de M13 M4
- SEQ ID Nº: 5: Cebador de M13 RV
- 5 SEQ ID Nº: 6: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-2 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID Nº: 7: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-3 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 10 SEQ ID Nº: 8: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-4 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID Nº: 9: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-5 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 15 SEQ ID Nº: 10: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-7 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID Nº: 11: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-8 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 20 SEQ ID Nº: 12: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-2 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 25 SEQ ID Nº: 13: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-3 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID Nº: 14: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-4 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 30 SEQ ID Nº: 15: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-5 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID Nº: 16: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-7 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 35 SEQ ID Nº: 17: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-8 y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 40 SEQ ID Nº: 18: Cebador ch5HS
- SEQ ID Nº: 19: Cebador ch5HA
- 45 SEQ ID Nº: 20: Cebador ch5LS
- SEQ ID Nº: 21: Cebador ch5LA
- SEQ ID Nº: 22: Cebador de injerto de CDR hR5Hv1S
- 50 SEQ ID Nº: 23: Cebador de injerto de CDR hR5Hv28
- SEQ ID Nº: 24: Cebador de injerto de CDR hR5Hv4S
- 55 SEQ ID Nº: 25: Cebador de injerto de CDR hR5Hv3A
- SEQ ID Nº: 26: Cebador de injerto de CDR hR5Hv5A
- SEQ ID Nº: 27: Cebador hR5HvPrS
- 60 SEQ ID Nº: 28: Cebador hR5HvPrA
- SEQ ID Nº: 29: Secuencia de aminoácidos de la versión "a" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 65

- SEQ ID N°: 30: Secuencia de aminoácidos de la versión "a" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 31: Cebador de reordenamiento de FR F3RFFS
- 5 SEQ ID N°: 32: Cebador de reordenamiento de FR F3RFBS
- SEQ ID N°: 33: Cebador de reordenamiento de FR F3RFFA
- 10 SEQ ID N°: 34: Cebador de reordenamiento de FR F3RFBA
- SEQ ID N°: 35: Cebador de reordenamiento de FR F3NMFS
- SEQ ID N°: 36: Cebador de reordenamiento de FR F3NMBS
- 15 SEQ ID N°: 37: Cebador de reordenamiento de FR F3NMFA
- SEQ ID N°: 38: Cebador de reordenamiento de FR F3NMBA
- 20 SEQ ID N°: 39: Secuencia de aminoácidos de la versión "b" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID N°: 40: Secuencia de aminoácidos de la versión "b" de la región V de la cadena H humanizada
- 25 SEQ ID N°: 41: Secuencia de aminoácidos de la versión "c" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID N°: 42: Secuencia de aminoácidos de la versión "c" de la región V de la cadena H humanizada
- 30 SEQ ID N°: 43: Cebador de reordenamiento de FR F3EPS
- SEQ ID N°: 44: Cebador de reordenamiento de FR F3EPA
- SEQ ID N°: 45: Cebador F3PrS
- 35 SEQ ID N°: 46: Cebador F3PrA
- SEQ ID N°: 47: Cebador de reordenamiento de FR F3VHS
- SEQ ID N°: 48: Cebador de reordenamiento de FR F3VHA
- 40 SEQ ID N°: 49: Secuencia de aminoácidos de la versión "d" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 45 SEQ ID N°: 50: Secuencia de aminoácidos de la versión "d" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 51: Secuencia de aminoácidos de la versión "e" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 50 SEQ ID N°: 52: Secuencia de aminoácidos de la versión "e" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 53: Cebador de reordenamiento de FR F3SSS
- SEQ ID N°: 54: Cebador de reordenamiento de FR F3SSA
- 55 SEQ ID N°: 55: Cebador de reordenamiento de FR F3CDS
- SEQ ID N°: 56: Cebador de reordenamiento de FR F3CDA
- 60 SEQ ID N°: 57: Secuencia de aminoácidos de la versión "f" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID N°: 58: Secuencia de aminoácidos de la versión "f" de la región V de la cadena H humanizada
- 65 SEQ ID N°: 59: Secuencia de aminoácidos de la versión "g" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma

- 5 SEQ ID N°: 60: Secuencia de aminoácidos de la versión "g" de la región V de la cadena H humanizada
- 5 SEQ ID N°: 61: Cebador de reordenamiento de FR F3ADS
- 5 SEQ ID N°: 62: Cebador de reordenamiento de FR F3ADA
- 10 SEQ ID N°: 63: Secuencia de aminoácidos de la versión "h" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 10 SEQ ID N°: 64: Secuencia de aminoácidos de la versión "h" de la región V de la cadena H humanizada
- 15 SEQ ID N°: 65: Cebador de reordenamiento de FR F3MMS
- 15 SEQ ID N°: 66: Cebador de reordenamiento de FR F3MMA
- 20 SEQ ID N°: 67: Cebador de reordenamiento de FR F3BMS
- 20 SEQ ID N°: 68: Cebador de reordenamiento de FR F3BMA
- 25 SEQ ID N°: 69: Secuencia de aminoácidos de la versión "i" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 25 SEQ ID N°: 70: Secuencia de aminoácidos de la versión "i" de la región V de la cadena H humanizada
- 30 SEQ ID N°: 71: Secuencia de aminoácidos de la versión "j" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 30 SEQ ID N°: 72: Secuencia de aminoácidos de la versión "j" de la región V de la cadena H humanizada
- 35 SEQ ID N°: 73: Cebador de reordenamiento de FR F2MPS
- 35 SEQ ID N°: 74: Cebador de reordenamiento de FR F2MPA
- 40 SEQ ID N°: 75: Secuencia de aminoácidos de la versión "b1" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 40 SEQ ID N°: 76: Secuencia de aminoácidos de la versión "b1" de la región V de la cadena H humanizada
- 45 SEQ ID N°: 77: Secuencia de aminoácidos de la versión "d1" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 45 SEQ ID N°: 78: Secuencia de aminoácidos de la versión "d1" de la región V de la cadena H humanizada
- 50 SEQ ID N°: 79: Cebador de reordenamiento de FR F2VHS
- 50 SEQ ID N°: 80: Cebador de reordenamiento de FR F2VHA
- 55 SEQ ID N°: 81: Secuencia de aminoácidos de la versión "b3" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 55 SEQ ID N°: 82: Secuencia de aminoácidos de la versión "b3" de la región V de la cadena H humanizada
- 60 SEQ ID N°: 83: Secuencia de aminoácidos de la versión "d3" de la región V de la cadena H humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 60 SEQ ID N°: 84: Secuencia de aminoácidos de la versión "d3" de la región V de la cadena H humanizada
- 65 SEQ ID N°: 85: Vector de reordenamiento de FR h5Lv1S
- 65 SEQ ID N°: 86: Vector de reordenamiento de FR h5Lv4S
- 65 SEQ ID N°: 87: Vector de reordenamiento de FR h5Lv2A
- 65 SEQ ID N°: 88: Vector de reordenamiento de FR h5Lv3A

- SEQ ID N°: 89: Vector de reordenamiento de FR h5Lv5A
- 5 SEQ ID N°: 90: Cebador h5LvS
- SEQ ID N°: 91: Cebador h5LvA
- 10 SEQ ID N°: 92: Secuencia de aminoácidos de la versión "a" de la región V de la cadena L humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID N°: 93: Secuencia de aminoácidos de la versión "a" de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 94: Cebador de reordenamiento de FR F3SS
- 15 SEQ ID N°: 95: Cebador de reordenamiento de FR F3SA
- SEQ ID N°: 96: Cebador de reordenamiento de FR F3RS
- 20 SEQ ID N°: 97: Cebador de reordenamiento de FR F3RA
- SEQ ID N°: 98: Secuencia de aminoácidos de la versión "b" de la región V de la cadena L humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 25 SEQ ID N°: 99: Secuencia de aminoácidos de la versión "b" de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 100: Secuencia de aminoácidos de la versión "c" de la región V de la cadena L humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- 30 SEQ ID N°: 101: Secuencia de aminoácidos de la versión "c" de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 102: Cebador de reordenamiento de FR F2SS
- SEQ ID N°: 103: Cebador de reordenamiento de FR F2SA
- 35 SEQ ID N°: 104: Cebador de reordenamiento de FR F2XS
- SEQ ID N°: 105: Cebador de reordenamiento de FR F2XA
- 40 SEQ ID N°: 106: Secuencia de aminoácidos de la versión "b1" de la región V de la cadena L humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID N°: 107: Secuencia de aminoácidos de la versión "b1" de la región V de la cadena L humanizada
- 45 SEQ ID N°: 108: Secuencia de aminoácidos de la versión "b2" de la región V de la cadena L humanizada y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID N°: 109: Secuencia de aminoácidos de la versión "b2" de la región V de la cadena L humanizada
- 50 SEQ ID N°: 110: Secuencia de aminoácidos de FR1 de la versión completa de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 111: Secuencia de aminoácidos de FR2 de las versiones "a" a "j" de la región V de la cadena H humanizada
- 55 SEQ ID N°: 112: Secuencia de aminoácidos de FR2 de las versiones "b1" y "d1" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 113: Secuencia de aminoácidos de FR2 de las versiones "b3" y "d3" de la región V de la cadena H humanizada
- 60 SEQ ID N°: 114: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "a" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 115: Secuencia de aminoácidos de FR3 de las versiones "b", "b1", y "b3" de la región V de la cadena H humanizada
- 65

- SEQ ID N°: 116: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "c" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 117: Secuencia de aminoácidos de FR3 de las versiones "d", "d1", y "d3" de la región V de la cadena H humanizada
- 5 SEQ ID N°: 118: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "e" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 119: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "f" de la región V de la cadena H humanizada
- 10 SEQ ID N°: 120: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "g" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 121: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "h" de la región V de la cadena H humanizada
- 15 SEQ ID N°: 122: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "i" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 123: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "j" de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 124: Secuencia de aminoácidos de FR4 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada
- 20 SEQ ID N°: 125: Secuencia de aminoácidos de FR1 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 126: Secuencia de aminoácidos de FR2 de las versiones "a", "b" y "c" de la región V de la cadena L humanizada
- 25 SEQ ID N°: 127: Secuencia de aminoácidos de FR2 de la versión "b1" de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 128: Secuencia de aminoácidos de FR2 de la versión "b2" de la región V de la cadena L humanizada
- 30 SEQ ID N°: 129: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "a" de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 130: Secuencia de aminoácidos de FR3 de las versiones "b", "b1" y "b2" de la región V de la cadena L humanizada
- 35 SEQ ID N°: 131: Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "c" de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 132: Secuencia de aminoácidos de FR4 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada
- 40 SEQ ID N°: 133: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada
- SEQ ID N°: 134: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada
- 45 SEQ ID N°: 135: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada
- 50 SEQ ID N°: 136: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 137: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada
- 55 SEQ ID N°: 138: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada
- SEQ ID N°: 139: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-2
- 60 SEQ ID N°: 140: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-3

- SEQ ID Nº: 141: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-4
- 5 SEQ ID Nº: 142: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-5
- SEQ ID Nº: 143: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-7
- 10 SEQ ID Nº: 144: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-8
- SEQ ID Nº: 145: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-2
- 15 SEQ ID Nº: 146: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-3
- SEQ ID Nº: 147: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-4
- 20 SEQ ID Nº: 148: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-5
- SEQ ID Nº: 149: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-7
- 25 SEQ ID Nº: 150: Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-8
- 30 SEQ ID Nº: 151: Secuencia de aminoácidos de TF humano soluble y la secuencia de nucleótidos que codifica la misma
- SEQ ID Nº: 152: Secuencia de aminoácidos de TF humano soluble.
- 35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

- 5 <120> Anticuerpos humanizados hacia el factor tisular (TF) humano y procedimiento para la producción de los anticuerpos humanizados
 <130> Número de Solicitud: 99912098.3
- 10 <150> JP 10-91850
 <151> 03-04-1998
 <160> 152
- 15 <210> 1
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador MHC-G1
 <400> 1
 28 g gatcccggg ccagtggata gacagatg
- 25 <210> 2
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Cebador MHC-G2a
 <400> 2
 35 27 g gatcccggg agtggataga ccgatgg
- <210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador MKC
- 45 <400> 3
 27 g gatcccggg tggatggtgg gaagatg
 <210> 4
 <211> 17
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador de M13 M4
- 55 <400> 4
 17 g ttttccag tcacgac
 <210> 5
 60 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Cebador de M13 RV

<400> 5
 17 caggaaacag ctatgac

5 <210> 6
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> Ratón

10 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1) ... (57)
 <220>

15 <221> mat-péptido
 <222> (55)...(441)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-2

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt	48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
15 20 25	
act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192
Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn	
50 55 60	
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc	336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
95 100 105	
caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca	411
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
110 115	

20

<210> 7
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> Ratón

25

<220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1) ... (57)
 <220>

30 <221> mat-péptido
 <222> (58) ... (441)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-3

```

<400> 7
  atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt      48
  Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
      -15                    -10                    -5
  gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag      96
  Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
      1                    5                    10
  cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc      144
  Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
      15                    20                    25
  act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt      192
  Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
      30                    35                    40                    45
  gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac      240
  Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn
      50                    55                    60
  cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc      288
  Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
      65                    70                    75
  aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc      336
  Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80                    85                    90
  tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc      384
  Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
      95                    100                    105
  caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca
  Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
  110                    115
  
```

<210> 8

- 5 <211> 408
- <212> ADN
- <213> Ratón

<220>

- 10 <221> sig-péptido
- <222> (1)...(57)
- <220>
- <221> mat-péptido
- <222> (58)...(408)

- 15 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-4

<400> 8

```

  atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
  Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15                    -10                    -5
  gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gct gag ctt gtg agg      96
  Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
      1                    5                    10
  cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa gct tct ggc ttc aac att      144
  Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15                    20                    25
  aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg      192
  Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
      30                    35                    40                    45
  
```

```

gag tgg att gga ttg att gat cct caa aat ggt aat act ata tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp
                    50                    55                    60
ccg aag ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac      288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
                    65                    70                    75
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc      336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
                    80                    85                    90
tat tac tgt gat aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa      384
Tyr Tyr Cys Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                    95                    100                    105
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser      408
110                    115

```

- 5 <210> 9
- <211> 408
- <212> ADN
- <213> Ratón

- 10 <220>
- <221> sig-péptido
- <222> (1)...(57)
- <220>
- <221> mat-péptido
- <222> (58) ... (408)

- 15 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-5

```

<400> 9
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
                    -15                    -10                    -5
gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg act aac ctt gtg agg      96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg
                    1                    5                    10
cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa ggt tct ggc ttc aac att      144
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile
                    15                    20                    25
aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
                    30                    35                    40                    45
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggt cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                    50                    55                    60
ccg aaa ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac      288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
                    65                    70                    75
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc      336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
                    80                    85                    90
tat ttc tgt gct aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                    95                    100                    105
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser      408
110                    115

```

- 20 <210> 10
- <211> 411
- <212> ADN
- <213> Ratón

<220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(57)
 <220>
 5 <221> mat-péptido
 <222> (58)...(411)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF
 ATR-7
 <400> 10

```

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt      48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
      -15                               -10                               -5
gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag      96
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
      1                               5                               10
cct ggg tct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc      144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
      15                               20                               25
cct gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt      192
Pro Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
      30                               35                               40                               45
gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac      240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
      50                               55                               60
cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc      288
Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
      65                               70                               75
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc cta aca tct gag gac tct gca gtc      336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80                               85                               90
tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly
      95                               100                               105
caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
110                               115
    
```

10

<210> 11
 <211> 411
 <212> ADN
 15 <213> Ratón

<220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(57)
 <220>
 20 <221> mat-péptido
 <222> (58)...(411)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF
 ATR-8
 25 <400> 11

```

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt      48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
      -15                               -10                               -5
gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag      96
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
    
```

```

                1           5           10
cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
    15                20                25
act gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt      192
Thr Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
    30                35                40                45
gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac      240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
    50                55                60
cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc      288
Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
    65                70                75
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc      336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
    80                85                90
tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly
    95                100                105
caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca                                  411
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
    110                115

```

5 <210> 12
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Ratón

10 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(54)
 <220>
 <221> mat-péptido
 <222> (55)...(375)

15 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-2
 <400> 12

```

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt      48
Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly
    -15                -10                -5
aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tcc gca tct      96
Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser
    1                5                10
ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt      144
Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly
    15                20                25                30
aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc      192
Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val
    35                40                45
ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc      240
Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
    50                55                60
agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta      288
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu
    65                70                75
cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act      336
Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr
    80                85                90
ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa                                  375
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
    95                100                105

```

20 <210> 13
 <211> 375

<212> ADN
 <213> Ratón

5 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(54)
 <220>
 <221> mat-péptido
 <222> (55)...(375)

10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-3
 <400> 13

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt	48
Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly	
-15 -10 -5	
aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct	96
Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser	
1 5 10	
ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt	144
Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly	
15 20 25 30	
aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc	192
Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val	
35 40 45	
ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc	240
Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe	
50 55 60	
agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttc tct ttc aag atc agc agc cta	288
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu	
65 70 75	
cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act	336
Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr	
80 85 90	
ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa	375
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
95 100 105	

15 <210> 14
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Ratón

20 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(66)
 <220>
 <221> mat-péptido

25 <222> (67)...(387)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-4
 <400> 14

atg gac atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg	48
Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp	
-20 -15 -10	
ttt cca ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tcc	96

```

Phe Pro Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
  -5                               1                               5                               10
atg tat gcc tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt      144
Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser
                               15                               20                               25
cag gac att aaa acc ttt tta agc tgg tac cag cag aaa cca tgg caa      192
Gln Asp Ile Lys Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln
                               30                               35                               40
tct cct aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc      240
Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val
                               45                               50                               55
cca tca aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc      288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr
                               60                               65                               70
atc agc agc ctg gag tct gac gat tca gca act tat tac tgt cta cag      336
Ile Ser Ser Leu Glu Ser Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
                               75                               80                               85                               90
cat ggt gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa ctg gaa ata      384
His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
                               95                               100                               105
aaa                                                                    387
Lys

```

5 <210> 15
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Ratón

10 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(60)
 <220>
 <221> mat-péptido
 <222> (61)...(381)

15 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-5
 <400> 15

```

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20                               -15                               -10                               -5
ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr
                               1                               5                               10
gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac      144
Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
                               15                               20                               25
att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro
                               30                               35                               40
aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
                               45                               50                               55                               60
aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn
                               65                               70                               75
aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt      336
Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
                               80                               85                               90
gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                               95                               100                               105

```

20 <210> 16
 <211> 393

<212> ADN
 <213> Ratón

5 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1) ... (57)
 <220>
 <221> mat-péptido
 <222> (58)...(394)

10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-7
 <400> 16

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa	48
Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu	
-15 -10 -5	
atc aac ggt gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt	96
Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val	
1 5 10	
acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc	144
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu	
15 20 25	
tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca	192
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro	
30 35 40 45	
ggc cag tct cca aag cgc ctg atc tac ctt gtg tct aaa ctg gac tct	240
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser	
50 55 60	
gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65 70 75	
ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt	336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys	
80 85 90	
tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg	336
Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
95 100 105	
gaa ata aaa	393
Glu Ile Lys	
110	

15 <210> 17
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Ratón

20 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(57)
 <220>
 <221> mat-péptido

25 <222> (58)...(393)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-8
 <400> 17

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gat	48
---	----


```

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Asp
-15 -10 -5
atc aac ggt gat gtt gta ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt 96
Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val
1 5 10
acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc 144
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
15 20 25
tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca 192
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
30 35 40 45
ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
50 55 60
gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75
ctg aaa atc agc aga gtg gag gcc gag gat ttg gga gtt tat tat tgt 336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
80 85 90
tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 384
Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
95 100 105
gaa ata aaa 393
Glu Ile Lys
110

```

- 5 <210> 18
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Cebador ch5HS

<400> 18
gtctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcat 35
- 15 <210> 19
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Cebador ch5HA

<400> 19
28 tgttgctagc tgaggagacg gtgactga
- 25 <210> 20
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Cebador ch5LS

<400> 20
- 35 gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagtt 35

<210> 21
<211> 28
<212> ADN
- 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador ch5LA

5 <400> 21
 tgttcgtacg ttttatttcc agcttggc
 28

<210> 22
 <211> 104
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador de injerto de CDR hr5Hv1S

15 <400> 22
 ttctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcattctct tcctgatggc agtgggtaca 60
 ggggttaact cacaggtgca gctgttggag tctggagctg tgc 104

<210> 23
 20 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Cebador de injerto de CDR hr5Rv28

<400> 23
 acaggtgcag ctgttggagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt ccgtgaagat 60
 ctccctgcaag gcttccggat tcaacattaa agactactat atgcattg 108

30 <210> 24
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cebador de injerto de CDR hr5Hv4S

<400> 24
 gaatggccat agtatgatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac 60
 atccgccagt attgcctact tggagtctc gagcctgaca aatgagga 108

40 <210> 25
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cebador de injerto de CDR hr5Hv3A

