

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 554**

51 Int. Cl.:
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02711860 .3**
96 Fecha de presentación: **11.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1421191**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **ANTICUERPOS HUMANIZADOS ESPECÍFICOS PARA TANTO CD45RB COMO CD45RO.**

30 Prioridad:
12.02.2001 GB 0103389

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**AVERSA, Gregorio;
KOLBINGER, Frank;
CARBALLIDO HERRERA, José, M.;
ASZÓDI, András;
SALDANHA, José, W. y
HALL, Bruce, M.**

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

ES 2 374 554 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

Anticuerpos humanizados específicos para tanto CD45RB como CD45RO

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados contra isoformas del antígeno CD45, tales como por ejemplo anticuerpos monoclonales (AcM).

Antecedentes de la invención

Un enfoque en el tratamiento de una variedad de enfermedades es lograr la eliminación o la inactivación de leucocitos patógenos y la posibilidad de inducción de tolerancia para inactivar respuestas inmunitarias patológicas.

10 Se cree que el rechazo de trasplantes de órganos, células y tejidos y las diversas enfermedades autoinmunitarias son principalmente el resultado de la respuesta inmunitaria mediada por células T desencadenada por células T auxiliares que pueden reconocer antígenos específicos que se capturan, procesan y presentan a las células T auxiliares por células presentadoras de antígenos (APC) tales como macrófagos y células dendríticas, en forma de un complejo de antígeno-CMH, es decir, las células T auxiliares, cuando reconocen antígenos específicos, se estimulan a producir citocinas tales como IL-2 y a expresar o regular por incremento algunos receptores de citocinas y otras moléculas de activación y a proliferar. Algunas de estas células T auxiliares pueden actuar directa o indirectamente, es decir, ayudando a células B o células T citotóxicas efectoras a destruir células o tejidos que expresan el antígeno seleccionado. Tras la terminación de la respuesta inmunitaria, algunas de las células seleccionadas clonalmente maduras permanecen como células T citotóxicas de memoria y auxiliares de memoria, que circulan por el cuerpo y reconocen rápidamente el antígeno si aparece de nuevo. Si el antígeno que desencadena esta respuesta es un antígeno medioambiental inocuo, el resultado es alergia, si el antígeno no es un antígeno foráneo, si no un antígeno propio, puede dar como resultado enfermedad autoinmunitaria; si el antígeno es un antígeno de un órgano transplantado, el resultado puede ser rechazo del injerto.

25 El sistema inmunitario se ha desarrollado para reconocer lo propio de lo no propio. Esta propiedad permite a un organismo sobrevivir en un entorno expuesto a la exposición diaria de patógenos. Esta especificidad para lo no propio y tolerancia hacia lo propio surge durante el desarrollo del repertorio de células T en el timo a través de procesos de selección positiva y negativa, que también comprenden el reconocimiento y la eliminación de células T autorreactivas. Este tipo de tolerancia se denomina tolerancia central. Sin embargo, algunas de estas células autorreactivas escapan de este mecanismo selectivo y representan un peligro potencial para el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Para controlar las células T autorreactivas que han escapado a la periferia, el sistema inmunitario tiene mecanismos reguladores periféricos que proporcionan protección contra la autoinmunidad. Estos mecanismos son una base para la tolerancia periférica.

30 Los antígenos de la superficie celular reconocidos por AcM específicos se designan generalmente por un número de CD (grupo de diferenciación) asignado por talleres de tipificación de leucocitos internacionales sucesivos y el término CD45 aplicado en el presente documento se refiere al antígeno común de leucocitos de la superficie celular CD45; y un AcM frente a ese antígeno se designa en el presente documento como "anti-CD45".

40 El antígeno común de leucocitos (LCA) o CD45 es el componente principal de la globulina anti-linfocitos (ALG). CD45 pertenece a la familia de tirosina fosfatasas transmembrana y es un regulador tanto positivo como negativo de la activación celular, dependiendo de la interacción del receptor. La actividad fosfatasa de CD45 parece requerirse para la activación de cinasas de la familia Src asociadas con el receptor de antígenos de linfocitos B y T (Trowbridge IS *et al*, Annu Rev Immunol. 1994; 12:85-116). Por tanto, en la activación de células T, CD45 es esencial para la señal 1 y células deficientes en CD45 tienen profundos efectos en acontecimientos de activación mediados por TCR.

45 El antígeno CD45 existe en diferentes isoformas que comprenden una familia de glicoproteínas transmembrana. Isoformas distintas de CD45 difieren en su estructura de dominio extracelular que surgen del corte y empalme alternativo de 3 exones variables que codifican para parte de la región extracelular de CD45 (Streuli MF. *et al*, J. Exp. Med. 1987; 166:1548-1566). Las diversas isoformas de CD45 tienen diferentes dominios extracelulares, pero tienen los mismos segmentos citoplasmáticos y transmembrana teniendo dos dominios fosfatasa homólogos, altamente conservados de aproximadamente 300 residuos. Diferentes combinaciones de isoformas se expresan diferencialmente en subpoblaciones de linfocitos T y B (Thomas ML. *et al*, Immunol. Today 1988; 9:320-325). Algunos anticuerpos monoclonales reconocen un epítipo común a todas las diferentes isoformas, mientras que otros AcM tienen una especificidad restringida (CD45R), dependiente de cuales de los exones cortados y empalmados de manera alternativa (A, B o C) reconocen. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales que reconocen el producto del exón A se designan por consiguiente CD45RA, los que reconocen las diversas isoformas que contienen el exón B se han designado CD45RB (Beverley PCL *et al*, Immunol. Sup. 1988; 1:3-5). Anticuerpos tales como UCHL1 se unen selectivamente a la isoforma de 180 kDa CD45RO (sin ninguno de los exones variables A, B o C)

que parece que está restringida a un subconjunto de células T activadas, células de memoria y timocitos corticales y no se detecta en células B (Terry LA *et al*, Immunol. 1988; 64: 331-336).

5 Aversa G.G *et al* (1989), Transplantation proceedings, vol. 21, n.º 1; págs. 349-350, describen el uso de tres anticuerpos monoclonales para identificar antígenos de activación en linfocitos y visualizar células T activadas en aloinjertos renales rechazados. Se da a conocer un anticuerpo denominado "A6".

En el documento WO98/11918 se dan a conocer anticuerpos y usos de los mismos, frente a CDR45R. Los usos dados a conocer incluyen la reversión del rechazo de trasplantes o el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria.

Descripción de las figuras

10 La figura 1 muestra que la inhibición de la MLR primaria por el "AcM candidato" es dependiente de la dosis en el intervalo de 0,001 y 10 ug/ml. "Concentración" es la concentración del "AcM candidato".

La figura 2 muestra el mapa de plásmido del vector de expresión HCMV-G1 HuAb-VHQ que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 12 (3921-4274) en la secuencia de nucleótidos del vector de expresión completo SEQ ID NO: 15.

15 La figura 3 muestra el mapa de plásmido del vector de expresión HCMV-G1 HuAb-VHE que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:11 (3921-4274) en la secuencia de nucleótidos del vector de expresión completo SEQ ID NO: 16.

La figura 4 muestra el mapa de plásmido del vector de expresión HCMV-KHuAb-humV1 que comprende la cadena ligera que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 14 (3964-4284) en la secuencia de nucleótidos del vector de expresión completo SEQ ID NO: 17.

20 La figura 5 muestra el mapa de plásmido del vector de expresión HCMV-KHuAb-humV2 que comprende la cadena ligera que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 13 (3926-4246) en la secuencia de nucleótidos del vector de expresión completo SEQ ID NO: 18.

Descripción de la invención

25 Se ha encontrado ahora un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia polipeptídica que se une a CD45RO y CD45RB, también designado a continuación en el presente documento como "anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB". Este anticuerpo humanizado según la invención puede inducir inmunosupresión, inhibir respuestas de células T primarias e inducir tolerancia de células T. Además, el anticuerpo humanizado de la invención inhibe respuestas de linfocitos mixtos primarias (MLR). Células derivadas de cultivos tratados con el anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB también tienen de manera preferida respuestas proliferativas alteradas en MLR secundaria incluso en ausencia de anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB en la MLR secundaria. Tales respuestas proliferativas alteradas en MLR secundaria son una indicación de la capacidad del anticuerpo humanizado de la invención para inducir tolerancia. Adicionalmente, la administración *in vivo* de molécula de unión a CD45RO/RB a ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) que se someten a xeno GVHD tras inyección con PBMC humanas puede prolongar la supervivencia de los ratones, en comparación con ratones tratados de control, aún cuando todavía pueden detectarse células T humanas circulantes en ratones tratados con molécula de unión a CD45RO/RB.

35 El anticuerpo humanizado de la invención tiene una especificidad de unión para tanto CD45RO como CD45RB. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado se une a isoformas CD45RO con una constante de disociación (Kd) < 20 nM, preferiblemente con una Kd < 15 nM o < 10 nM, más preferiblemente con una Kd < 5 nM. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado se une a isoformas CD45RB con una Kd < 50 nM, preferiblemente con una Kd < 15 nM o < 10 nM, más preferiblemente con una Kd < 5 nM.

En una realización preferida adicional, el anticuerpo humanizado se une a las isoformas de CD45 que

- 1) incluyen los epítomos A y B pero no el epítomo C de la molécula CD45; y/o
- 2) incluyen el epítomo B pero no el epítomo A ni el epítomo C de la molécula CD45; y/o
- 45 3) no incluyen ninguno de los epítomos A, B o C de la molécula CD45.

Aún en una realización preferida adicional, el anticuerpo humanizado no se une a isoformas de CD45 que incluyen

1) todos los epítomos A, B y C de la molécula CD45; y/o

2) tanto los epítomos B como C pero no el epítomo A de la molécula CD45.

En realizaciones preferidas adicionales el anticuerpo humanizado además

1) reconoce células T aloactivadas *in vivo* y de memoria; y/o

5 2) se une a su diana sobre células T humanas, tales como por ejemplo células PEER; en la que dicha unión preferiblemente es con una Kd < 15 nM, más preferiblemente con una Kd < 10 nM, lo más preferiblemente con una Kd < 5 nM ; y/o

10 3) inhibe la función de células T alorreactivas *in vitro*, preferiblemente con una CI50 de aproximadamente 5 nM, más preferiblemente con una CI50 de aproximadamente 1 nM, lo más preferiblemente con una CI50 de aproximadamente 0,5 nM o incluso 0,1 nM; y/o

4) induce tolerancia de células T específicas de aloantígeno *in vitro*; y/o

5) previene la enfermedad de injerto xenogénico contra huésped (GVHD) inducida en ratones SCID mediante inyección de PBMC humanas cuando se administra en una cantidad eficaz.