<400> 25
 tcatacatc tatggccatt cgcaggatca tccccacaa tccattctag accctgtcca 60
 ggccctctgtt ttacccaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga 110

50 <210> 26
 <211> 110
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial

```

<220>
<223> Cebador de injerto de CDR hR5Hv5A

<400> 26
  agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttgccc ccagtagtcc atggcatagc      60
  ccgagtcctc tgacacagtaa tagaccgcag aatcctcatt tgtcaggctc      110
5

<210> 27
<211> 19
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador hR5HvPrS

15 <400> 27
  19      ttctgtcgac ccaccatga

<210> 28
<211> 19
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador hR5HvPrA

25 <400> 28
  19      agaagctagc tgaggagac

<210> 29
<211> 415
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> sig-péptido
<222> (1)...(57)
<220>
<221> mat-péptido
<222> (58)...(415)
40 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "a" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 29
  atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
  Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15                    -10                    -5
  gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
  Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1                    5                    10
  cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
  Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15                    20                    25
  aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
  Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30                    35                    40                    45
  gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
  Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

```

```

                50                55                60
ccg aaa ttc cag ggc agg gcc aaa ctg act gca gcc aca tcc gcc agt      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser
                65                70                75
att gcc tac ttg gag ttc tcg agc ctg aca aat gag gat tct gcg gtc      336
Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
                80                85                90
tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                95                100                105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      415
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                115

```

5 <210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "a" de la región V de la cadena H humanizada

```

<400> 30
  Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
  1          5          10          15
  Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
  20          25          30
  Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
  35          40          45
  Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
  50          55          60
  Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr
  65          70          75          80
  Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
  85          90          95
  Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
  100          105          110
  Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
  115

```

15 <210> 31
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3RFFS

```

<400> 31
  ttcttgcca tagtatgtat gaccgaaat tccagggcgg agtcacaatc actgcagaca      60
  catccacgaa cacagcctac atggagctct cgagtctgag      100

```

25 <210> 32
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3RFBS

```

<400> 32
  ggagctctcg agtctgagat ctgaggacac agccatttat tactgtgcaa gagactcggg      60
  ctatgccatg gttct      75

```

35

<210> 33
 <211> 100
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3RFFA

 10 <400> 33
 ctcagactcg agagctccat gtaggctgtg ttcgtggatg tgtctgcagt gattgtgact 60
 cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

 <210> 34
 <211> 75
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3RFBA

 20 <400> 34
 agaacctgag catagccoga gtctcttgca cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc 60
 agactcgaga gctcc 75

 <210> 35
 <211> 100
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3NMFS

 <400> 35
 ttcttggcca tagtatgtat gaccgaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca 60
 catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtagc 100

 35 <210> 36
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3NMBS

 <400> 36
 gaggctctcg agtgtgacag ccgcgacac agccgtatat tactgtgcaa gagactcggg 60
 ctatgccaatg gttct 75

 45 <210> 37
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3NMFA

 <400> 37

 55 gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtctaccag cattgtgact 60
 cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 38
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3NMBA

 <400> 38
 agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaataata cggctgtgtc cgcggctgtc 60
 10 acactcgcaga gcctc 75

 <210> 39
 <211> 414
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> sig-peptido
 <222> (1)...(57)
 20 <220>
 <221> mat-peptido
 <222> (58)...(414)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "b" de la región V de la cadena H humanizada

 25 <400> 39
 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 -15 -10 -5
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
 1 5 10
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gln Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
 65 70 75
 aca gcc tac atg gag ctg tgg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gac tgg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

 <210> 40
 <211> 119
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "b" de la región V de la cadena H humanizada
 35

<400> 40

```

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

<210> 41

5 <211> 414

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> sig-péptido

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-péptido

<222> (58)...(414)

15 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "c" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 41

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg          48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
          -15          -10          -5
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg          96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
          1          5          10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att          144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
          15          20          25
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta          192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
          30          35          40          45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac          240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
          50          55          60
ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac          288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn
          65          70          75
cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta          336
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
          80          85          90
tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa          384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
          95          100          105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc          414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
          110          115
    
```

20

<210> 42

<211> 119

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "c" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 42

```

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

10 <210> 43

<211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Cebador de reordenamiento de FR F3EPS

<400> 43

```

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt actgcccagc          60
aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag                               100
    
```

20

<210> 44
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Cebador de reordenamiento de FR F3EPA

<400> 44

```

agaacctgg catagcccga gtctctcgca cagaaatata cggccgagtc ctcagatctc          60
agactcgaga gctcc                                                    75
    
```

30

<210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Cebador F3PrS

40 <400> 45

```

20      ttctcgcca tagtatgtat
    
```

<210> 46
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45


```

<220>
<223> Cebador F3PrA

<400> 46
5 18   agaaccatgg catagccc

<210> 47
<211> 100
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de reordenamiento de FR F3vHS

15 <400> 47
      ttctttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtctctgatt accgcggacg      60
      agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagtctgag      100

<210> 48
<211> 75
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de reordenamiento de FR F3vHA

25 <400> 48
      agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaataaa cggccgtgtc ctcagatctc      60
      agactgttga gctcc      75

<210> 49
<211> 414
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> sig-péptido
<222> (1)...(57)
<220>
<221> mat-péptido
<222> (58)...(414)
40 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "d" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 49
      atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
      Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15 -10 -5
      gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
  
```

```

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1           5           10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15           20           25
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30           35           40           45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50           55           60
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
      65           70           75
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcc gcc gta      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80           85           90
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg gcc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95           100           105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110           115

```

5 <210> 50
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "d" de la cadena H humanizada

```

<400> 50
Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
      1           5           10           15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
      20           25           30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35           40           45
Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
      50           55           60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85           90           95
Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100           105           110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      115

```

15 <210> 51
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(57)
 <220>
 <221> mat-péptido

25 <222> (58)...(414)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "e" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 51
 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 -15 -10 -5
 gtt aac tca cac gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
 1 5 10
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cac ggt cta 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 ccg aaa ttc cac ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys
 65 70 75
 ata gcc tac atg gag ctc aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt 336
 Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

<210> 52
 5 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "e" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 52
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115

15 <210> 53
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3SSS

<400> 53
 ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccaggcag agtcacgatt accgcggaca 60
 catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100

<210> 54
 <211> 75
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3SSA

 10 <400> 54
 agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc gtcagatctc 60
 aggctcctga gctcc 75

 <210> 55
 <211> 100
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3CDS
 20
 <400> 55
 ttcttggcca tagtatgtat gaccggaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60
 aatcctccag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg 100

 <210> 56
 <211> 75
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3CDA

 <400> 56
 agaaccatgg catagcccga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatcgt 60
 aggctcgaga gttgc 75

 35 <210> 57
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(57)
 <220>
 <221> mat-péptido
 45 <222> (58)...(414)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "f" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 57

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15                               -10                               -5

ggt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1                               5                               10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15                               20                               25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30                               35                               40                               45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50                               55                               60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
      65                               70                               75

aca gcc tac atg gag ctc agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
      80                               85                               90

tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95                               100                               105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                               115

```

<210> 58

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "f" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 58

```

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

```

15 <210> 59

<211> 414

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<221> sig-péptido

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-péptido

<222> (53)...(414)

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "g" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 59

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15                    -10                    -5
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1                    5                    10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15                    20                    25
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30                    35                    40                    45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50                    55                    60
ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser
      65                    70                    75
aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc      336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80                    85                    90
tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95                    100                    105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110                    115

```

5

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la versión "g" de la región V de la cadena H humanizada

15 <400> 60

```

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

```

20 <210> 61

<211> 100

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3ADS

<400> 61
 ttcttgcca tagtatgat gacccgaat tccagggccg cgtcaccatg tcagccgaca 60
 agtcctccag cgccgcctat ttacagtgga ccagccttaa 100

5 <210> 62
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3ADA

<400> 62
 agaaccatgg catagcccga gtctctcgcg cagaaatata tggcgggtgc cgaggcctta 60
 aggctggtcc actgt 75

15 <210> 63
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(57)
 <220>
 <221> mat-péptido

25 <222> (58)...(414)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "h" de la cadena H humanizada

<400> 63
 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 -15 -10 -5
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
 1 5 10
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 65 70 75
 gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata 336
 Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile
 80 85 90
 tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

30 <210> 64
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "h" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 64

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

5 <210> 65
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3MMS

<400> 65
 ttcttggcca tagtatgtat gaccggaaat tccagggcag agtcacgatt accgcgga
 catcgacgag cacagtcttc atggaactga gcagcctgag 60 100

15 <210> 66
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3MMA

<400> 66
 agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc ttcagatctc
 aggctgctca gttcc 60 75

25 <210> 67
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3BMS

35 <400> 67
 ttcttggcca tagtatgtat gaccggaaat tccagggcag agtcaccttt accgcgga
 catccgcgaa cacagcctac atggagttga ggagcctcag 60 100

40 <210> 68
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3BMA


```

<400> 68
  agaaccatgg catagcccga gtctctcgca caataataaa cagccgtgtc tgcagatctg      60
  aggtcctca actcc                                                    75

5  <210> 69
   <211> 414
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

10 <220>
   <221> sig-péptido
   <222> (1)...(57)
   <220>
   <221> mat-péptido
   <222> (58)...(414)

15 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "I" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 69
  atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
  Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
                                -15                    -10                    -5
  gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
  Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
                                1                    5                    10
  cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
  Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
                                15                    20                    25
  aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
  Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
                                30                    35                    40                    45
  gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
  Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
                                50                    55                    60
  ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc      288
  Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
                                65                    70                    75
  aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg      336
  Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
                                80                    85                    90
  tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384

  Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
                                95                    100                    105
  ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
  Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
  110                    115

20 <210> 70
   <211> 119
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

25 <220>
   <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "I" de la región V de la cadena H humanizada

```

<400> 70

```

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

<210> 71

5 <211> 414

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> sig-peptido

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptido

<222> (58)...(414)

15 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "j" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 71

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg          48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15          -10          -5
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg          96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1          5          10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att          144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15          20          25
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta          192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30          35          40          45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac          240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50          55          60
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc gcg gac aca tcc gcg aac          288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn
      65          70          75
aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc aga tct gca gac acg gct gtt          336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val
      80          85          90
tat tat tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa          384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95          100          105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc          414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      110          115
    
```

20

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la versión "j" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 72

```

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

5

<210> 73

<211> 79

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de reordenamiento de FR F2MPS

15 <400> 73

```

ttctatgcat tgggtgcgcc aggctccagg acaggcctg gagtggatgg gagggaatga 60
tctgcaat gccattct 79
    
```

<210> 74

<211> 79

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de reordenamiento de FR F2MPA

25

<400> 74

```

agaatggcca ttgcaggat cattccctcc catccactcc aggcctgtc ctggagcctg 60
gcgcacccaa tgcatagaa 79
    
```

<210> 75

30 <211> 414

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <221> sig-péptido

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-péptido

<222> (58)...(414)

40 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "b1" de la región V de la cadena H humanizada

```

<400> 75
  atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
  Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15                    -10                    -5
  gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
  Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1                    5                    10
  cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
  Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15                    20                    25
  aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg      192
  Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
      30                    35                    40                    45
  gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
  Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50                    55                    60
  ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac      288
  Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
      65                    70                    75
  aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att      336
  Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
      80                    85                    90
  tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
  Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95                    100                    105
  ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
  Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
  110                    115
  
```

<210> 76

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "b1" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 76

```

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

15

<210> 77

<211> 414

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<221> sig-péptido

<222> (1)...(57)

<220>

25

<221> mat-péptido

<222> (58)...(414)

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "d1" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 77

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15                    -10                    -5
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1                    5                    10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15                    20                    25
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
      30                    35                    40                    45
gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50                    55                    60
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
      65                    70                    75
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80                    85                    90
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95                    100                    105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc      414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      110                    115

```

- 5 <210> 78
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "d1" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 78

```

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

```

- 15 <210> 79
- <211> 79
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 20 <220>
- <223> Cebador de reordenamiento de FR F2VHS

<400> 79
 ttctatgcat tgggtgcgac aggcccttgg acaagggtt gagtggattg gagggaatga 60
 tcctgcaat ggccatctt 79

5 <210> 80
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F2VHA

<400> 80
 aagatggcca ttgcaggat cattccctcc aatccactca agcccttgtc caggggctg 60
 tcgcacccaa tgcatagaa 79

15 <210> 81
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(57)
 <220>
 <221> mat-péptido

25 <222> (58)...(414)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "b3" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 81
 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 -15 -10 -5
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
 1 5 10
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
 65 70 75
 aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

30 <210> 82
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "b3" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 82

```

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

- 5 <210> 83
- <211> 414
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <221> sig-peptido
- <222> (1)...(57)
- <220>
- <221> mat-peptido

- 15 <222> (58)...(419)
- <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "d3" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 83

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg          48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
          -15          -10          -5
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg          96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
          1          5          10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att          144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
          15          20          25
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt          192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
          30          35          40          45
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat gcc cat agt atg tat gac          240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
          50          55          60
ccg aaa ttc cag gcc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc          288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
          65          70          75
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta          336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
          80          85          90
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa          384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
          95          100          105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc          414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
          110          115
    
```

- 20 <210> 84
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la versión "d3" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 84

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

<210> 85

<211> 98

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Vector de reordenamiento de FR h5Lv1S

<400> 85

gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagttttttg ggatcttggt gctctggtt 60
 ccagggatcc gatgtgacat ccagatgacc cagtcctc 98

<210> 86

20 <211> 98

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Vector de reordenamiento de FR h5Lv4S

<400> 86

ttggcagatg gggtoccatc aaggttcagt ggctccgat ctggtaccga tttcactctc 60
 accatctcga gtctgcaacc tgaagatttt gcaactta 98

<210> 87

30 <211> 98

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Vector de reordenamiento de FR h5Lv2A

<400> 87

cttaagaagc ttttaatgtc ctgtgaggcc ttgcacgtga tggtgactct gtctcctaca 60
 gatgcagaca gggaggatgg agactgggtc atctggat 98

<210> 88

40 <211> 98

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Vector de reordenamiento de FR h5Lv3A

<400> 88
 gatgggaccc catctgcaa actagttgca taatagatca ggagcttagg ggctttccct 60
 5 ggtttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgtc 98

<210> 89
 <211> 94
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Vector de reordenamiento de FR h5Lv5A

15 <400> 89
 tgttcgtaçg tttagatctcc accttggtcc ctccgccgaa cgtgtacggg ctctcaccat 60
 gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg 94

<210> 90
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador h5LvS

25 <400> 90
 20 gtctagatct ccaccatgag

<210> 91
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador h5LvA

35 <400> 91
 19 tgttcgtaçg tttagatctc

40 <210> 92
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(60)
 <220>
 <221> mat-péptido
 50 <222> (61)...(381)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "a" de la región V de la cadena L humanizada

```

<400> 92
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20                               -15                               -10                               -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          1                               5                               10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          15                               20                               25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          30                               35                               40
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
          45                               50                               55                               60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat ttc act ctc acc atc tcg      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
          65                               70                               75
agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt ctg cag cat ggt      336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
          80                               85                               90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          95                               100                               105

```

5 <210> 93
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "a" de la región V de la cadena L humanizada

```

<400> 93
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                               5                               10                               15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe
  20                               25                               30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
  35                               40                               45
Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
  50                               55                               60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                               70                               75                               80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
  85                               90                               95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
  100                               105

```

15 <210> 94
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3SS

```

<400> 94
gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagatt ttgcaactta      60
ctattgtctg cagaaca                                                    77

```

25 <210> 95
 <211> 77

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3SA

<400> 95
 tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaaat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60
 tgtaatcggg accagac 77

10 <210> 96
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3RS

<400> 96
 gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagata ttgcaactta
 60
 ctattgtctg cagaaca
 77

20 <210> 97
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F3RA

<400> 97
 tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60
 tgtaatcggg accagac 77

30 <210> 98
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(60)
 <220>
 <221> mat-péptido
 <222> (61)...(381)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "b" de la región V de la cadena L humanizada

```

<400> 98
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20                               -15                               -10                               -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
                               1                               5                               10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
                               15                               20                               25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
                               30                               35                               40
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
                               45                               50                               55                               60
agg ttc agt gcc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
                               65                               70                               75
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt      336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
                               80                               85                               90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                               95                               100                               105

```

<210> 99

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "b" de la región V de la cadena L humanizada

<400> 99

```

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

```

15 <210> 100

<211> 381

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<221> sig-péptido

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-péptido

25 <222> (61)...(381)

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "c" de la región V de la cadena L humanizada

```

<400> 100
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20                               -15                               -10                               -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
                               1                               5                               10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
                               15                               20                               25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
                               30                               35                               40
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
                               45                               50                               55                               60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
                               65                               70                               75
agc ctc cag cct gaa gat att gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt      336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
                               80                               85                               90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                               95                               100                               105

```

5 <210> 101
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "c" de la región V de la cadena L humanizada

```

<400> 101
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1                               5                               10                               15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe
                               20                               25                               30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                               35                               40                               45
Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                               50                               55                               60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
                               65                               70                               75                               80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
                               85                               90                               95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                               100                               105

```

15 <210> 102
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F2SS

```

<400> 102
gtctcttaag ttggttccag cagaaaccag ggaaatctcc taagaccctg atctactatg      60
caactagtaa ca                                                              72

```

25

<210> 103
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F2SA

 <400> 103
 tgttactagt tgcatagtag atcagggctt taggagattt ccttggttc tgctggaacc 60
 10 aacttaagag ac 72

 <210> 104
 <211> 72
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F2XS

 20 <400> 104
 gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtccctg atctattatg 60
 caactagtaa ca 72

 <210> 105
 <211> 72
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador de reordenamiento de FR F2XA
 30
 <400> 105
 tgttactagt tgcataatag atcagggact taggggcttt ctctggtttc tgctgatacc 60
 aacttaagag ac 72

 <210> 106
 35 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(60)
 <220>
 <221> mat-péptido
 <222> (61)...(381)
 45 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "b1" de la región V de la cadena L humanizada

```

<400> 106
atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20                               -15                               -10                               -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
                               1                               5                               10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
                               15                               20                               25
att aaa agc ttc tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
                               30                               35                               40
aag acc ctg atc tac tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
45                               50                               55                               60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
                               65                               70                               75
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt      336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
                               80                               85                               90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                               95                               100                               105

```

5 <210> 107
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "b1" de la región V de la cadena L humanizada

```

<400> 107
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1                               5                               10                               15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe
20                               25                               30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35                               40                               45
Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50                               55                               60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                               70                               75                               80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
85                               90                               95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100                               105

```

15 <210> 108
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> sig-péptido
 <222> (1)...(60)
 <220>

25 <221> mat-péptido
 <222> (61)...(381)
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la versión "b2" de la región V de la cadena L humanizada

<400> 108

```

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20                               -15                -10                -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
                               1                    5                    10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
                               15                20                25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro
                               30                35                40
aag tcc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
                               45                50                55                60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
                               65                70                75
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt      336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
                               80                85                90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                               95                100                105

```

<210> 109

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la versión "b2" de la región V de la cadena L humanizada

<400> 109

```

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

```

15 <210> 110

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos de FR1 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada

<400> 110

```

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
                               5                    10                    15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
                               20                25                30

```

25


```

<210> 111
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de FR2 de las versiones "a" a "j" de la región V de la cadena H humanizada
<400> 111
  Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
                                5                               10
10
<210> 112
<211> 14
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de FR2 de las versiones "b1" y "d1" de la región V de la cadena H humanizada
20
<400> 112
  Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
                                5                               10

<210> 113
<211> 14
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de FR2 de las versiones "b3" y "d3" de la región V de la cadena H humanizada
30
<400> 113
  Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
                                5                               10

<210> 114
<211> 32
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
40 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de versión "a" de la región V de la cadena H humanizada
<400> 114
  Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu
                                5                               10                               15
  Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
                                20                               25                               30

45 <210> 115
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
50
<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de las versiones (b), (b1) y (b3) de la región V de la cadena H humanizada

```

<400> 115
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu
 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

5 <210> 116
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "c" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 116
 Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

15 <210> 117
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de las versiones "d", "d1" y "d3" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 117
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

25 <210> 118
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "e" de la región V de la cadena H humanizada

35 <400> 118
 Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu
 5 10 15
 Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

40 <210> 119
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "f" de la región V de la cadena H humanizada

<400> 119
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 5 10 15
 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 120
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "g" de la región V de la cadena H humanizada
 <400> 120
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg
 20 25 30
 10
 <210> 121
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "h" de la región V de la cadena H humanizada
 20
 <400> 121
 Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gln
 5 10 15
 Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 122
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "i" de la región V de la cadena H humanizada
 30
 <400> 122
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu
 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 123
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "j" de la región V de la cadena H humanizada
 40
 <400> 123
 Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu
 5 10 15
 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 45
 <210> 124
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR4 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada

<400> 124
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 5 10

5 <210> 125
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR1 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada

<400> 125
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

15 <210> 126
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR2 de las versiones "a", "b" y "c" de la región V de la cadena L humanizada

<400> 126
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 5 10 15

25 <210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR2 de la versión "b1" de la región V de la cadena L humanizada