15 En una realización preferida adicional el anticuerpo humanizado de la invención se une al mismo epítomo que el anticuerpo monoclonal "A6" tal como se describe por Aversa *et al.*, Cellular Immunology 158,314-328 (1994).

20 Debido a las propiedades de unión y actividades biológicas descritas anteriormente, tales anticuerpos humanizados de la invención son particularmente útiles en medicina, para terapia y/o profilaxis. Enfermedades en las que los anticuerpos humanizados de la invención son particularmente útiles incluyen enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y alergias, tal como se establecerá adicionalmente a continuación.

25 Se ha encontrado que una molécula que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 1 y un polipéptido de SEQ ID NO: 2 es una molécula de unión a CD45RO/RB. Se ha encontrado también las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3' en una molécula de unión a CD45RO/RB de SEQ ID NO:1, teniendo CDR1' la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-Gln (RASQNIQTSIQ), teniendo CDR2' la secuencia de aminoácidos Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser (SSSESIS) y teniendo CDR3' la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr(QQSNTWPFT).

30 Se han encontrado también las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 en una molécula de unión a CD45RO/RB de SEQ ID NO: 2, teniendo CDR1 la secuencia de aminoácidos Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH), teniendo CDR2 la secuencia de aminoácidos Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTYNEKFKG) y teniendo CDR3 la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT).

35 Las CDR son 3 regiones determinantes de complementariedad específicas que también se denominan regiones hipervariables que esencialmente determinan las características de unión a antígeno. Estas CDR son parte de la región variable, por ejemplo de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente, en las que estas CDR alternan con regiones de entramado (FR) por ejemplo regiones constantes. Una SEQ ID NO: 1 es parte de una cadena ligera, por ejemplo de SEQ ID NO: 3, y una SEQ ID NO: 2 es parte de una cadena pesada, por ejemplo de SEQ ID NO: 4, en un anticuerpo quimérico. Las CDR de una cadena pesada junto con las CDR de una cadena ligera asociada constituyen esencialmente el sitio de unión a antígeno de una molécula de la presente invención. Se sabe que la contribución hecha por una región variable de cadena ligera a la energía de unión es pequeña en comparación con la hecha por la región variable de cadena pesada asociada y que las regiones variables de cadena pesada tienen su propia actividad de unión a antígeno. Tales moléculas se denominan comúnmente anticuerpos de dominio único.

45 En un aspecto, se proporciona una molécula que comprende al menos un sitio de unión a antígeno, por ejemplo una molécula de unión a CD45RO/RB, que comprende en secuencias las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos Asn-Tyr-Ile-Ile-His(NYIIH), teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTYNEKFKG) y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT); por ejemplo y equivalentes directos de las mismas.

En otro aspecto, se proporciona una molécula que comprende al menos un sitio de unión a antígeno, por ejemplo una molécula de unión a CD45RO/RB, que comprende

a) un primer dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH), teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Iys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPNYHNGTKYNEKFKG) y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT); y

5 b) un segundo dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo CDR1' la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-Gln (RASQNIQTSIQ), teniendo CDR2' la secuencia de aminoácidos Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser (SSSESIS) y teniendo CDR3' la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr (QQSNTWPFT), por ejemplo y equivalentes directos de las mismas.

10 En una realización preferida, el primer dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 es una cadena pesada de inmunoglobulina, y el segundo dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3' es una cadena ligera de inmunoglobulina.

15 En otro aspecto, se proporciona una molécula, por ejemplo una molécula de unión a CD45RO/RB, que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 1 y/o un polipéptido de SEQ ID NO: 2, que comprenden preferiblemente en un dominio un polipéptido de SEQ ID NO: 1 y en otro dominio un polipéptido de SEQ ID NO: 2, por ejemplo un anticuerpo monoclonal quimérico, y en otro aspecto una molécula, por ejemplo una molécula de unión a CD45RO/RB, que comprende un polipéptido de SEQ ID NO:3 y/o un polipéptido de SEQ ID NO: 4, que comprenden preferiblemente en un dominio un polipéptido de SEQ ID NO: 3 y en otro dominio un polipéptido de SEQ ID NO: 4, por ejemplo un anticuerpo monoclonal quimérico.

20 Cuando el sitio de unión a antígeno comprende los dominios tanto primero como segundo o un polipéptido de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 3, respectivamente, y un polipéptido de SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 4, respectivamente, estos pueden ubicarse en el mismo polipéptido, o, preferiblemente cada dominio puede estar en una cadena diferente, por ejemplo siendo el primer dominio parte de una cadena pesada, por ejemplo una cadena pesada de inmunoglobulina, o fragmento de la misma y siendo el segundo dominio parte de una cadena ligera, por ejemplo una
25 cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

30 Se ha encontrado además que un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención es una molécula de unión a CD45RO/RB en mamíferos, por ejemplo en el entorno del cuerpo humano. Un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención puede designarse por tanto como un anticuerpo monoclonal (AcM), en el que la actividad de unión está determinada principalmente por las regiones CDR tal como se describió anteriormente, por ejemplo estando asociadas dichas regiones CDR con otras moléculas sin especificidad de unión, tales como regiones de entramado, por ejemplo regiones constantes, que son sustancialmente de origen humano.