35 <400> 127
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr
 5 10 15

40 <210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR2 de la versión "b2" de la región V de la cadena L humanizada

45 <400> 128
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 5 10 15

50 <210> 129
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 55 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "a" de la región V de la cadena L humanizada

<400> 129
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

5 <210> 130
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de las versiones "b", "b1" y "b2" de la región V de la cadena L humanizada

<400> 130
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

15 <210> 131
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR3 de la versión "c" de la región V de la cadena L humanizada

<400> 131
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

25 <210> 132
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de FR4 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada

<400> 132
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 5 10

35 <210> 133
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada

45 <400> 133
 Asp Tyr Tyr Met His
 5

50 <210> 134
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada

5 <400> 134
 Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 5 10 15
 Gly

<210> 135
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de todas las versiones de la región V de la cadena H humanizada

15 <400> 135
 Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
 5

<210> 136
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada

<400> 136
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser
 5 10

30 <210> 137
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada

<400> 137
 Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp
 5

40 <210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de todas las versiones de la región V de la cadena L humanizada

<400> 138
 Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr
 5

50 <210> 139
 <211> 118
 <212> PRT
 55 <213> Ratón

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-2

5 <400> 139

```

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

<210> 140

<211> 118

10 <212> PRT

<213> Ratón

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-3

15

<400> 140

```

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

<210> 141

20 <211> 117

<212> PRT

<213> Ratón

<220>

25 <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-4

<400> 141

```

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

<210> 142

5 <211> 117

<212> PRT

<213> Ratón

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-5

<400> 142

```

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

15 <210> 143

<211> 118

<212> PRT

<213> Ratón

<220>

20 <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-7

<400> 143

```

Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
          5                      10                      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr
    
```



```

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

- 5 <210> 144
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Ratón

- 10 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-8

```

<400> 144
Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
      5                10                15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
      20                25                30
Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
      35                40                45
Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
      50                55                60
Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65      70                75                80
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100                105                110
Leu Val Thr Val Ser Ala
      115
    
```

- 15 <210> 145
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Ratón

- 20 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-2

```

<400> 145
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly
      5                10                15
Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
      20                25                30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Ile
      35                40                45
Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65      70                75                80
    
```

ES 2 364 266 T3

Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

- 5 <210> 146
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Ratón

- 10 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-3

<400> 146
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly
 5 10 15
 Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

- 15 <210> 147
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Ratón

- 20 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-4

<400> 147
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Thr Phe
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

- 25 <210> 148
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Ratón

- 30 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-5

<400> 148

```

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

<210> 149

5 <211> 112
<212> PRT
<213> Ratón

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-7

<400> 149

```

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

15 <210> 150
<211> 112
<212> PRT
<213> Ratón

<220>

20 <223> Secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TF ATR-8

<400> 150

```

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
          20          25          30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    
```

```

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

```

5 <210> 151
 <211> 780
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> ADN que codifica TF humano soluble

```

<400> 151
atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc      48
Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val
      -30                -25                -20
gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct      96
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala
      -15                -10                -5                -1
tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca      144
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
      1                5                10                15
act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa      192
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
      20                25                30
gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa      240
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
      35                40                45
tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg      288
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
      50                55                60
aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca      366
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
      65              70              75              80
ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac      384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
      85              90              95
tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca      432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
      100             105             110
att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa      480
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
      115             120             125
gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg      528
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
      130             135             140
gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct      576
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
      145             150             155             160
tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg      624
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
      165             170             175
att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg      672
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
      180             185             190
att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag      720
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

```

ES 2 364 266 T3

```

          195                200                205
tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat      768
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
          210                215                220
gac gat aaa taa
Asp Asp Lys
225
    
```

5 <210> 152
 <211> 259
 <212> PRT

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de TF humano soluble

10 <400> 152

```

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

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un anticuerpo humanizado natural que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) derivadas de anticuerpos no humanos y una región estructural (FR) derivada de un anticuerpo humano natural y que tiene una inmunogenicidad reducida, y dicho método comprende las etapas de:
- (1) preparar un anticuerpo monoclonal no humano que responde a un antígeno de interés;
- (2) preparar una diversidad de anticuerpos humanos que tienen una homología elevada con las secuencias de aminoácidos de las FRs de los anticuerpos monoclonales del punto (1) anterior;
- (3) sustituir las cuatro FRs del anticuerpo monoclonal no humano del punto (1) anterior con las FRs correspondientes del anticuerpo humano del punto (2) anterior para generar un primer anticuerpo humanizado;
- (4) determinar la capacidad del anticuerpo humanizado generado en el punto (3) anterior para unirse al antígeno o para neutralizar una actividad biológica del antígeno;
- (5) sustituir una a tres FRs del anticuerpo humanizado generado en el punto (3) anterior con las FRs correspondientes del anticuerpo humano que son diferentes de las usadas en el punto (3) entre los anticuerpos humanos preparados en el punto (2) para generar el segundo anticuerpo humanizado;
- (6) comparar la capacidad del segundo anticuerpo humanizado generado en el punto (5) anterior y del primer anticuerpo humanizado generado en el punto (3) anterior en función de la capacidad de unirse al antígeno o de neutralizar la actividad biológica del antígeno, por lo que se selecciona un anticuerpo humanizado que tiene una actividad favorable;
- (7) llevar a cabo las etapas anteriores de los puntos (3) a (6) para el anticuerpo humanizado seleccionado en el punto (6) anterior; y
- (8) repetir las etapas anteriores de los puntos (3) a (6) hasta que se obtiene un anticuerpo humanizado que tiene una actividad equivalente al anticuerpo monoclonal no humano del punto (1) anterior.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno de interés es el factor tisular (TF) humano.
3. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo humanizado natural según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que comprende las etapas de:
- (1) obtener un anticuerpo humanizado natural mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2;
- (2) introducir un ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado natural en una célula hospedadora; y
- (3) cultivar la célula hospedadora.

Fig.1

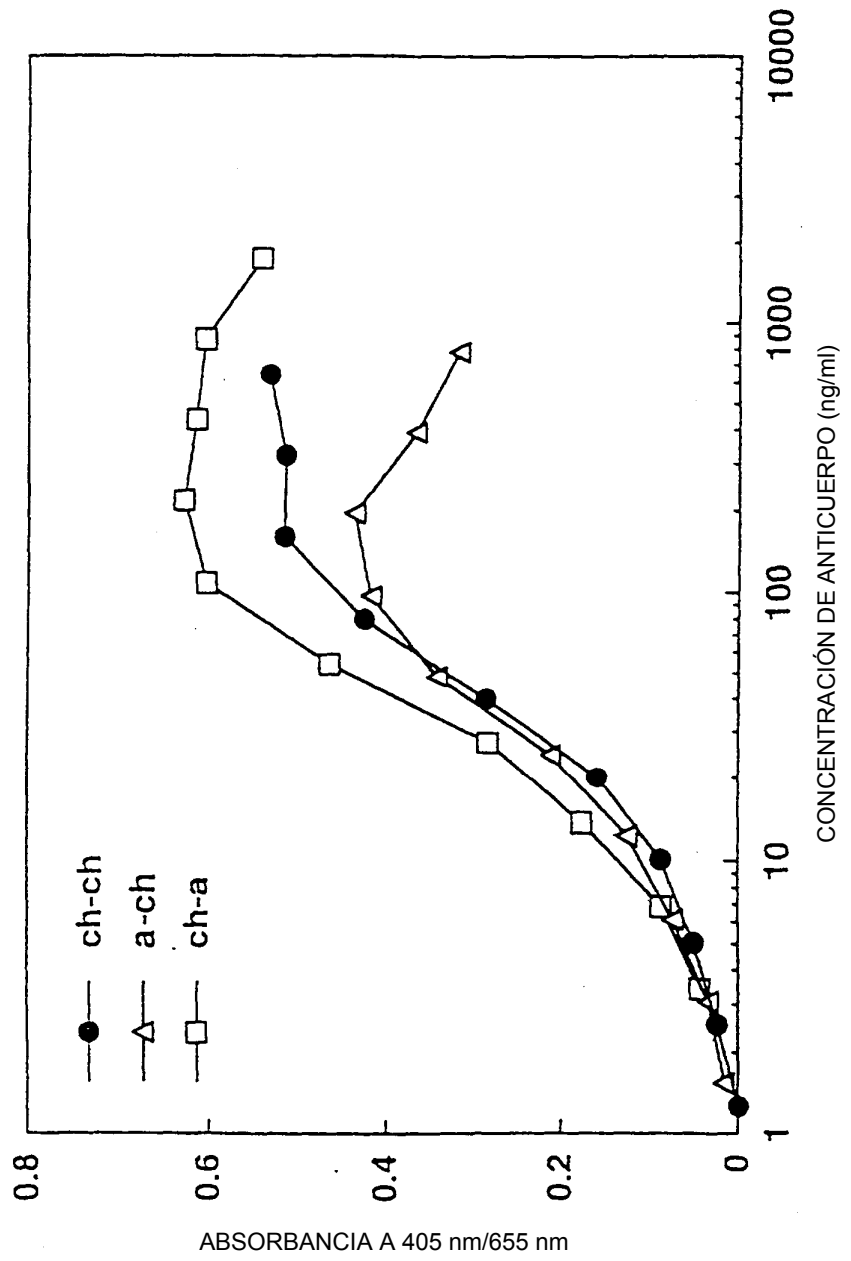


Fig.2

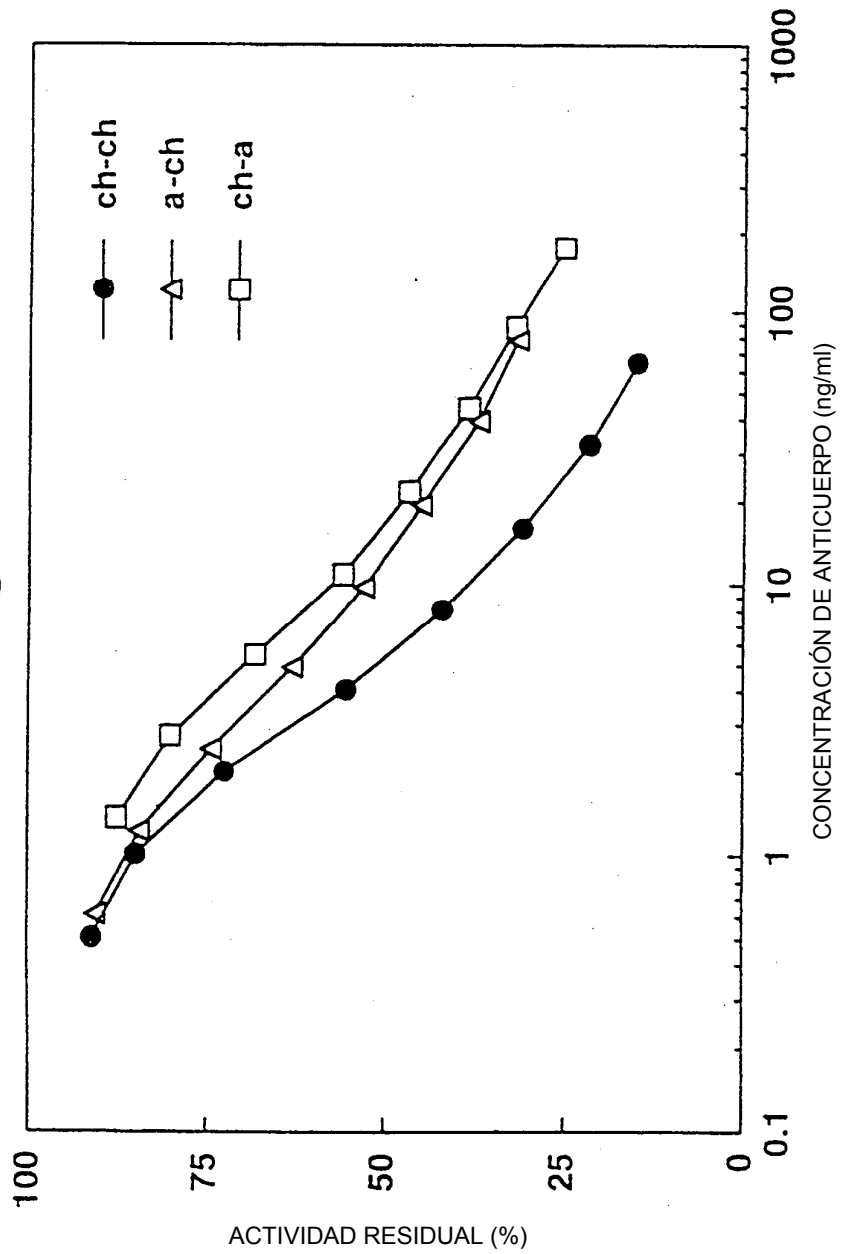


Fig.3

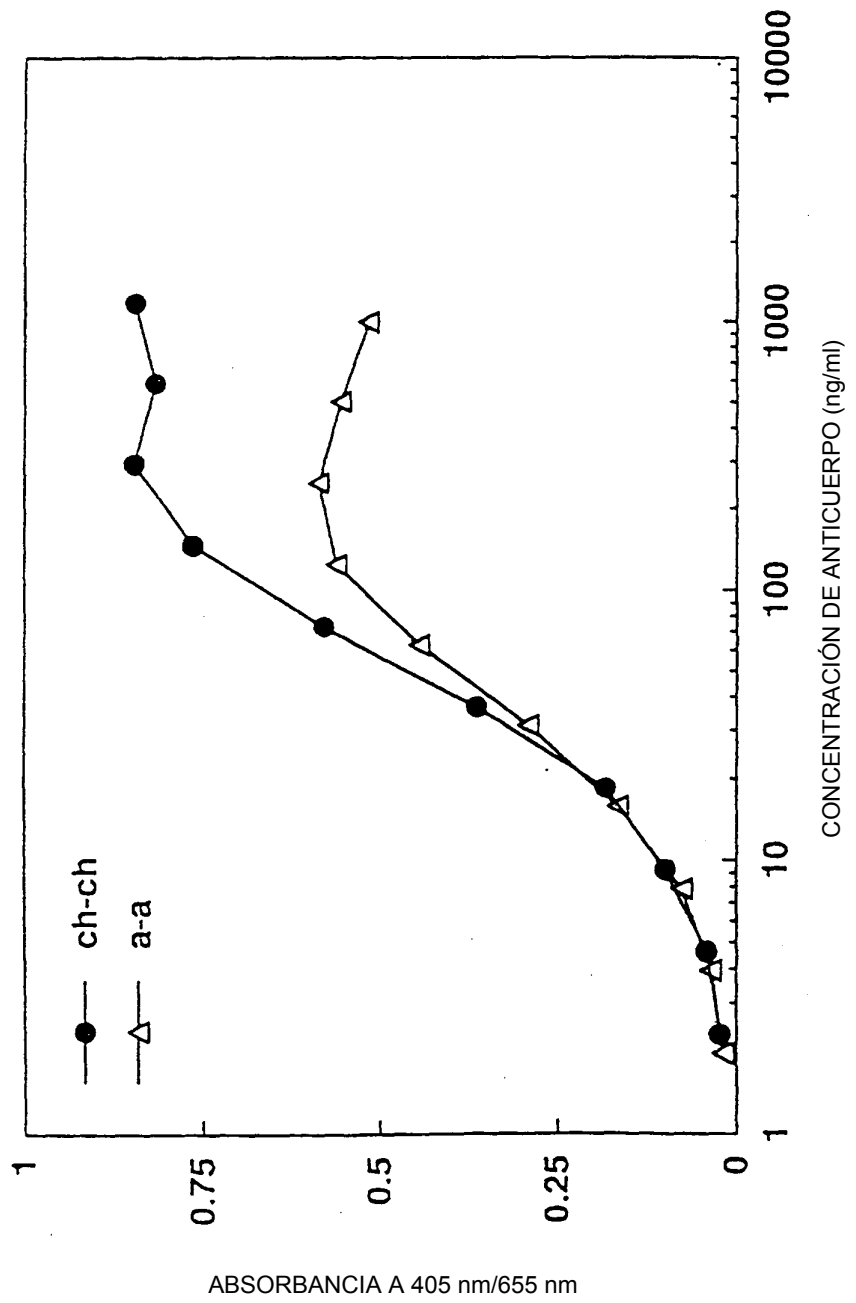


Fig.4

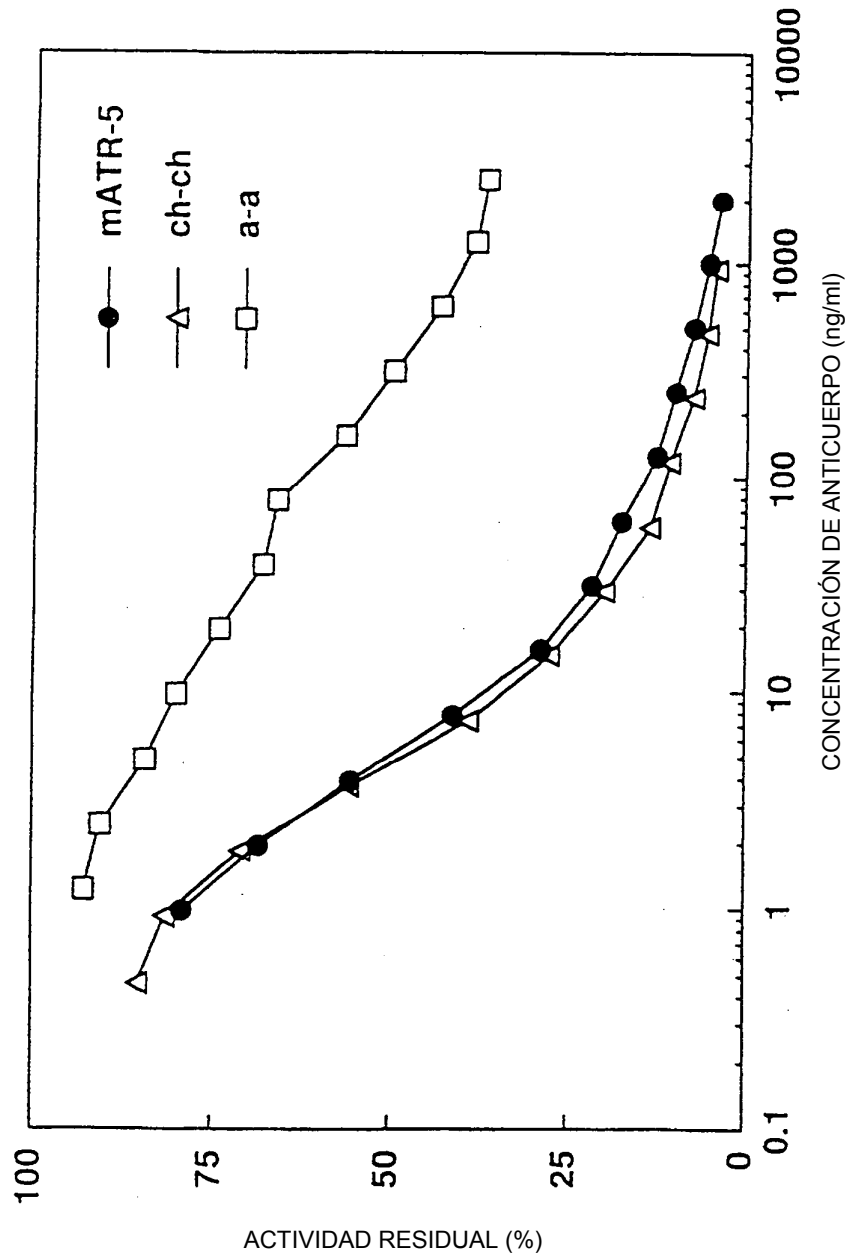


Fig.5

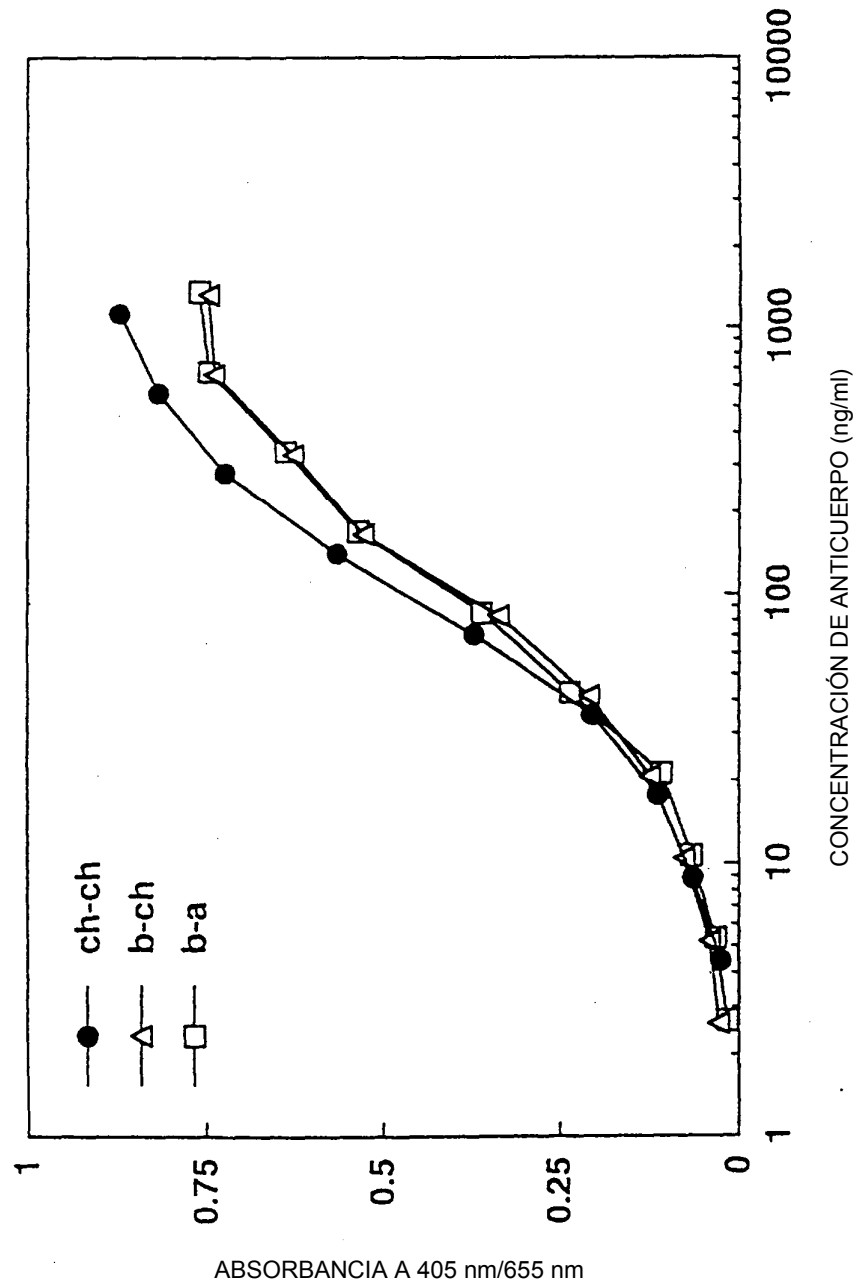


Fig.6

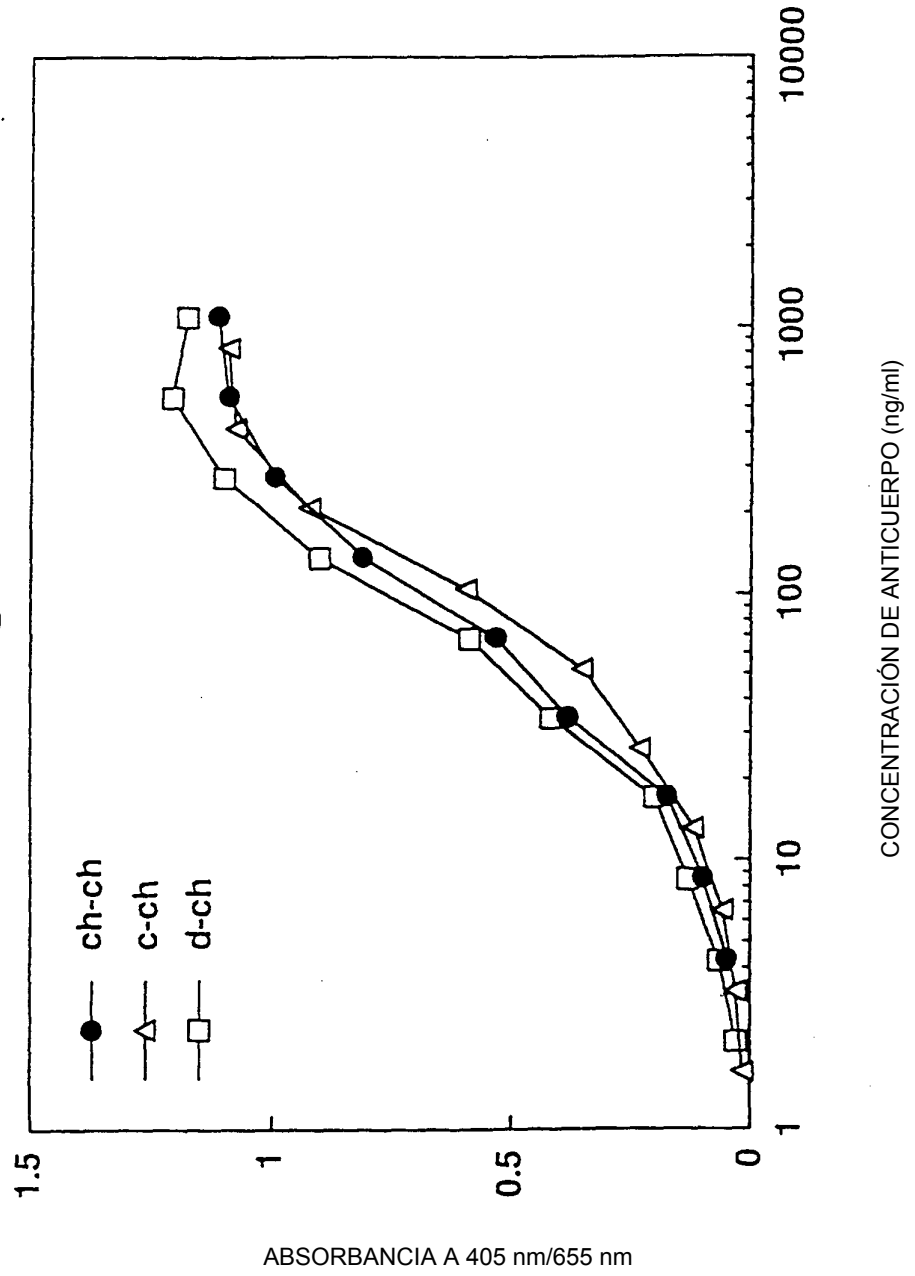


Fig.7

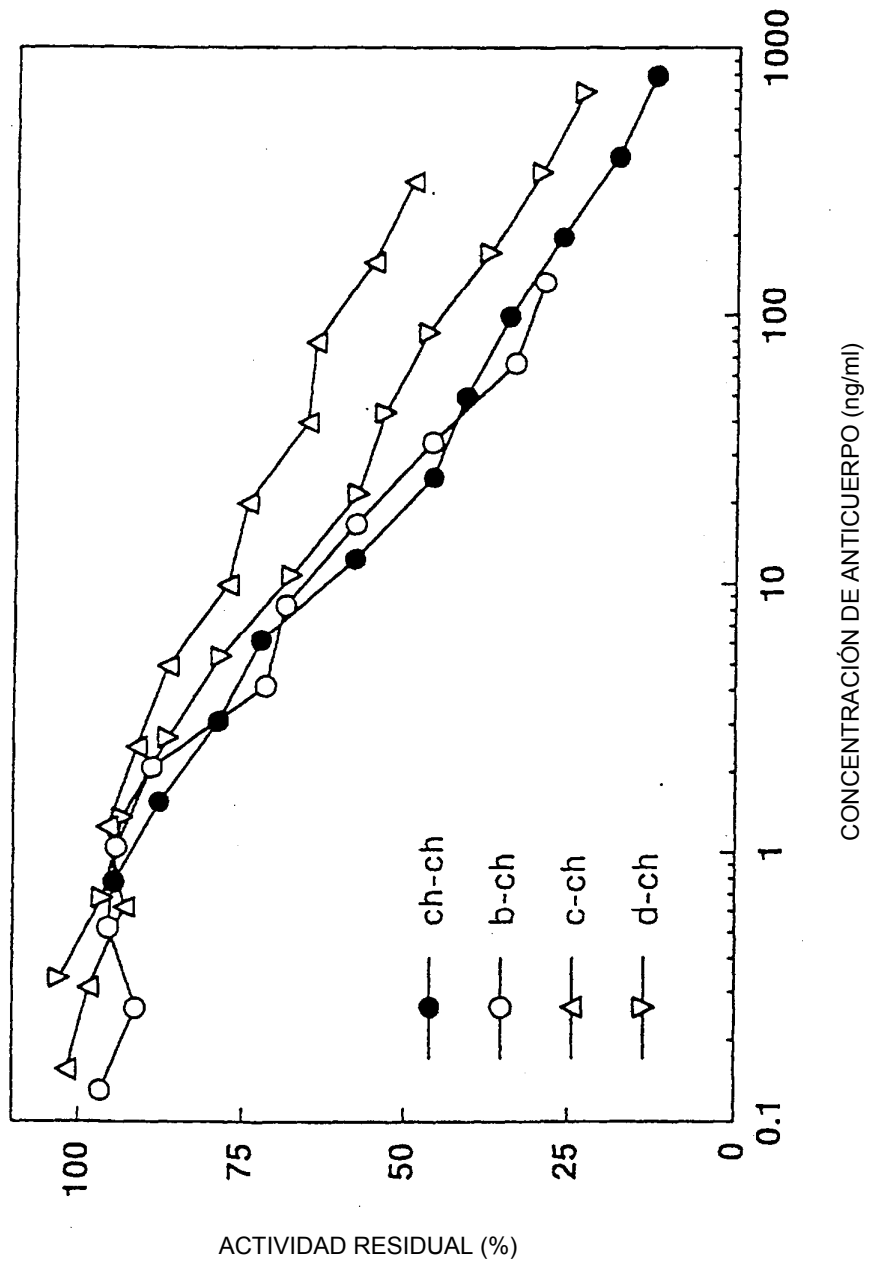


Fig.8

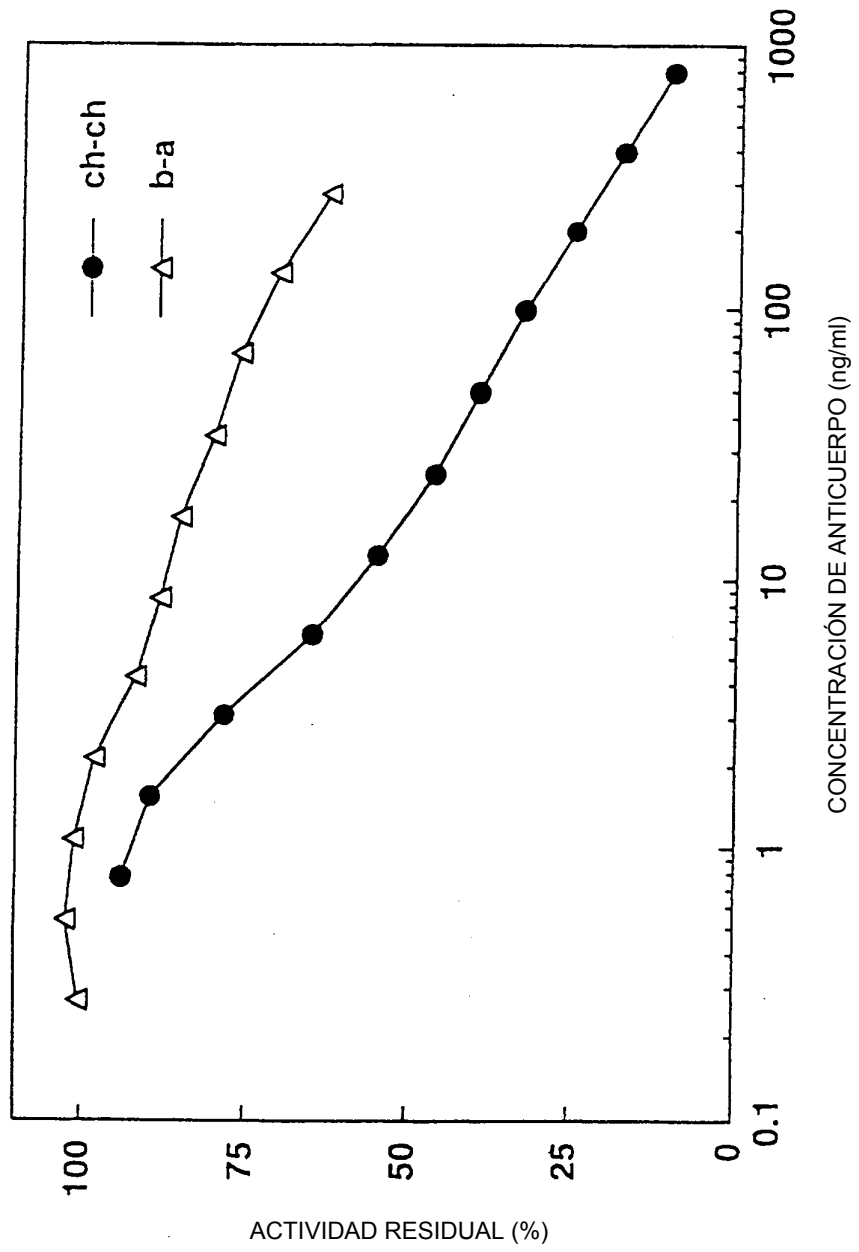


Fig.9

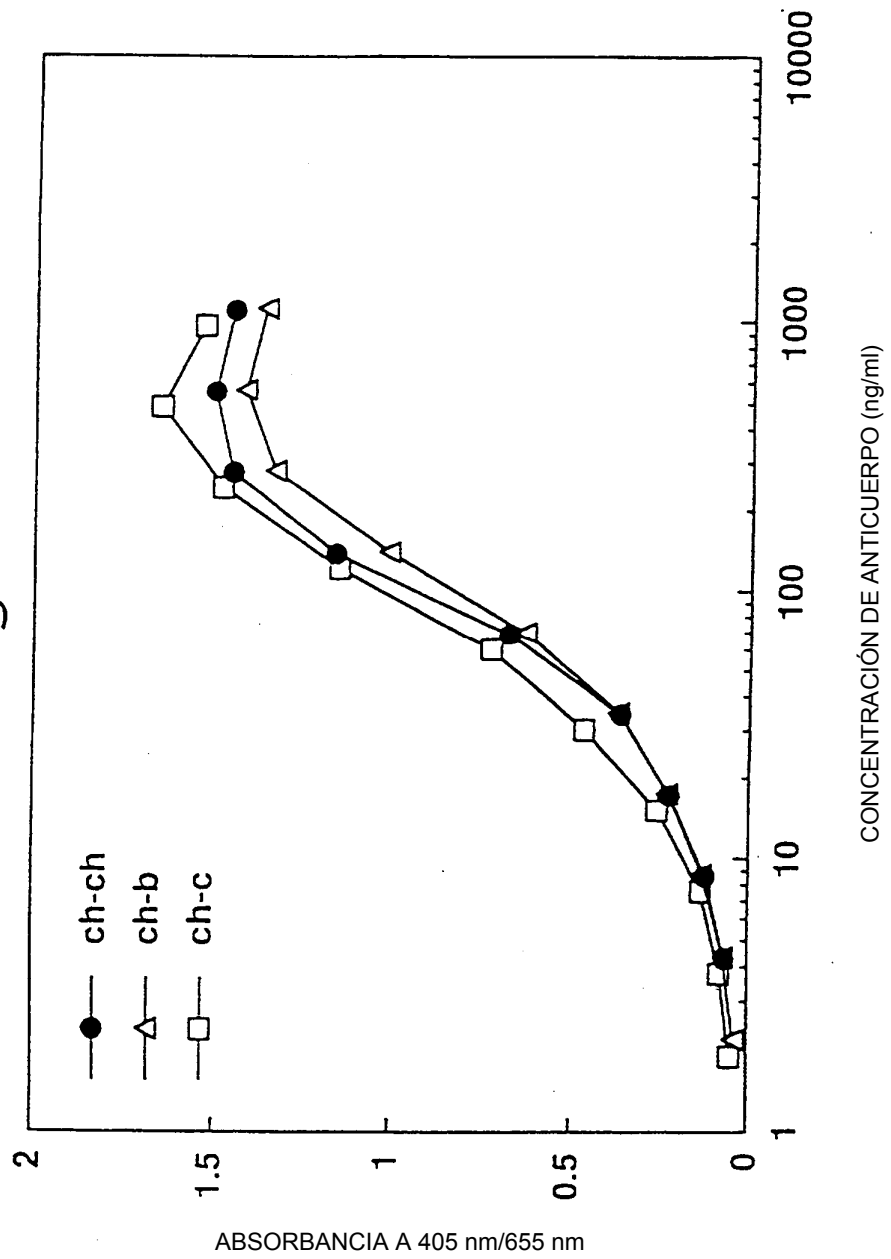