35 En otro aspecto se proporciona una molécula de unión a CD45RO/RB que no es el anticuerpo monoclonal "A6" tal como se describe por Aversa *et al.*, Cellular Immunology 158, 314-328 (1994), que se incorpora como referencia para los pasajes que caracterizan A6.

En otro aspecto la presente invención proporciona una molécula de unión a CD45RO/RB según la presente invención que es un anticuerpo monoclonal humanizado.

40 Los ejemplos de moléculas de unión a CD45RO/RB incluyen anticuerpos quiméricos o humanizados por ejemplo derivados de anticuerpos producidos por células B o hibridomas y o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo fragmentos F (ab')₂ y Fab, así como anticuerpos de dominio único o de cadena única. Un anticuerpo de cadena única consiste en las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos unidas mediante un conector peptídico, que consiste habitualmente en desde 10 hasta 30 aminoácidos, preferiblemente desde 15 hasta 25 aminoácidos. Por tanto, una estructura de este tipo no incluye la parte constante de las cadenas pesadas y ligeras y se cree que el espaciador peptídico pequeño debe ser menos antigénico que una parte constante completa. Por un anticuerpo quimérico quiere decirse un anticuerpo en el que las regiones constantes de cadenas pesadas y ligeras o
45 ambas son de origen humano mientras que los dominios variables de cadenas tanto pesadas como ligeras son de origen no humano (por ejemplo murino). Por un anticuerpo humanizado quiere decirse un anticuerpo en el que las regiones hipervariables (CDR) son de origen no humano (por ejemplo murino) mientras que toda o sustancialmente toda la otra parte, por ejemplo las regiones constantes y las partes altamente conservadas de las regiones variables son de orígenes humanos. Sin embargo, un anticuerpo humanizado puede conservar unos cuantos aminoácidos de la secuencia murina en las partes de las regiones variables adyacentes a las regiones hipervariables.

55 Las regiones hipervariables, es decir, las CDR pueden estar asociadas con cualquier clase de regiones de entramado, por ejemplo partes constantes de las cadenas ligeras y pesadas, de origen humano. Se describen regiones de entramado adecuadas en por ejemplo "Sequences of proteins of immunological interest", Kabat, E. A. *et al.*, US department of health and human services, Public health service, National Institute of health. Preferiblemente,

la parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo IgG1, incluyendo subtipos, preferiblemente la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ o λ , más preferiblemente del tipo κ . Una parte constante preferida de una cadena pesada es un polipéptido de SEQ ID NO: 4, (sin las partes de secuencia de CDR1', CDR2' y CDR3' que se especificaron anteriormente) y una parte constante preferida de una cadena ligera es un polipéptido de SEQ ID NO: 3 (sin las partes de secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 que se especificaron anteriormente).

Se ha encontrado también un anticuerpo frente a CD45RO/RB humanizado que comprende una región variable de cadena ligera de aminoácidos SEQ ID NO:7 o de aminoácidos SEQ ID NO:8, que comprende CDR1', CDR2' y CDR3' según la presente invención y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 9 o de SEQ ID NO: 10, que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 según la presente invención.

En otro aspecto la presente invención proporciona un anticuerpo frente a CD45RO/RB humanizado que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 9 o de SEQ ID NO:10 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 o de SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto la presente invención proporciona un anticuerpo frente a CD45RO/RB humanizado que comprende

- una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7,
- una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8,
- una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7,
- una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:10 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 8.

"Polipéptido", si no se especifica lo contrario en el presente documento, incluye cualquier péptido o proteína que comprende aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, que tiene una secuencia de aminoácidos que comienza en el extremo N-terminal y acaba en el extremo C-terminal. Preferiblemente, el polipéptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, se prefiere más un anticuerpo monoclonal quimérico (injertado con V) o humanizado (injertado con CDR). El anticuerpo monoclonal humanizado (injertado con CDR) puede incluir o no mutaciones adicionales introducidas en las secuencias de entramado (FR) del anticuerpo aceptor.

Un derivado funcional de un polipéptido tal como se usa en el presente documento incluye una molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un polipéptido según la presente invención, es decir, que tiene la capacidad para unirse a CD45RO y CD45RB. Un derivado funcional incluye fragmentos y análogos peptídicos de un polipéptido según la presente invención. Los fragmentos comprenden regiones dentro de la secuencia de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. El término "derivado" se usa para definir variantes de secuencia de aminoácidos, y modificaciones covalentes de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Los derivados funcionales de un polipéptido, por ejemplo de una secuencia especificada, tienen preferiblemente al menos aproximadamente el 65%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 85%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de homología de secuencia global con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, y conservan sustancialmente la capacidad para unirse a CD45RO y CD45RB.