Fig.10

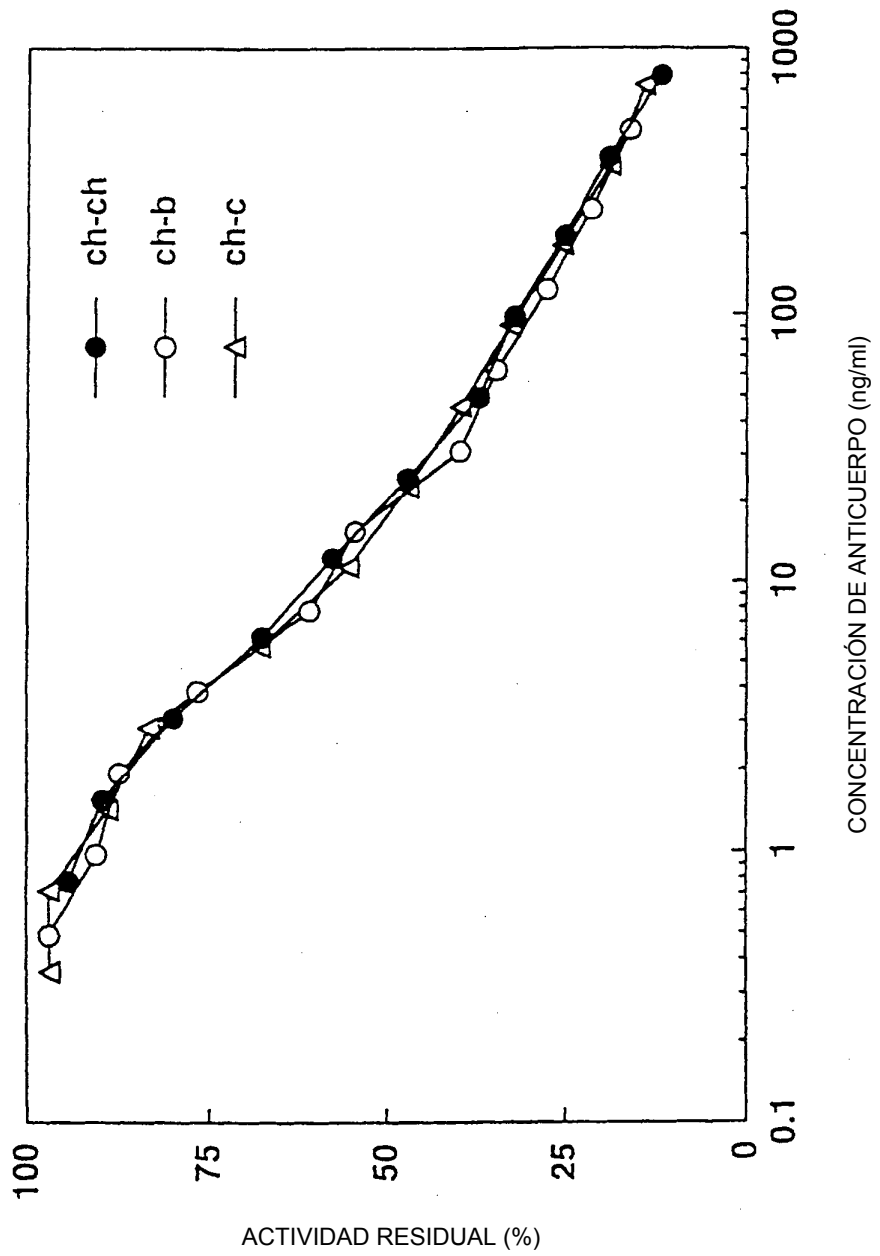


Fig.11

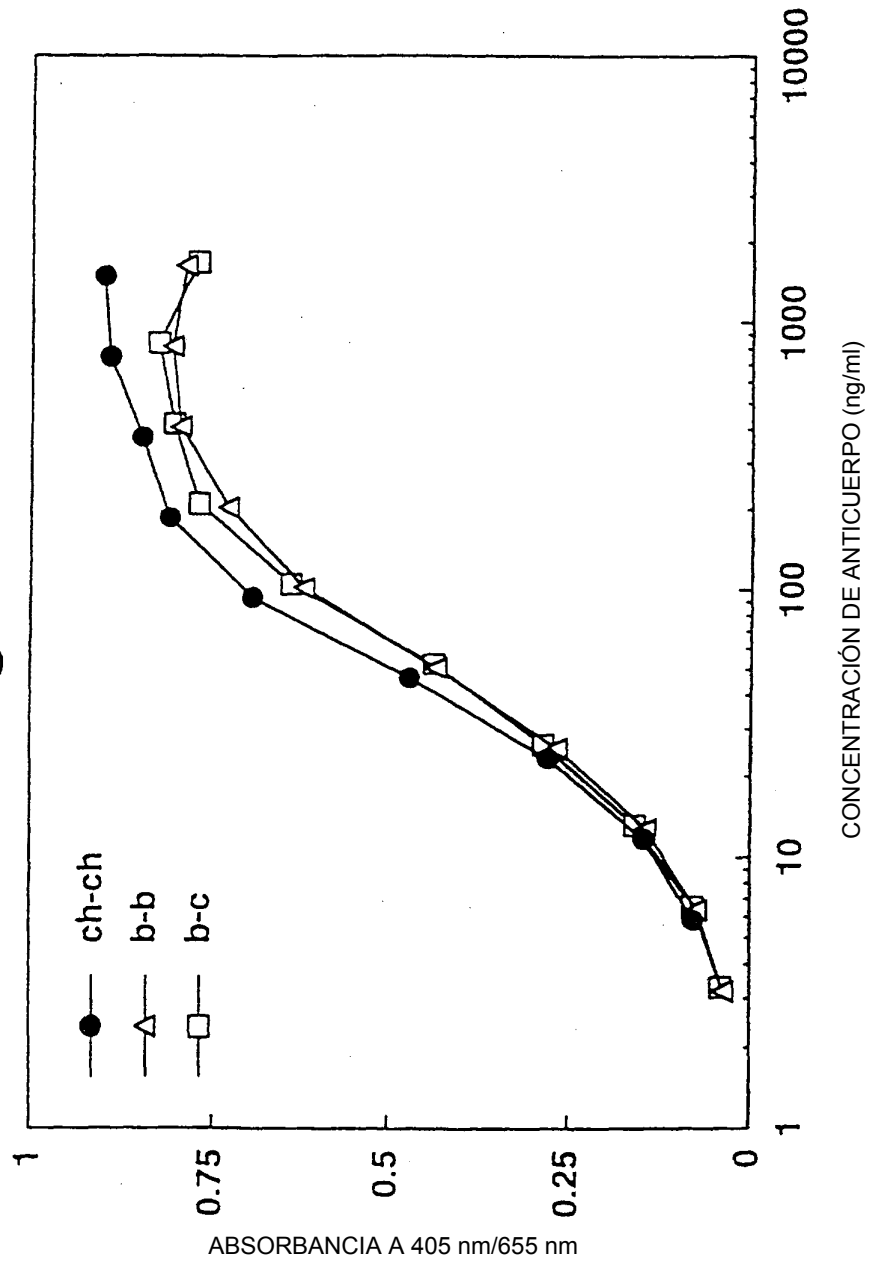


Fig.12

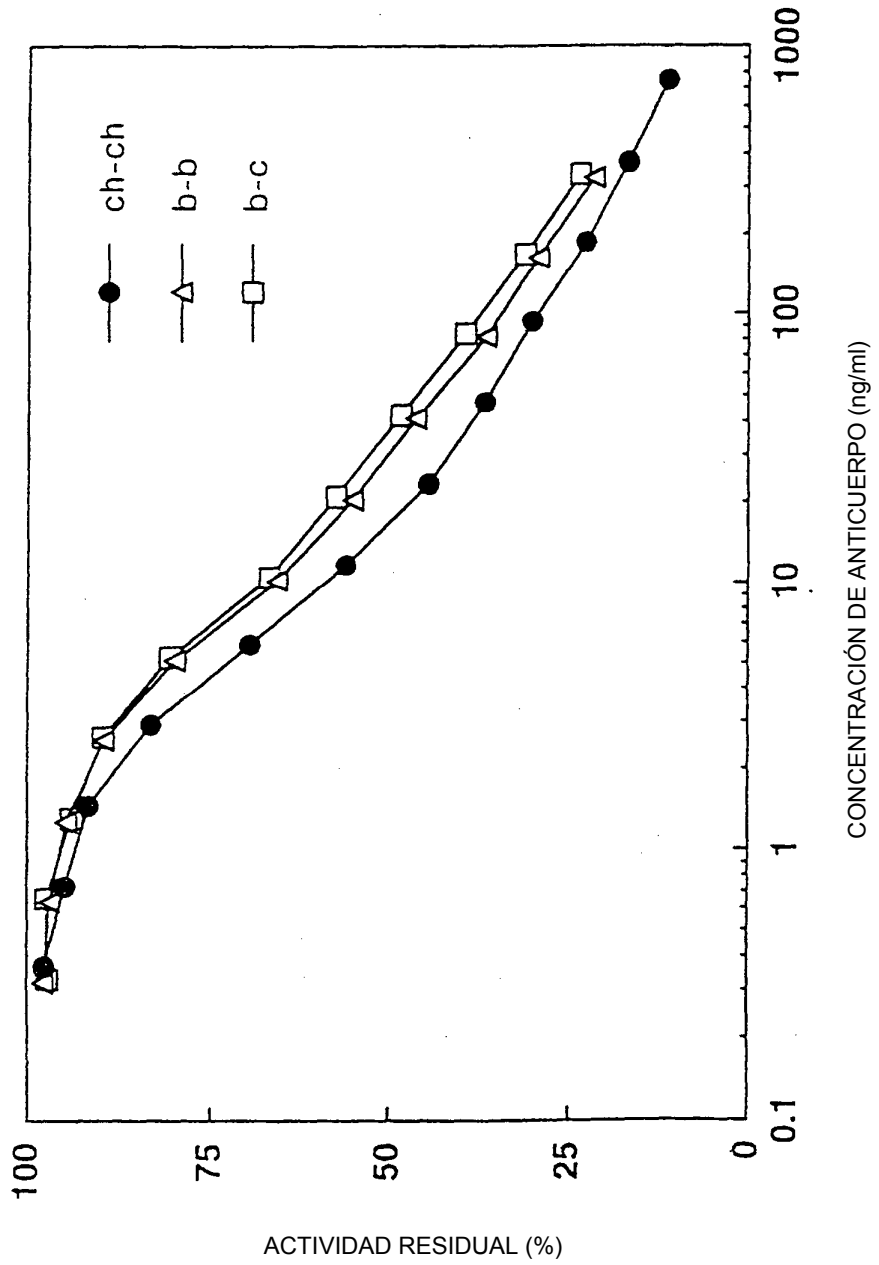


Fig.13

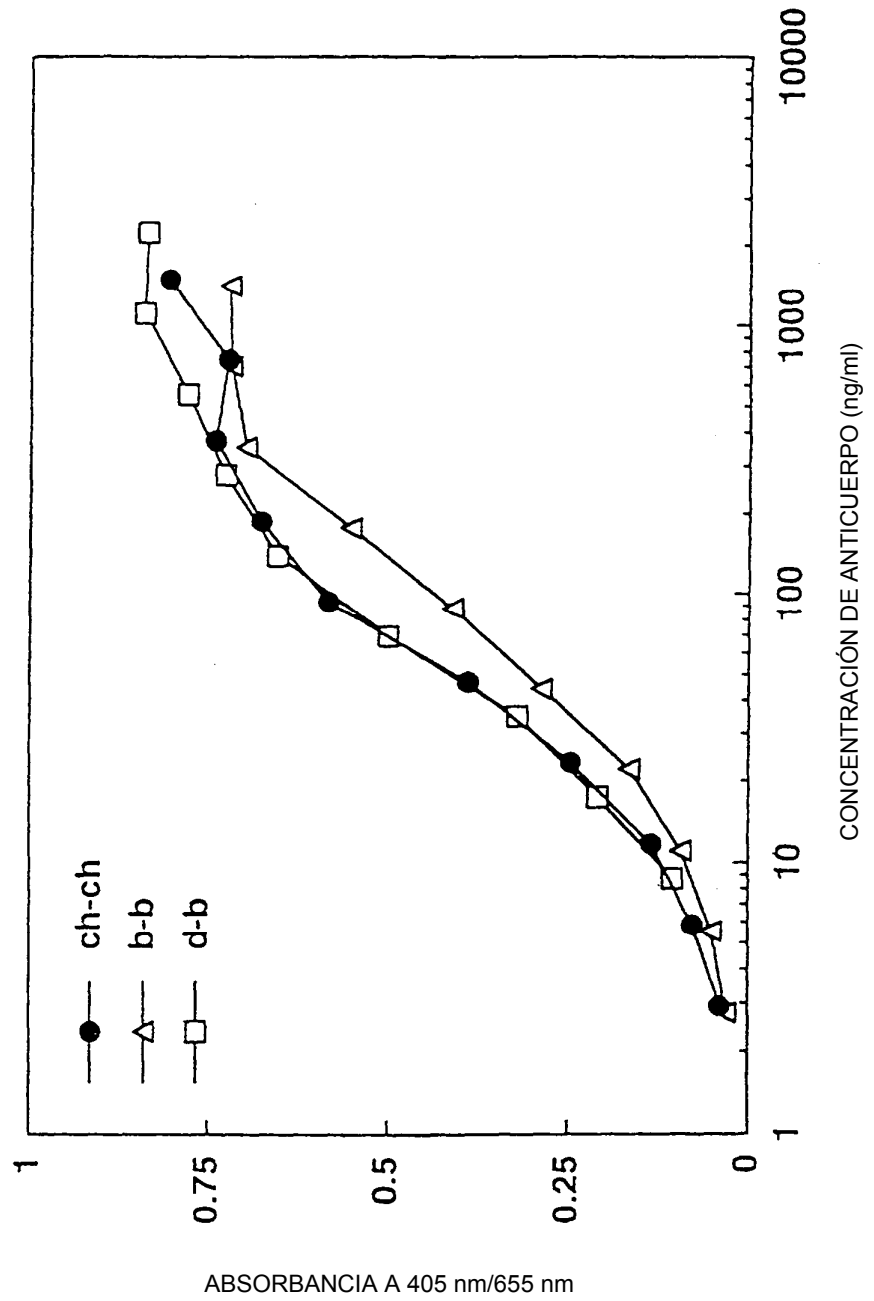


Fig.14

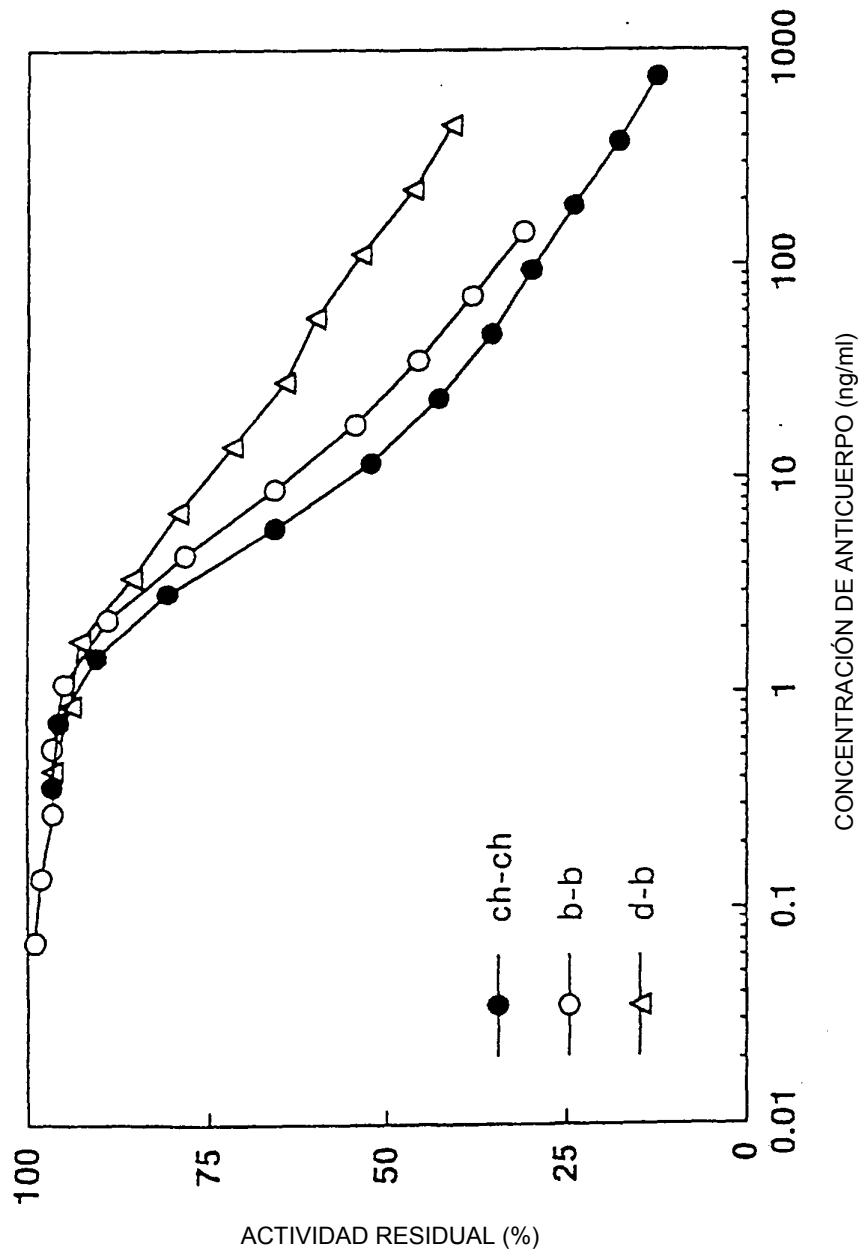


Fig.15

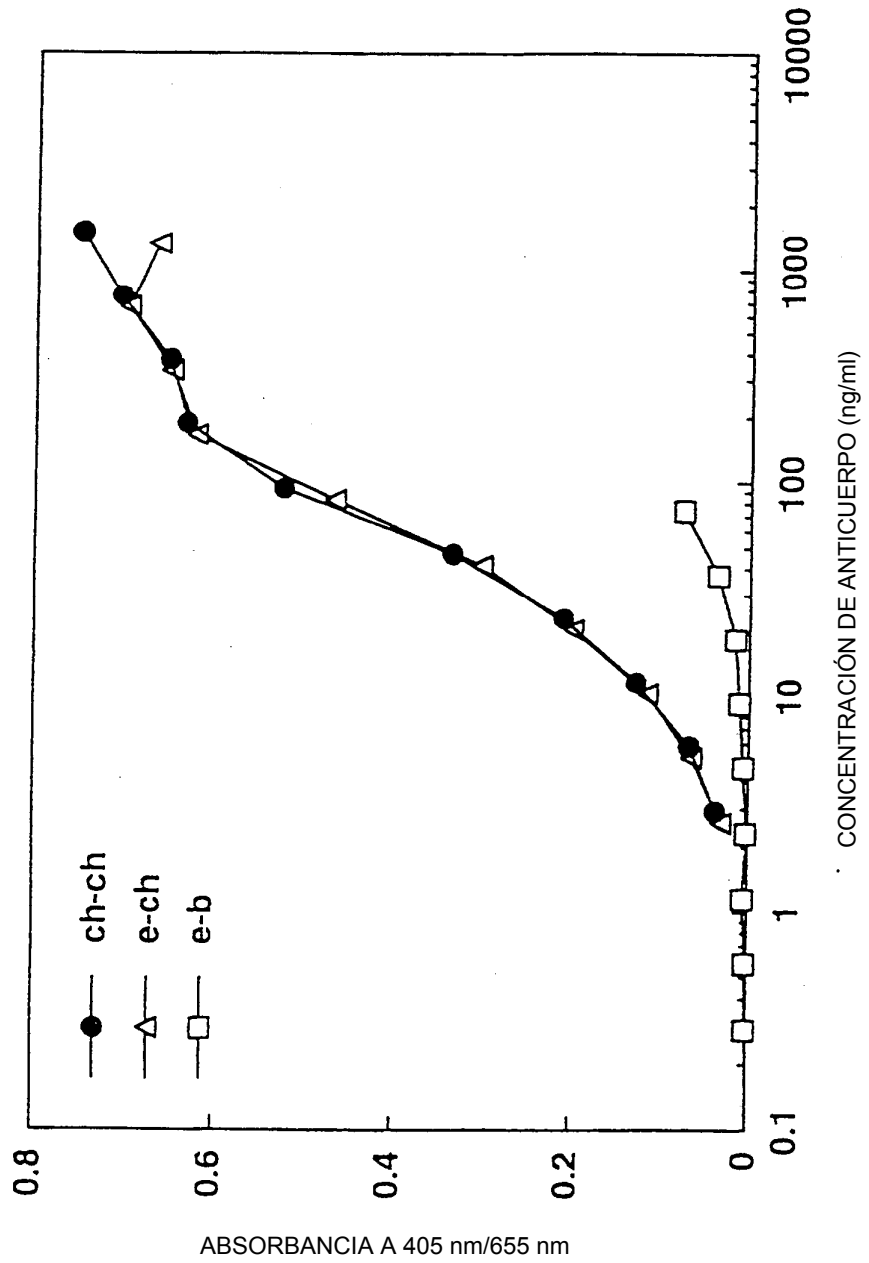


Fig.16

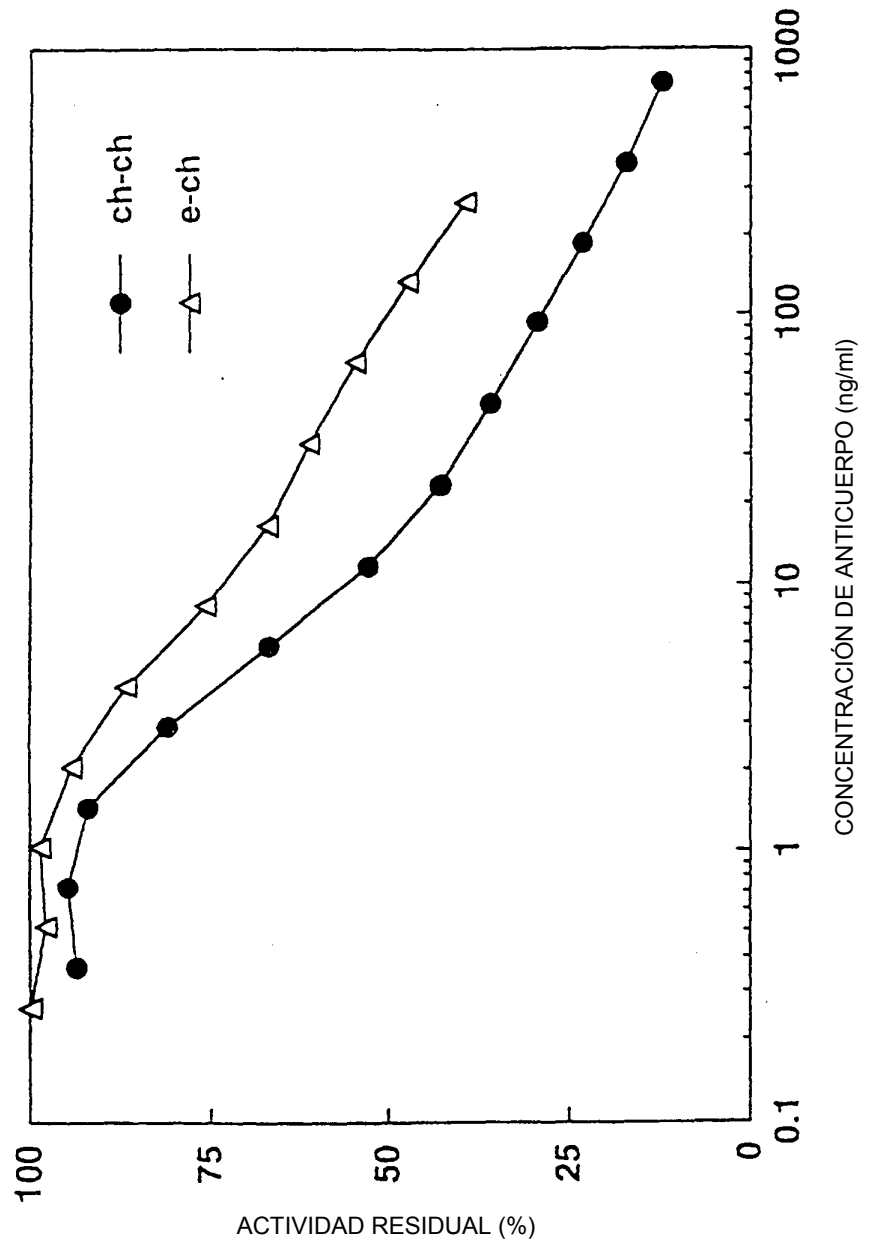


Fig.17

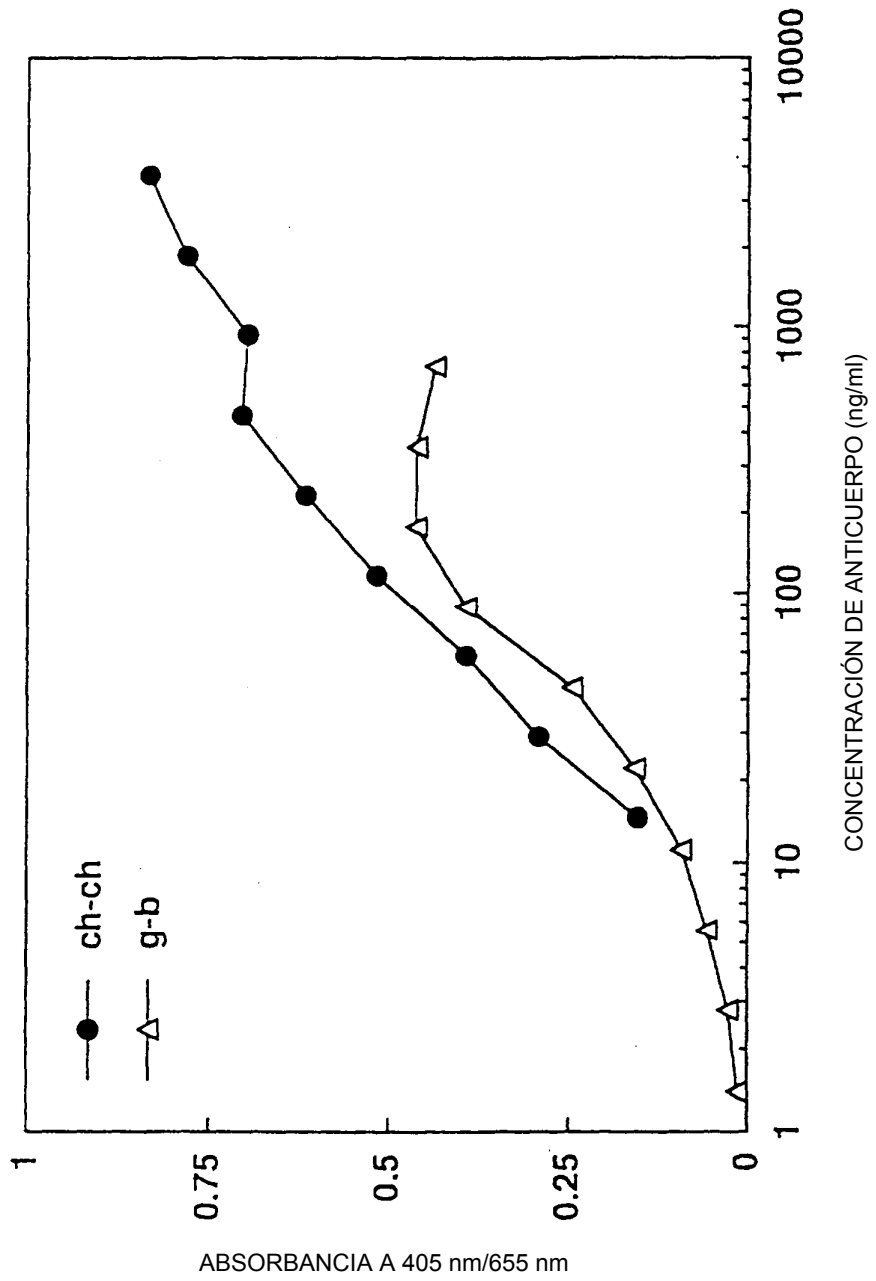


Fig.18

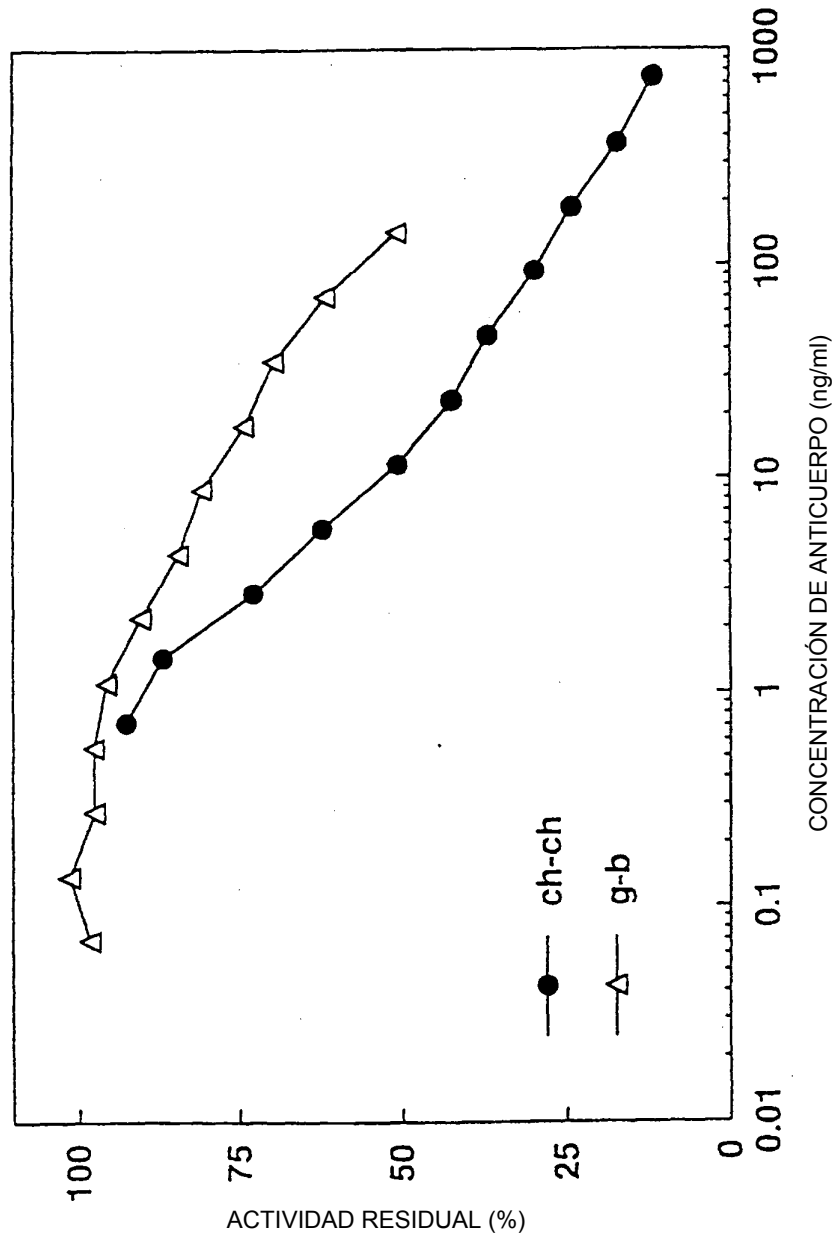


Fig. 19

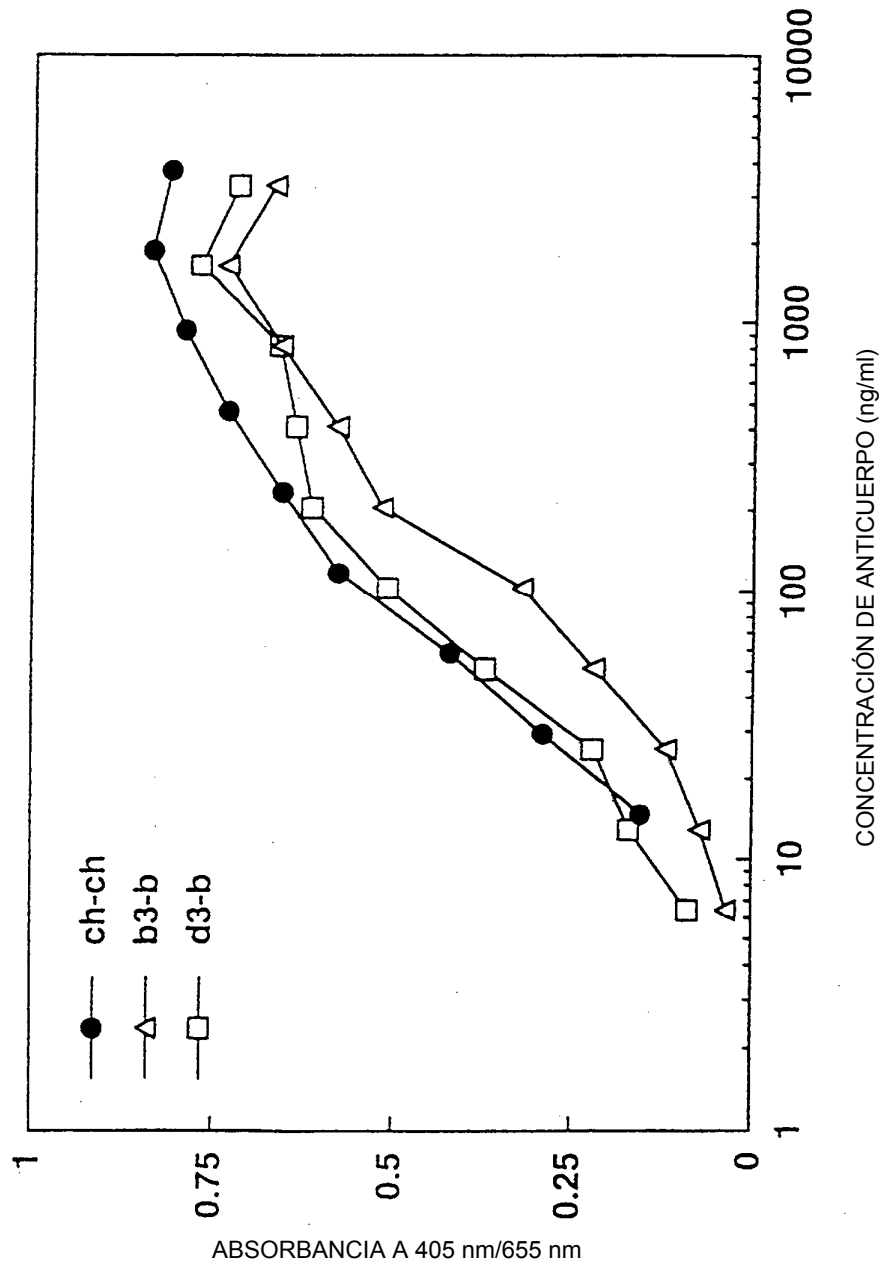


Fig.20

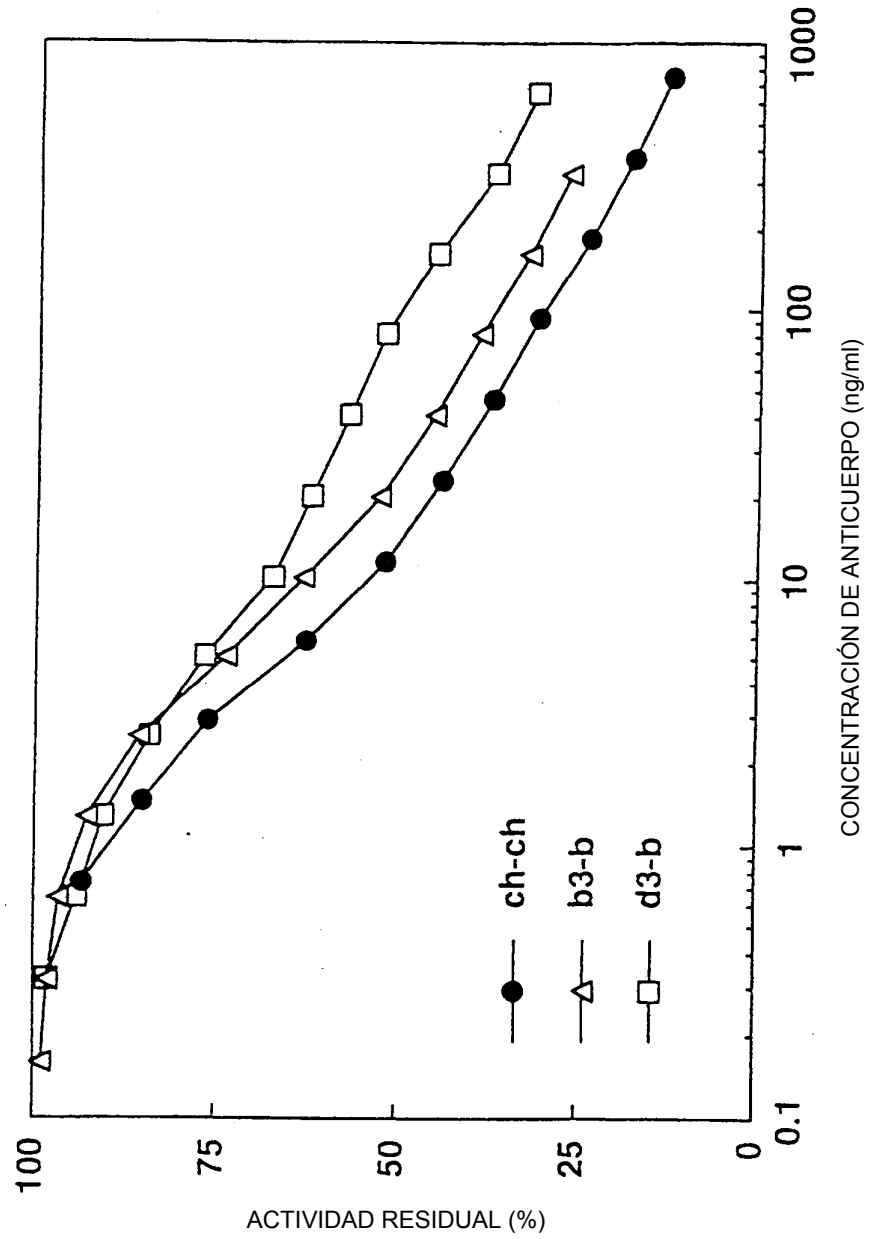


Fig.21

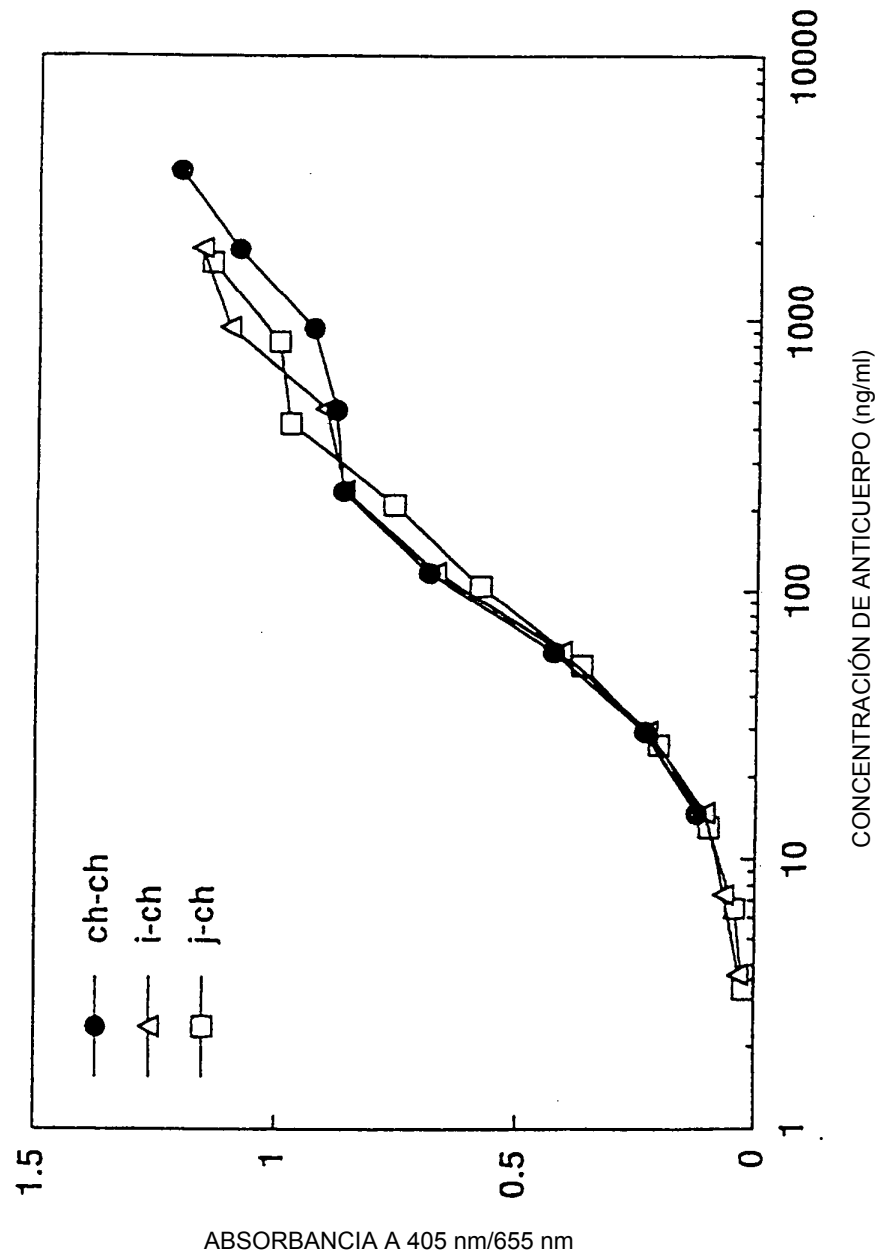


Fig.22

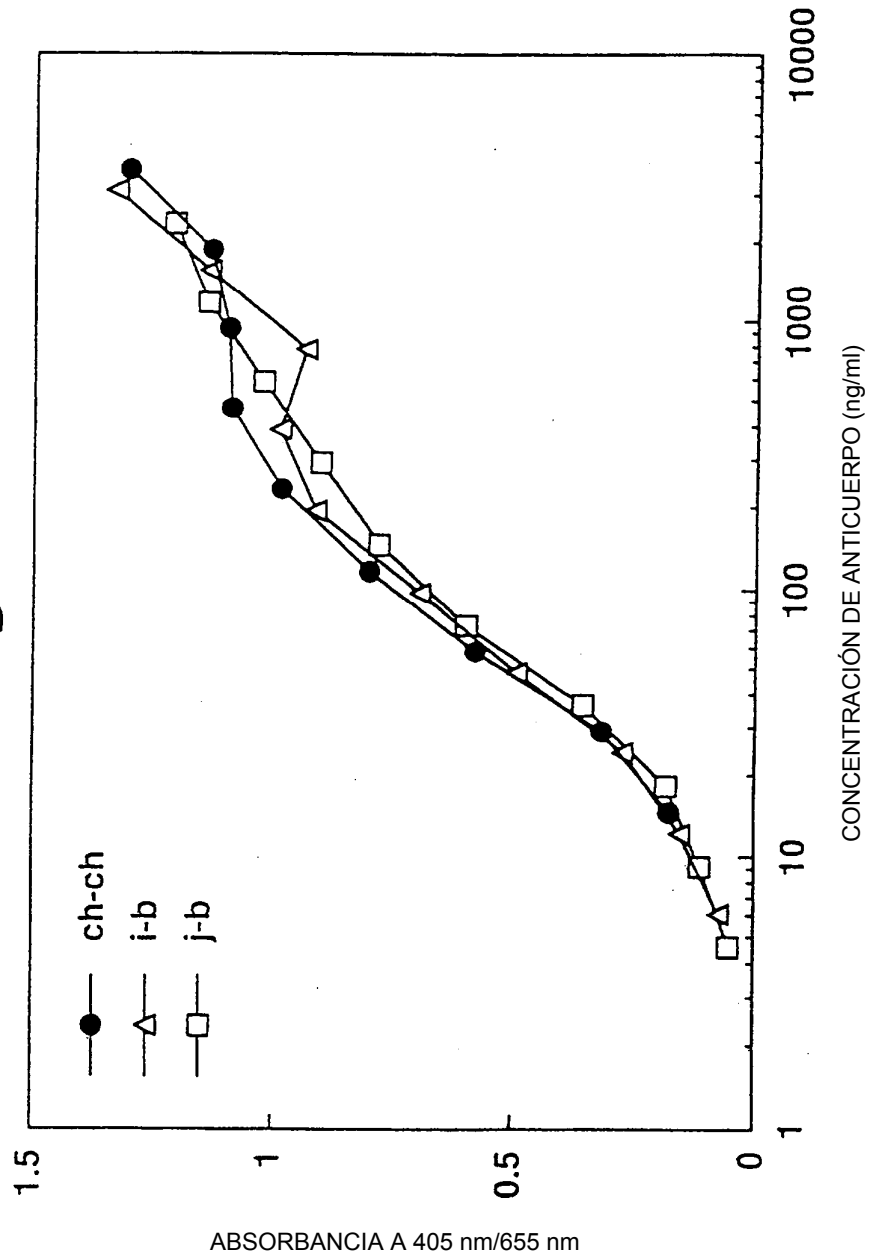


Fig.23

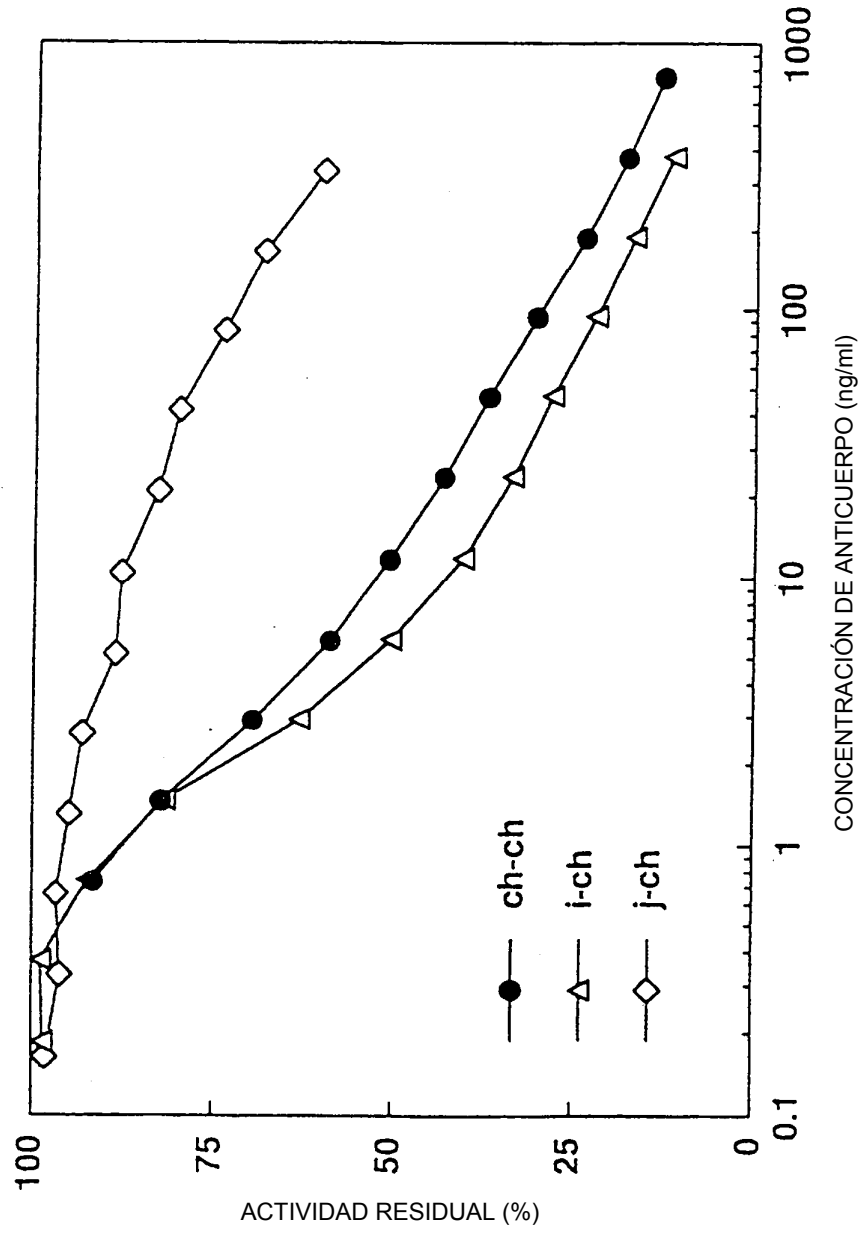


Fig.24

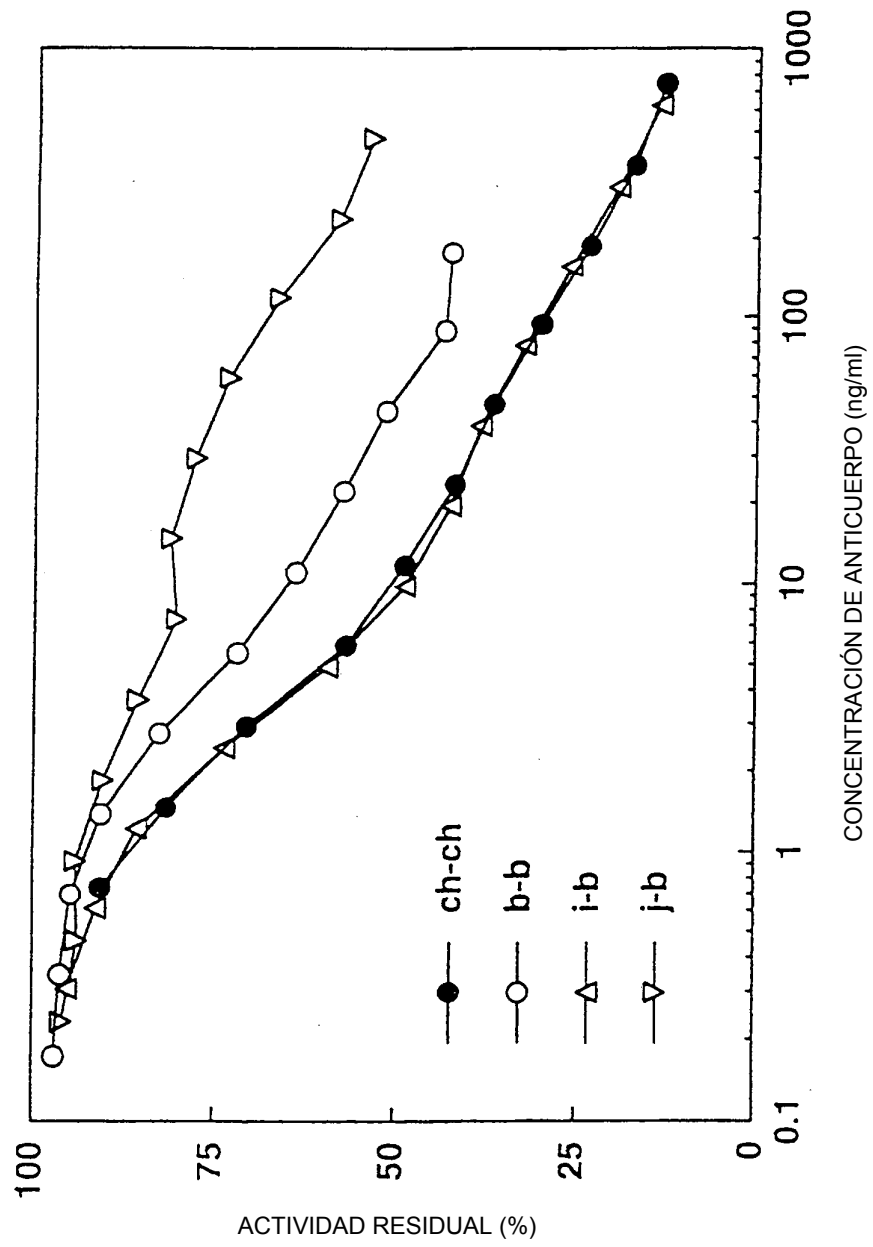


Fig. 25

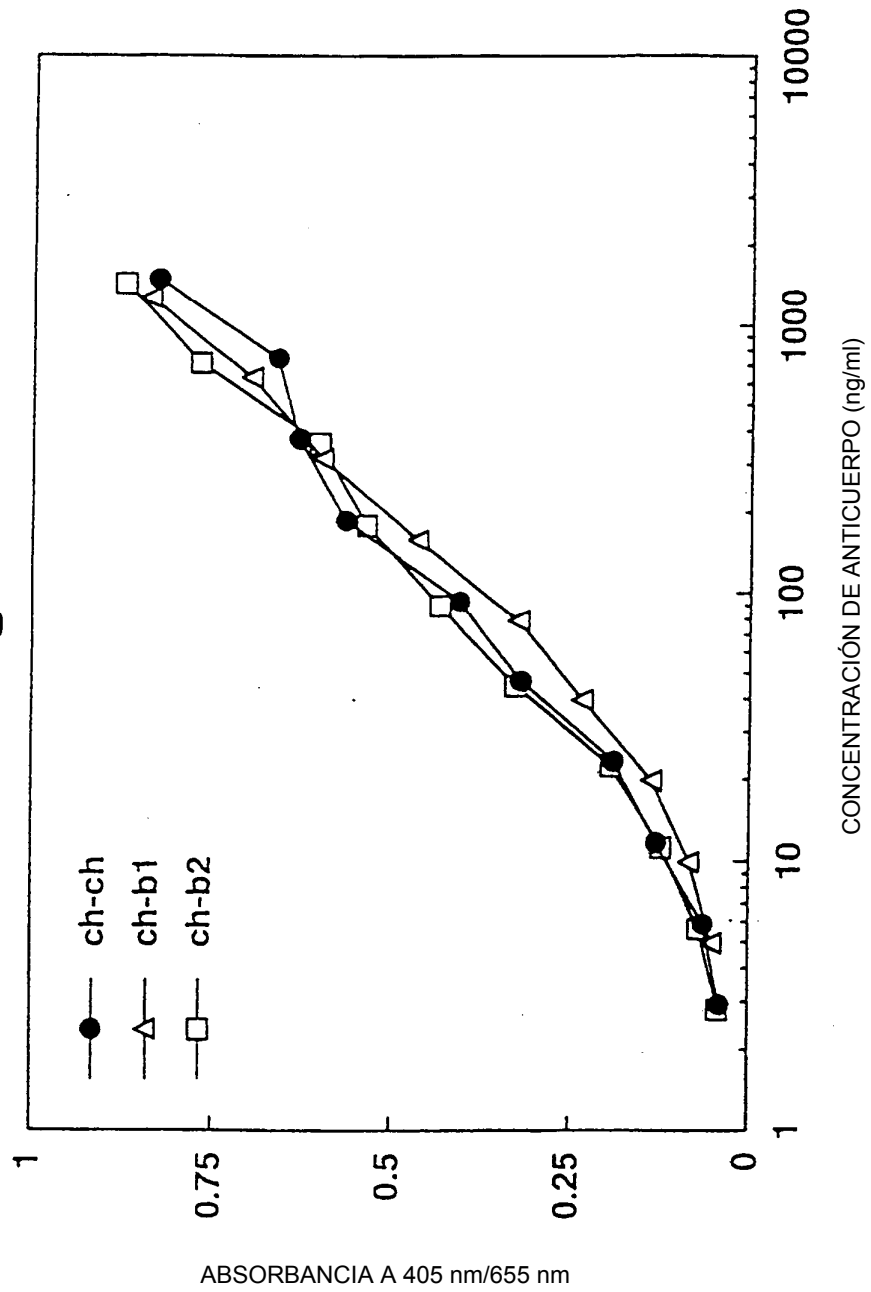


Fig.26

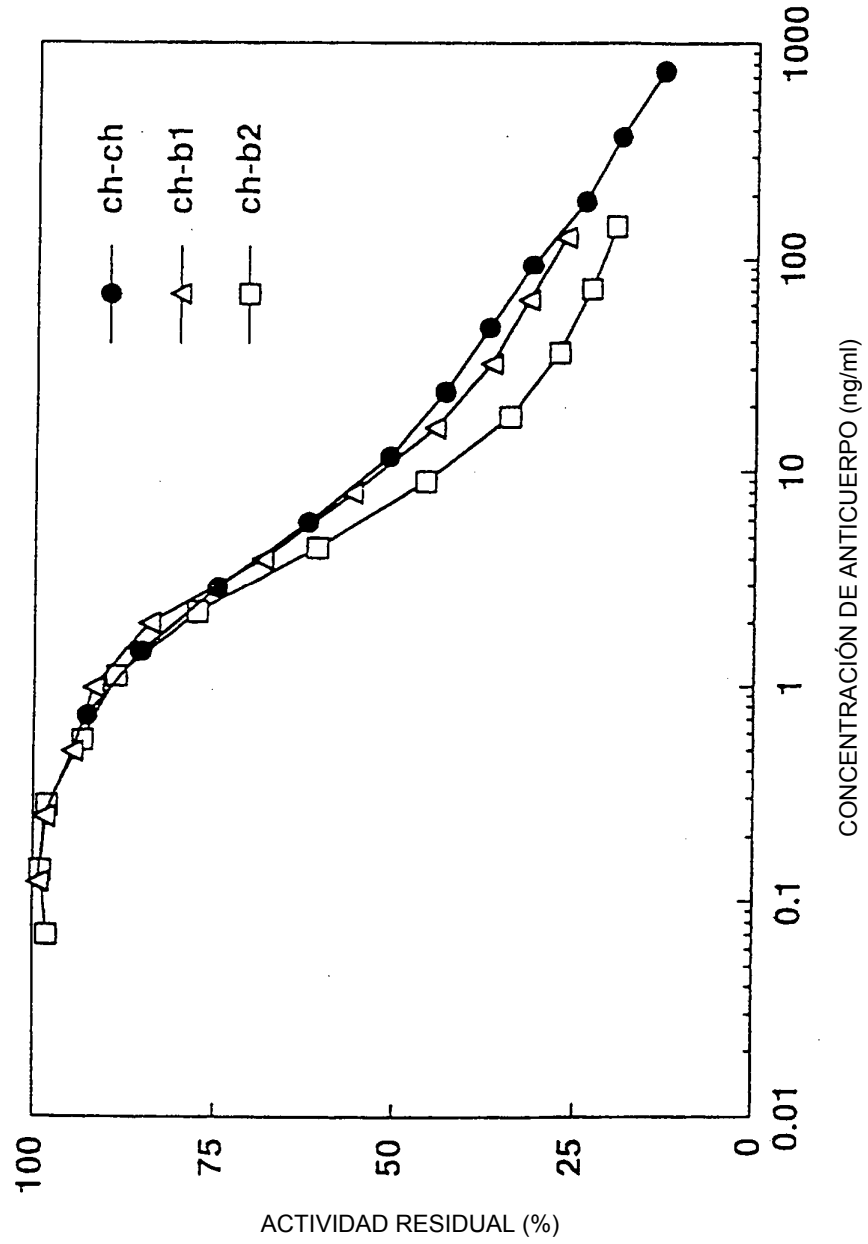