La expresión "modificación covalente" incluye modificaciones de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada; o un fragmento de la misma con un agente de derivatización proteínico o no proteínico orgánico, fusiones con secuencias polipeptídicas heterólogas y modificaciones postraduccionales. Polipéptidos modificados de manera covalente, por ejemplo de una secuencia especificada, tienen todavía la capacidad de unirse a CD45RO y CD45RB mediante reticulación. Se introducen normalmente modificaciones covalentes haciendo reaccionar residuos de aminoácido seleccionados como diana con un agente de derivatización orgánico que puede reaccionar con residuos terminales o laterales seleccionados, o mediante mecanismos de aprovechamiento de modificaciones postraduccionales que funcionan en células huésped recombinantes seleccionadas. Ciertas modificaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células huésped recombinantes sobre el polipéptido expresado. Residuos de glutamilo y asparaginilo se desaminan frecuentemente de manera postraduccionales para dar los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desaminan en condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo, tirosina o treonilo, metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, véase por ejemplo T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 7986 (1983). Las modificaciones covalentes incluyen por ejemplo proteínas de fusión que comprenden un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada y sus variantes de secuencia de aminoácidos, tales

como inmunoadhesinas, y fusiones N-terminales con secuencias señal heterólogas.

5 “Homología” con respecto a un polipéptido nativo y su derivado funcional se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje de homología máximo, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. No debe interpretarse que ni extensiones N- o C-terminales ni inserciones reducen la identidad u homología.

Se conocen bien métodos y programas informáticos para la alineación.

10 “Aminoácido(s)” se refiere a todos los L- α -aminoácidos que se producen de manera natural, por ejemplo e incluyendo D-aminoácidos. Los aminoácidos se identifican mediante o bien las designaciones de una única letra o bien de tres letras bien conocidas.

15 La expresión “variante de secuencia de aminoácidos” se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, tienen todavía la capacidad para unirse a CD45RO y CD45RB. Variantes por sustitución son aquéllas que tienen al menos un residuo de aminoácido eliminado y un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición en un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Estas sustituciones pueden ser únicas, en las que sólo un aminoácido en la molécula se ha sustituido, o pueden ser múltiples, en las que dos o más aminoácidos se han sustituido en la misma molécula.

20 Variantes por inserción son aquéllas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado a o bien el grupo funcional α -carboxilo o bien a-amino del aminoácido. Variantes por delección son aquéllas con uno o más aminoácidos en un polipéptido según la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, eliminados. Habitualmente, las variantes por delección tendrán uno o dos aminoácidos delecionados en una región particular de la molécula.

25

Se ha encontrado también que las secuencias polinucleotídicas de

- GGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTG, que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR1,

- TTCTTCTGAGTCTATCTCTGG; que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR 2,

- ACAAGTAATACCTGGCCATTCACGTT que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR 3,

30 - TTATATTATCCACTG, que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR1',

- TTTTAATCCTTACAATCATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAG que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR2',

AGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTG que codifica para la secuencia de aminoácidos de CDR3',

35 - SEQ ID NO: 5 que codifica para un polipéptido de SEQ ID NO: 1, es decir, la región variable de una cadena ligera de un AcM;

- SEQ ID NO: 6 que codifica para un polipéptido de SEQ ID NO: 2, es decir, la región variable de la cadena pesada de un AcM;

- SEQ ID NO:11 que codifica para un polipéptido de SEQ ID NO:9, es decir, una región variable de cadena pesada que incluye CDR1, CDR2 y CDR3 según la presente invención;

40 - SEQ ID NO: 12 que codifica para un polipéptido de SEQ ID NO: 10, es decir, una región variable de cadena pesada que incluye CDR1, CDR2 y CDR3 según la presente invención;

- SEQ ID NO: 13 que codifica para un polipéptido de SEQ ID NO: 7, es decir, una región variable de cadena ligera que incluye CDR1', CDR2' y CDR3' según la presente invención; y

45 - SEQ ID NO: 14 que codifica para un polipéptido de SEQ ID NO: 8, es decir, una región variable de cadena ligera que incluye CDR1', CDR2' y CDR3' según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican para un polipéptido de SEQ ID NO: 7 o SEQ.ID NO: 8 y un polipéptido de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; que codifican por ejemplo para

- un polipéptido de SEQ ID NO: 7 y un polipéptido de SEQ ID NO: 9,
- un polipéptido de SEQ ID NO: 7 y un polipéptido de SEQ ID NO: 10,
- 5 - un polipéptido de SEQ ID NO: 8 y un polipéptido de SEQ ID NO: 9, o
- un polipéptido de SEQ ID NO: 8 y un polipéptido de SEQ ID NO: 10.

“Polinucleótido”, si no se especifica lo contrario en el presente documento, incluye cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado, incluyendo sin limitación ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias.

10 Un polinucleótido según la presente invención, por ejemplo un polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2', CDR3', o de SEQ.ID NO:1, SEQ.ID NO: 2, SEQ.ID NO: 3, SEQ.ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, respectivamente, tal como un polinucleótido de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, respectivamente, incluye variantes alélicas de las mismas y/o sus complementos; incluyendo por ejemplo un polinucleótido que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, respectivamente; que codifica por ejemplo para un polipéptido que tiene al menos el 80% de identidad con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, respectivamente, incluyendo por ejemplo un derivado funcional de dicho polipéptido, teniendo por ejemplo dicho derivado funcional al menos el 65% de homología con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, respectivamente, incluyendo por ejemplo dicho derivado funcional variantes de secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID.NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, respectivamente; por ejemplo una SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID.NO: 13 o SEQ ID NO: 14, respectivamente incluye una secuencia, que como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, también codifica para un polipéptido de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ.ID NO: 10, respectivamente, o codifica para un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ.ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, respectivamente.

Un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante. Por tanto, pueden construirse una o más moléculas de ADN que codifican para el CD45RO/RB, colocadas bajo secuencias de control apropiadas y transferirse a un huésped (organismo) adecuado para su expresión mediante un vector apropiado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica para una cadena única, pesada y/o ligera de un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención; y el uso de un polinucleótido según la presente invención para la producción de un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención por medios recombinantes.

40 Puede obtenerse un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según, por ejemplo de manera análoga, a un método de manera convencional junto con la información proporcionada en el presente documento, por ejemplo con el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables y las secuencias polinucleotídicas que codifican para estas regiones. Se describe un método para construir un gen de dominio variable, por ejemplo, en el documento EP 239 400 y puede resumirse brevemente tal como sigue: puede clonarse un gen que codifica para una región variable de un AcM de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifican para las regiones de entramado e hipervariables y se eliminan los segmentos de ADN que codifican para las regiones hipervariables. Se preparan casetes de CDR sintéticos bicatenarios mediante síntesis de ADN según las secuencias de CDR y CDR' tal como se especifica en el presente documento. Estos casetes se proporcionan con extremos cohesivos de modo que pueden ligarse en uniones de un entramado deseado de origen humano. También pueden prepararse polinucleótidos que codifican para anticuerpos de cadena única según, por ejemplo de manera análoga, a un método convencional. Un polinucleótido según la presente invención así preparado puede transferirse convenientemente a un vector de expresión apropiado.

Pueden encontrarse líneas celulares apropiadas según, por ejemplo de manera análoga, a un método convencional. Se conocen vectores de expresión, que comprenden por ejemplo promotor(es) adecuado(s) y genes que codifican

para partes constantes de cadenas pesadas y ligeras, por ejemplo, y están disponibles comercialmente.

Se conocen huéspedes apropiados o pueden encontrarse según, por ejemplo de manera análoga, a un método convencional e incluyen cultivo celular o animales transgénicos.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica para un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención.

En otro aspecto la presente invención proporciona

- un sistema de expresión que comprende un polinucleótido según la presente invención pudiendo dicho sistema de expresión o parte del mismo producir un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención, cuando dicho sistema de expresión está presente en una célula huésped compatible ; y

10 - una célula huésped aislada que comprende un sistema de expresión tal como se definió anteriormente.

Se ha encontrado además que un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención inhibe respuestas aloinmunitarias primarias de un modo dependiente de la dosis tal como se determina mediante MLR *in vitro*. Los resultados indican que las células que se habían aloactivado en presencia de un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención están alteradas en sus respuestas a un aloantígeno. Esto confirma la indicación de que un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención puede actuar directamente sobre las células T alorreactivas efectoras y modular su función. Además, se estudiaron adicionalmente las propiedades funcionales de células T derivadas de la MLR primaria en experimentos de reestimulación en MLR secundaria, usando células estimuladoras específicas o estimuladores de terceras partes para evaluar la especificidad de los efectos funcionales observados. Se ha encontrado que las células derivadas de MLR primaria en las que está presente un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención, estaban alteradas en su capacidad para responder a una estimulación óptima posterior con células estimuladoras específicas, aunque no hubiera ningún anticuerpo añadido a los cultivos secundarios. La especificidad de la inhibición se demostró mediante la capacidad de las células tratadas con un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención para responder de manera normal a células estimuladoras de donantes de terceras partes no relacionados. Los experimentos de reestimulación usando células T derivadas de cultivos de MLR primaria indican por tanto que las células que se habían aloactivado con CD45RO/RB según la presente invención son hiposensibles, es decir, tolerantes, al aloantígeno original. Se describen actividades biológicas adicionales en el ejemplo 7.

Además, se ha encontrado que la proliferación celular en células tratadas previamente con un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención puede rescatarse mediante IL-2 exógena. Esto indica que el tratamiento de células T alorreactivas con un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB, según la presente invención, induce un estado de tolerancia. De hecho, las respuestas proliferativas reducidas observadas en células tratadas con un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención, se debían a la alteración de la función de células T, y estas células podían responder a IL-2 exógena, indicando que estas células están en un estado anérgico, no sensible verdadero. La especificidad de esta respuesta se mostró mediante la capacidad de las células tratadas con un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención para proliferar de manera normal en células de donantes no relacionadas hasta el nivel de las células tratadas de control.

Experimentos adicionales indican que la unión de un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención a CD45RO y CD45RB puede inhibir las respuestas de memoria de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes inmunizados frente a un antígeno de recuerdo específico. Por tanto, la unión de un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención a CD45RO y CD45RB es también eficaz en la inhibición de respuestas de memoria frente a Ag soluble. La capacidad de un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención para inhibir respuestas de recuerdo frente al tétanos en PBMC de donantes inmunizados indica que el anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención puede seleccionar como diana y modular la activación de células T de memoria. Por ejemplo, estos datos indican que un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención, además de reconocer células T activadas y alorreactivas, puede modular su función, dando como resultado la inducción de anergia de células T. Esta propiedad puede ser importante en el tratamiento de respuestas inmunitarias en curso frente a autoantígenos y alérgenos y posiblemente frente a aloantígenos tal como se observa en enfermedades autoinmunitarias, alergia y rechazo crónico, y enfermedades, tales como psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, en las que las respuestas de memoria desempeñan un papel en el mantenimiento del estado patológico. Se cree que es una característica importante en una situación patológica, tal como en enfermedades autoinmunitarias en las que las respuestas de memoria frente a autoantígenos pueden desempeñar un papel importante para el mantenimiento de la enfermedad.