Fig.27

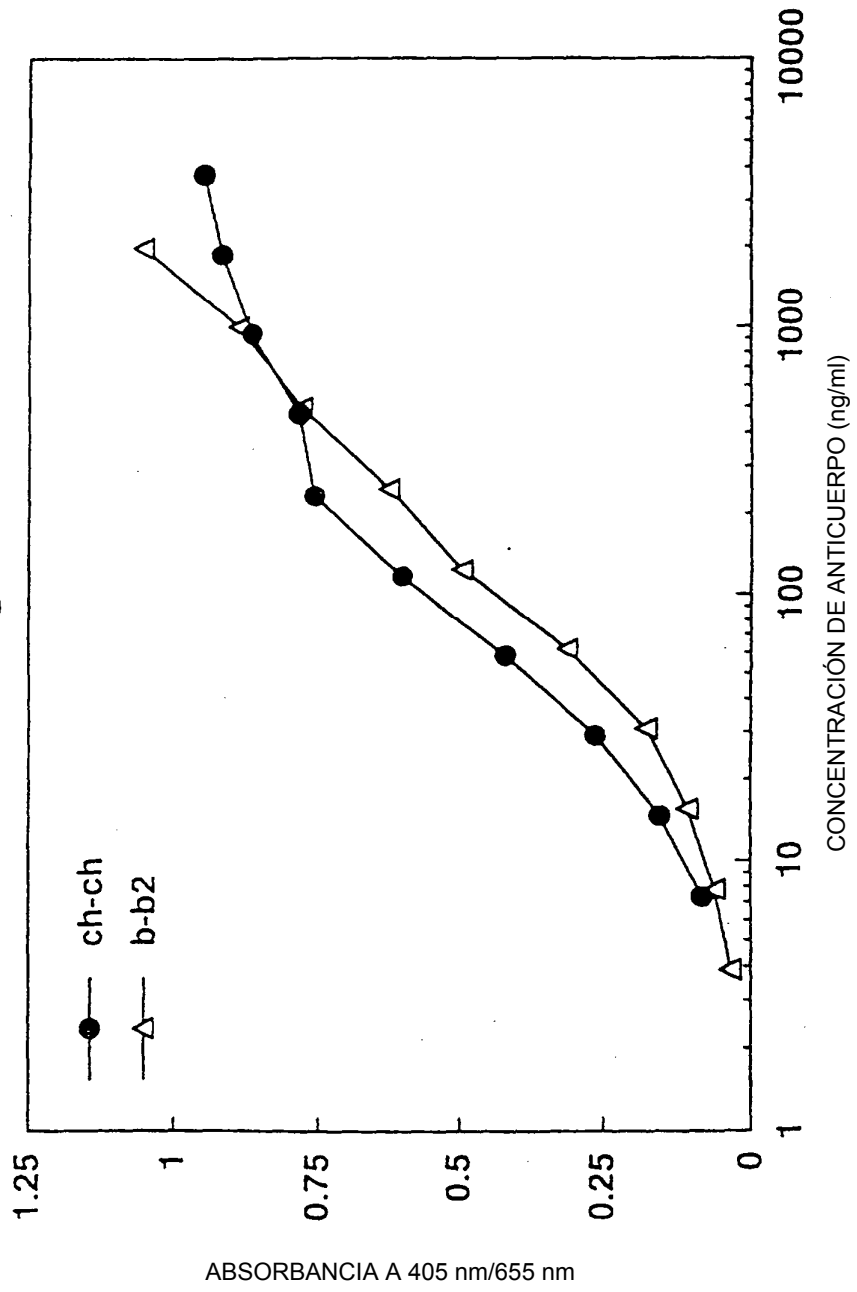


Fig.28

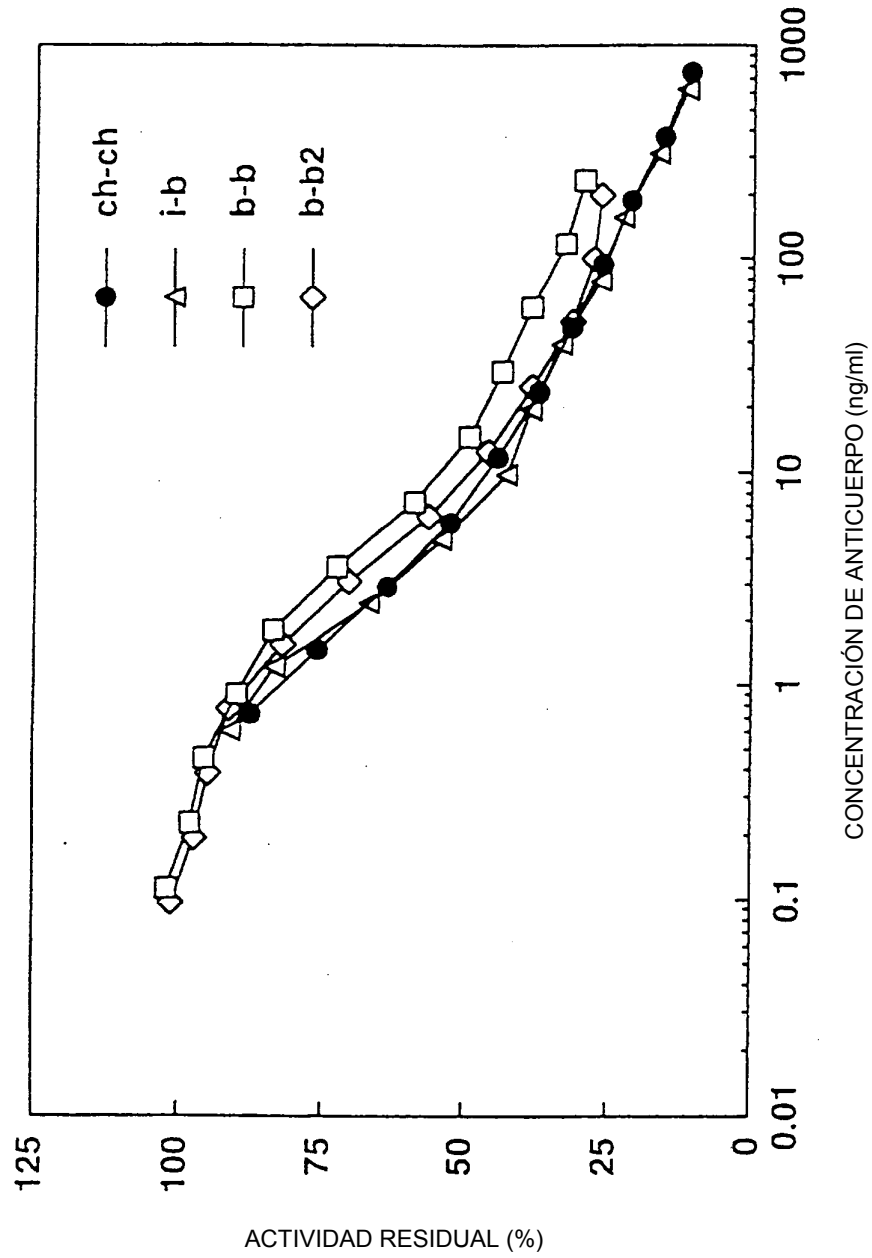


Fig. 29

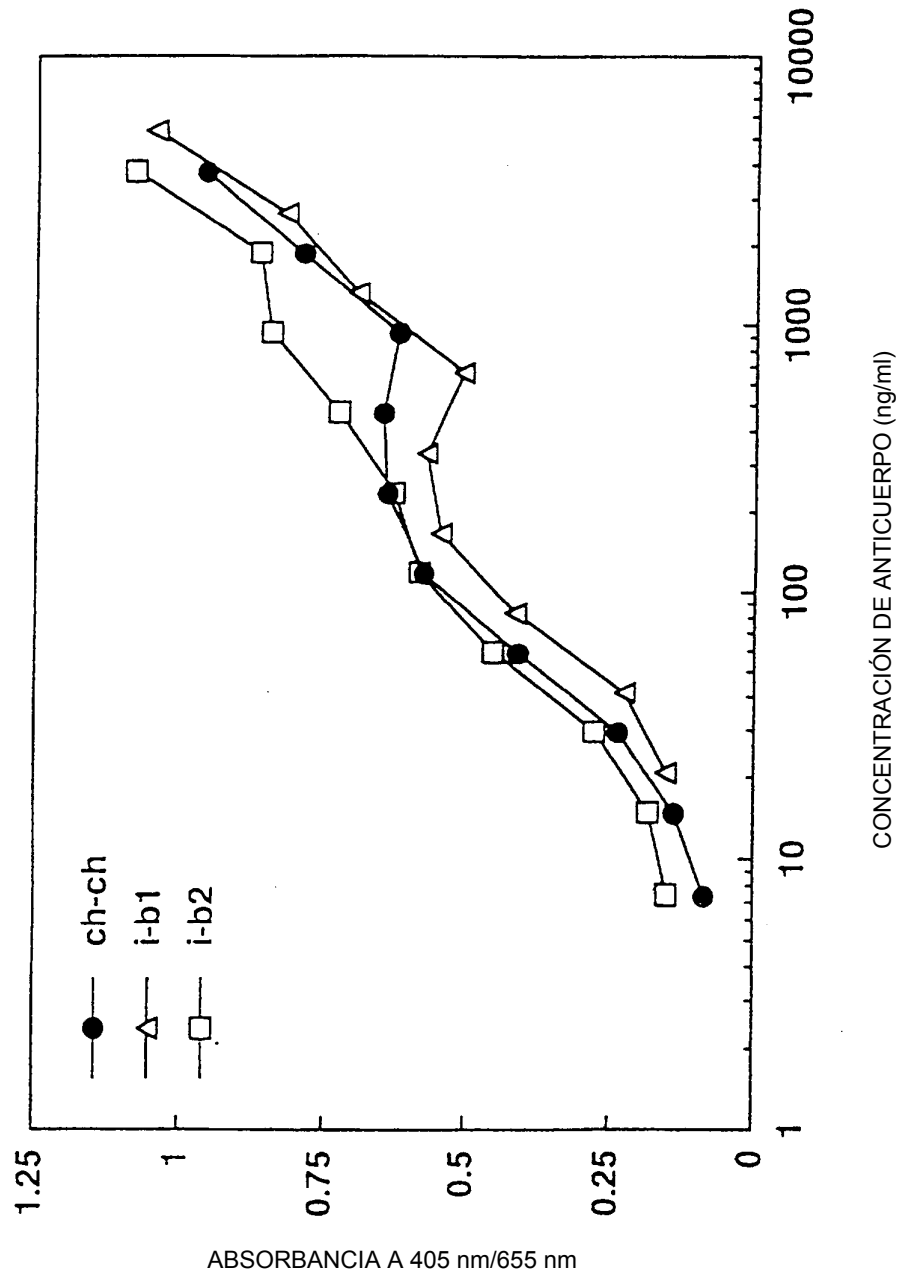


Fig.30

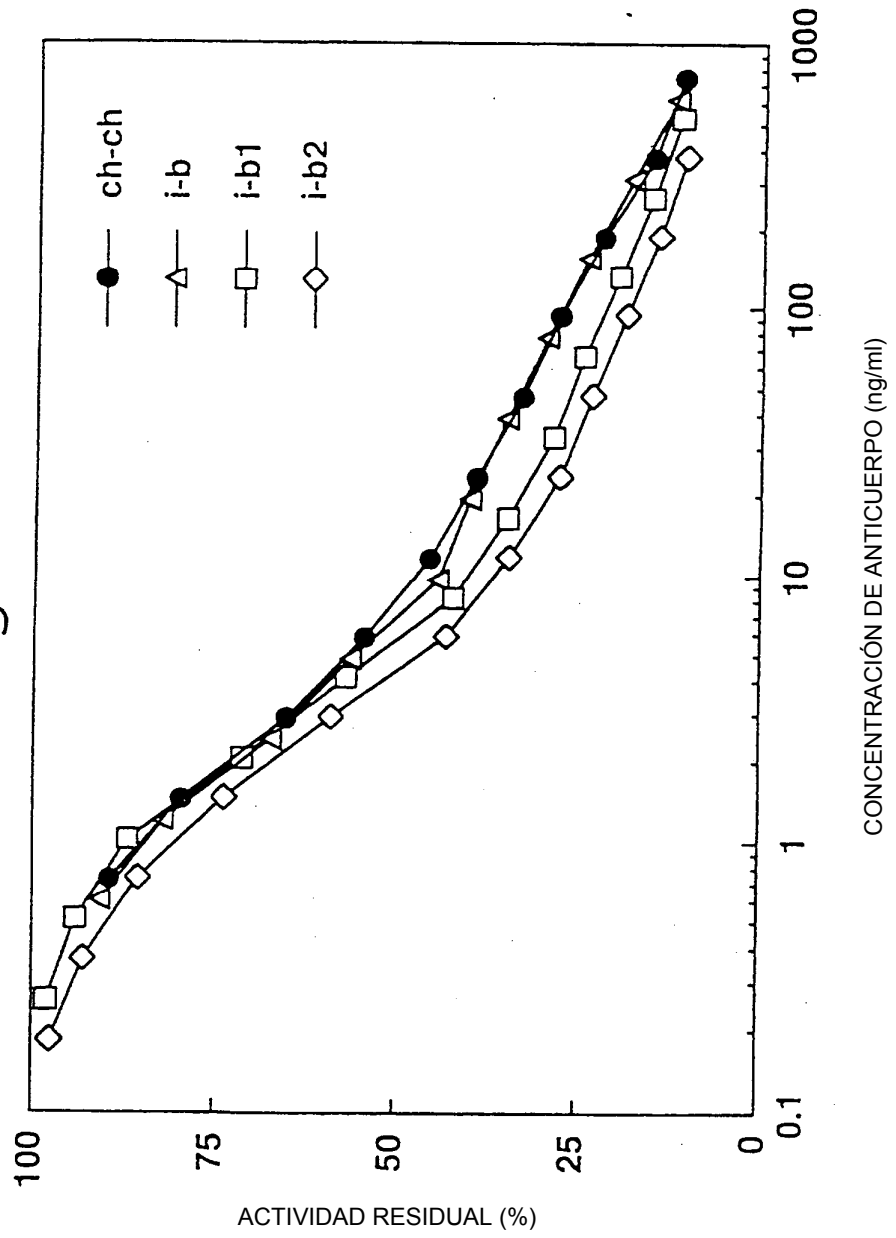


Fig.31

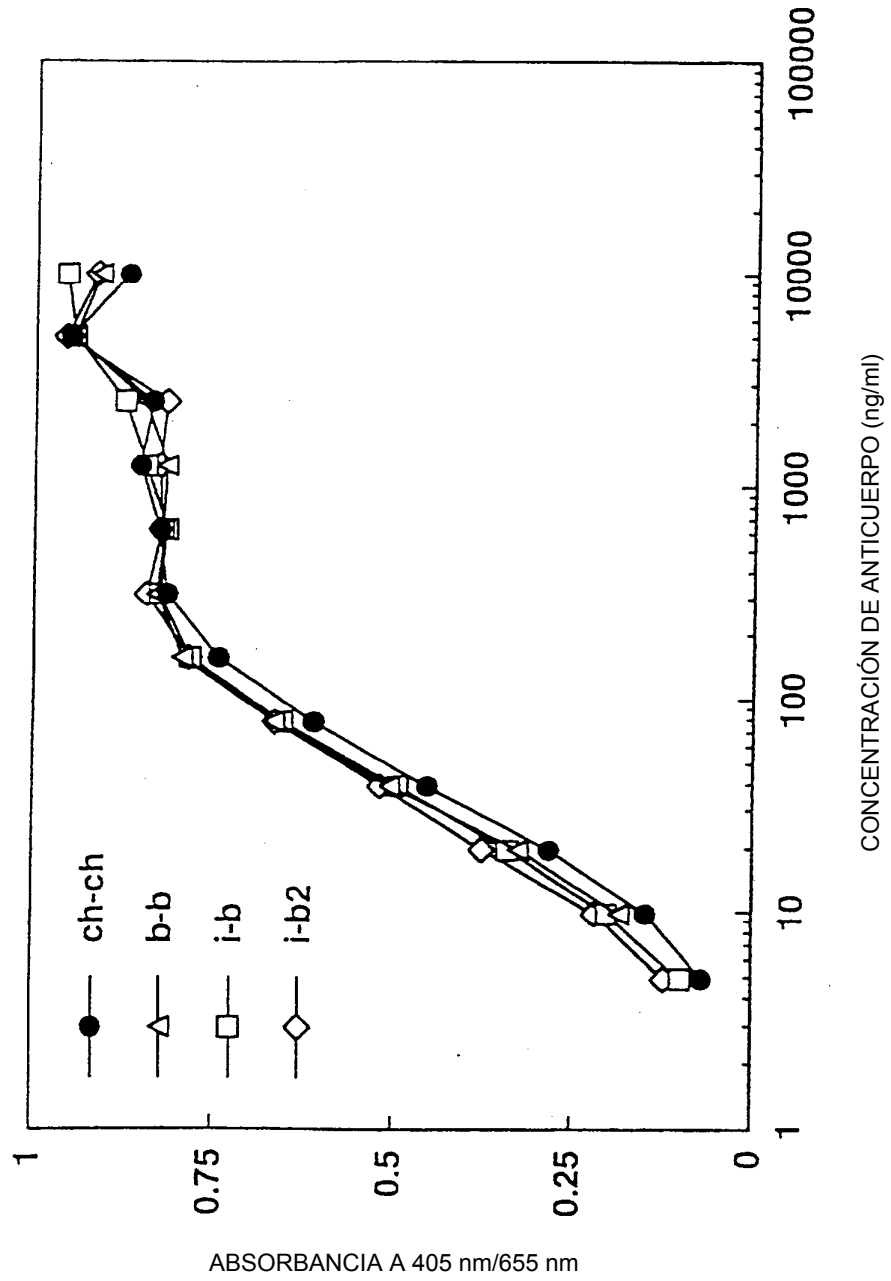


Fig.32

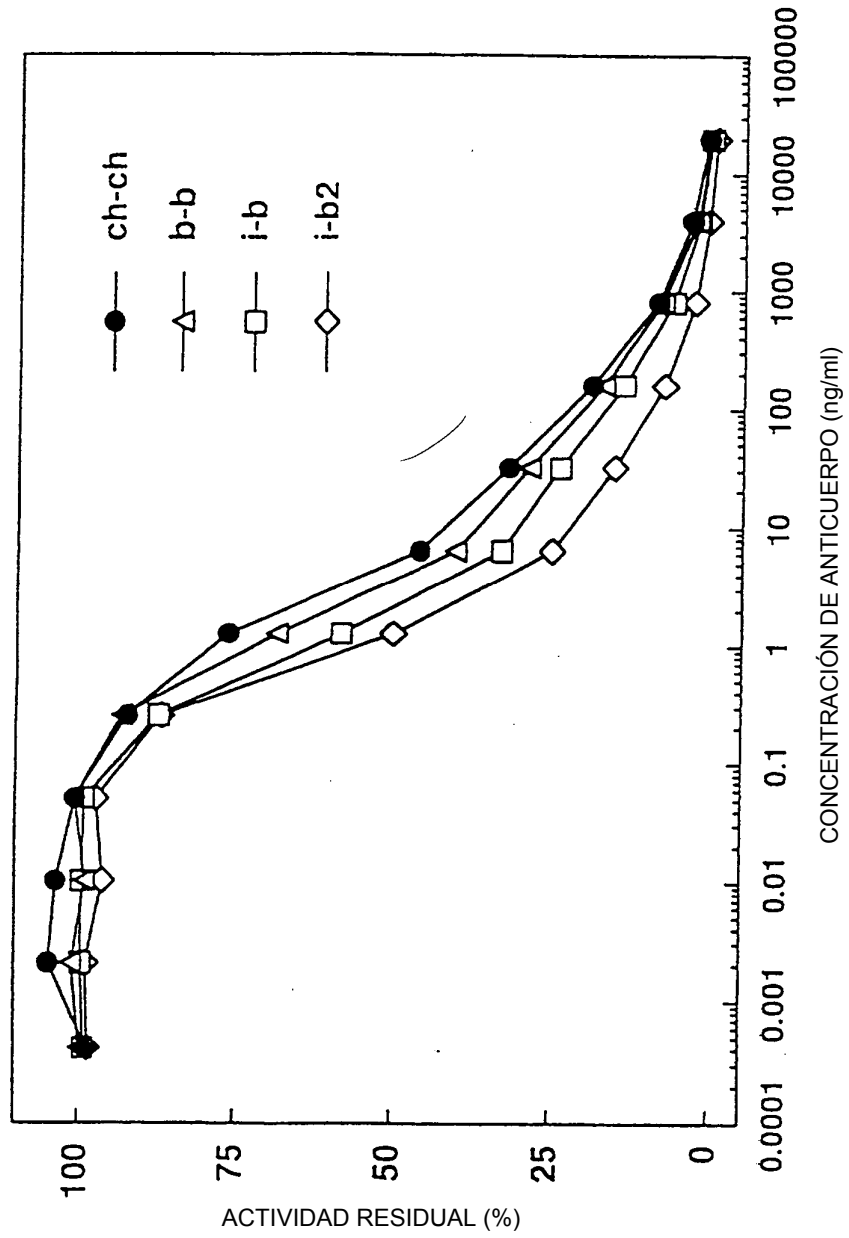


Fig.33

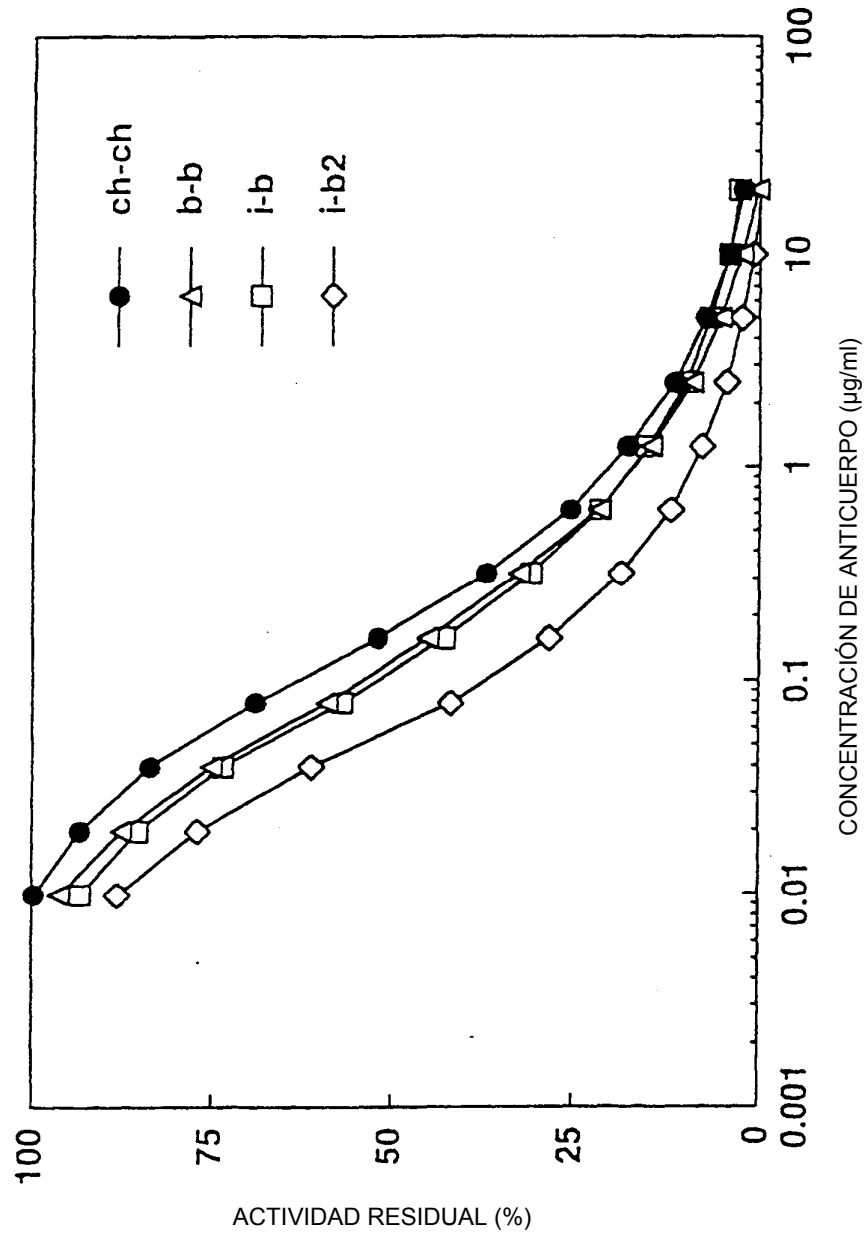


Fig.34

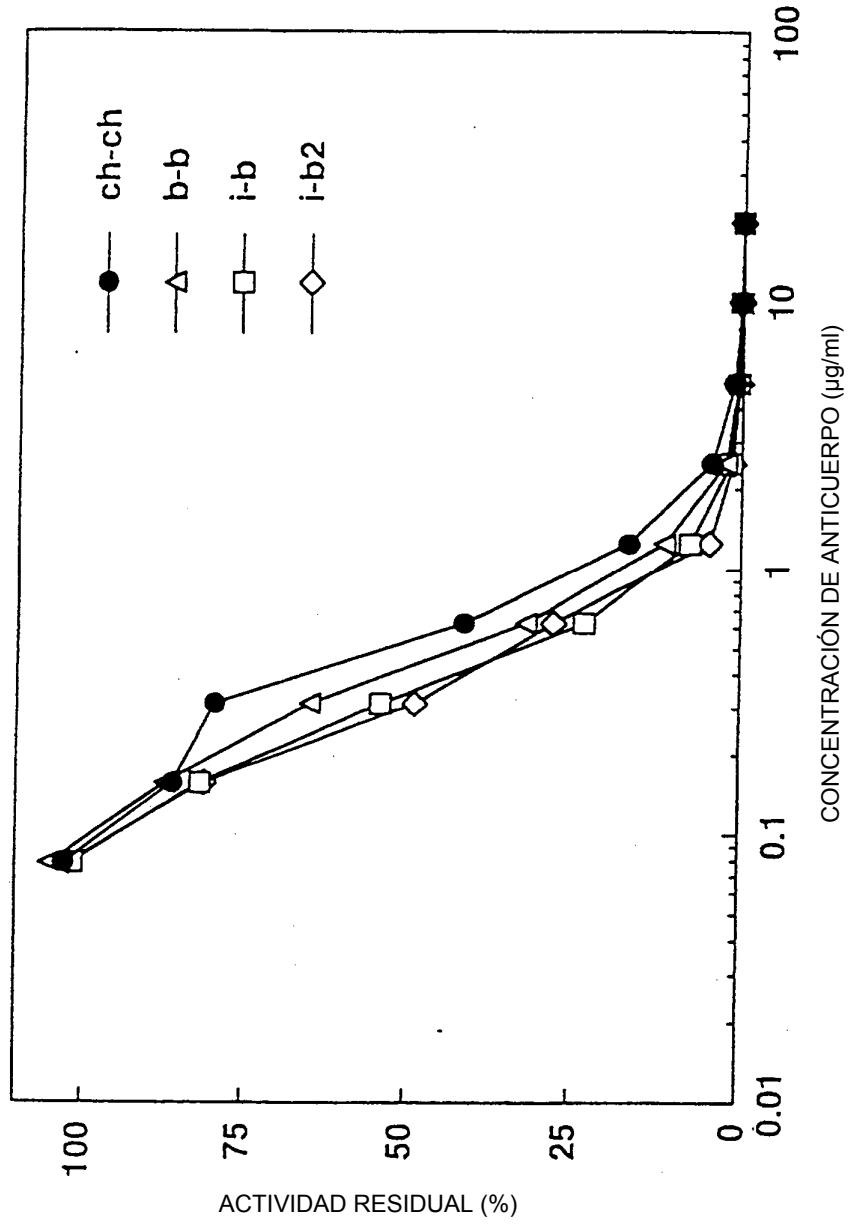


Fig. 35

	<u>Quimera</u>			<u>bb</u>			<u>ib</u>			<u>ib2</u>			<u>Control</u>		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
6ng	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
3ng	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
1.5ng	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

A, TF SIN DESNATURALIZAR
 B, TF DESNATURALIZADO EN
 CONDICIONES NO REDUCTORAS
 C, TF DESNATURALIZADO EN
 CONDICIONES REDUCTORAS