55 Se ha encontrado también que un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención puede

modular respuestas proliferativas de células T en una respuesta de linfocitos mixtos (MLR) *in vivo*, es decir, se encontró que una molécula de unión a CD45RO/RB según la presente invención tenía propiedades inhibitoras correspondientes en pruebas *in vivo*.

5 Por tanto, un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención puede tener propiedades inmunosupresoras y tolerogénicas y puede ser útil para la inducción de tolerancia *in vivo* y *ex vivo* frente a aloantígenos, autoantígenos, alérgenos y antígenos de la flora bacteriana, por ejemplo una molécula de unión a CD45RO/RB según la presente invención puede ser útil en el tratamiento y la profilaxis de enfermedades incluyendo por ejemplo enfermedades autoinmunitarias, tales como, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Graves, diabetes tipo I y tipo II, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, 10 síndrome de Sjogren, esclerodermia, gastritis autoinmunitaria, glomerulonefritis, rechazo de trasplantes, por ejemplo rechazo de xenoinjerto y aloinjerto de tejidos y órganos, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), y también psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y alergias.

15 En otro aspecto la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención como producto farmacéutico, por ejemplo en el tratamiento y la profilaxis de enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y alergias.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención para la producción de un medicamento en el tratamiento y profilaxis de enfermedades asociadas con enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y alergias.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado frente a CD45RO/RB según la presente invención en asociación con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

25 Una composición farmacéutica puede comprender además, por ejemplo principios activos, por ejemplo otros anticuerpos inmunomoduladores tales como, pero sin limitarse a anti-ICOS, anti-CD154, antiCD134L o proteínas recombinantes tales como, pero sin limitarse a rCTLA-4(CD152), rOX40(CD134), o compuestos inmunomoduladores tales como, pero sin limitarse a ciclosporina A, FTY720, RAD, rapamicina, FK506, 15-desoxiespergualina, esteroides.

30 En otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento y/o profilaxis de enfermedades asociadas con enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y alergias que comprende administrar a un sujeto que necesita un tratamiento y/o una profilaxis de este tipo una cantidad eficaz de una molécula de unión a CD45RO/RB según la presente invención, por ejemplo en forma de una composición farmacéutica según la presente invención.

35 Las enfermedades autoinmunitarias que van a tratarse con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Graves, diabetes tipo I y tipo II, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerodermia, gastritis autoinmunitaria, glomerulonefritis; rechazo de trasplantes, por ejemplo rechazo de xenoinjerto y aloinjerto de tejidos y órganos y enfermedad de injerto contra huésped (GVHD).

Ejemplos

40 La invención se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención. En los siguientes ejemplos, todas las temperaturas son en grados centígrados.

El "AcM candidato" o "anticuerpo quimérico" es una molécula de unión a CD45RO/RB según la presente invención que comprende la cadena ligera de SEQ ID NO:3 y la cadena pesada de SEQ ID NO:4.

Se usan las siguientes abreviaturas:

- ELISA ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
- 45 FACS clasificación celular activada por fluorescencia
- FITC isotiocianato de fluoresceína
- FBS suero bovino fetal

GVHD enfermedad de injerto contra huésped

HCMV promotor de citomegalovirus humano

IgE inmunoglobulina isotipo E

IgG inmunoglobulina isotipo G

5 PBS solución salina tamponada con fosfato

PCR reacción en cadena de la polimerasa

xGVHD enfermedad de xenoinjerto frente a huésped

Ejemplo 1: Respuesta de linfocitos mixtos primaria (MLR)

Células

10 Se obtienen muestras de sangre de donantes humanos sanos. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB) a partir de leucocitos de sangre periférica completa, leucoféresis o capas leucocíticas con tipo de sangre conocido, pero tipo de HLA desconocido. En algunos experimentos de MLR, se usan directamente PBMC como células estimuladoras tras la irradiación a 40 Gy. En otros experimentos, se redujeron las células T de PBMC usando Dynabeads CD2 o CD3 (Dyna, Oslo, Noruega). Se eliminaron las perlas y las células contaminantes mediante un campo magnético. Se usan PBMC reducidas en células T como células estimuladoras tras la irradiación. Se usan PBMC, células T CD3⁺ o células T CD4⁺ como células que responden en MLR. Se preparan células de diferentes donantes para dar células estimuladoras. Se purifican células T CD3⁺ mediante selección negativa usando AcM anti-CD16 (Zymed, CA), Dynabeads de IgG de cabra anti-ratón, Dynabeads anti-CD14, Dynabeads CD19. Además, se usan Dynabeads anti-CD8 para purificar células T CD4. Se analizan las células obtenidas mediante FACScan o FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) y la pureza de las células obtenidas era >75%. Se suspenden las células en medio RPM11640, complementado con un 10% de FBS inactivado por calor, penicilina, estreptomina y L-glutamina.

Reactivos

25 Se genera también el AcM quimérico anti-CD45RO/RB, "AcM candidato" y un anticuerpo quimérico de control de isotipo coincidente. Se adquiere anticuerpo IgG₁ de control de ratón (ser humano) específico para KLH (hemocianina de lapa californiana) o IL-10 humana recombinante de BD Pharmingen (San Diego, CA). El AcM anti-CD154 humano 5c8 es según Lederman *et al* 1992.

Respuesta de linfocitos mixtos primaria (MLR)

30 Se mezclan alícuotas de 1 x 10⁵ PBMC o 5 X 10⁴ de células CD3⁺ o CD4⁺ con 1x10⁵ PBMC irradiadas o 5 x 10⁴ PBMC irradiadas (50 Gy) reducidas en células T en cada pocillo de placas de cultivo de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en presencia del AcM indicado o ausencia de Ac. En algunos experimentos, se añade fragmento F(ab')₂ de Ig de cabra anti-ratón o anticuerpo de cabra anti-Ig humana específico para la parte Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a 10 µg/ml además del AcM candidato para garantizar la reticulación *in vitro* óptima de las moléculas CD45 diana. Se cultivan las células mezcladas durante 4 ó 5 días a 37°C en un 5% de CO₂ y se determina la proliferación pulsando las células con ³H-timidina durante las últimas 16 - 20 horas de cultivo. Otros experimentos son similares a los descritos anteriormente, pero con las siguientes excepciones: 1) el medio usado es EX-VIVO (Bio-Whittaker) que contiene un 10% de FBS y un 1% de plasma humano; 2) se usa IgG total anti-ratón (5 µg/ml) como etapa de reticulación secundaria; 3) la irradiación de células estimuladoras es a 60 Gy. Se realiza MLR primaria en presencia del "AcM candidato" o IgG₁ quimérica de control (10 µg/ml) ambos con un reactivo de etapa secundaria, fragmento F(ab')₂ de anticuerpo de cabra anti-Ig humana específico para la parte Fc (10 µg/ml). Se calcula el porcentaje de inhibición por el "AcM candidato" en comparación con la proliferación celular en presencia de IgG₁ de control. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación:

TABLA 1

Inhibición de MLR primaria por 10 µg/ml de un AcM candidato según la presente invención		
Respondedor	Estimulador (PBMC irr.)	% de inhibición
CD4 de n.º 211	CD3 de n.º 219	63,51
CD4 de n.º 220	CD3 de n.º 219 red.	63,07
CD4 de n.º 227	CD3 de n.º 220 red.	65,96
CD4 de n.º 229	CD3 de n.º 219 red.	50,76
Promedio ± DE		60,83 ± 6,83*
* Significativamente diferente del valor de control (P<0,001)		

Un AcM candidato según la presente invención inhibe MLR primaria tal como puede observarse a partir de la tabla 1. El efecto inhibitorio promedio es del 60,83 ± 6,83% en células T CD4⁺ derivadas de cuatro donantes diferentes y es estadísticamente significativo. Se muestra que la inhibición de la MLR primaria por el "AcM candidato" es dependiente de la dosis en el intervalo de 0,001 y 10 µg/ml del "AcM candidato" tal como se muestra en la figura 1. La CI₅₀ para la inhibición de la MLR primaria por un "AcM candidato" se determina a partir de los resultados de tres experimentos de MLR separados usando PBMC de un donante como células que responden. Por tanto, se mezclan células T CD4⁺ que responden del doante n.º 229 y n.º 219 y PBMC irradiadas reducidas en células T en presencia de un "AcM candidato" o Ac quimérico de control con 10 µg/ml de fragmento F(ab')₂ de anticuerpo de cabra anti-Ig humana. Se repiten los experimentos 3 veces y se calcula el porcentaje de proliferación en presencia de un "AcM candidato" en comparación con la proliferación de células T en presencia de Ac de control. Se determina el valor de CI₅₀ usando Origin (v. 6.0®). Se calcula que el valor de CI₅₀ de la actividad celular es de 0,87 ± 0,35 nM (0,13 ± 0,052 µg/ml).

15 Ejemplo 2: MLR secundaria

Con el fin de evaluar si un "AcM candidato" induce falta de respuesta de células T CD4⁺ a aloantígenos específicos, se realiza MLR secundaria en ausencia de cualquier anticuerpo tras la MLC primaria. Se cultivan células T CD4⁺ con células estimuladoras alogénicas irradiadas (PBMC reducidas en células T) en presencia del anticuerpo indicado en placas de cultivo de 96 pocillos durante 10 días (MLC primaria). Entonces, se recogen las células, se distribuyen en capas en un gradiente de Ficoll-Hypaque para eliminar las células muertas, se lavan dos veces con RPMI y se reestiman con el mismo estimulador, células estimuladoras de 3^{as} partes o IL-2 (50 U/ml). Se cultivan las células durante 3 días y se determina la respuesta proliferativa pulsando las células con ³H-timidina durante las últimas 16 - 20 horas de cultivo. Específicamente, se cultivan células T CD4⁺ con células estimuladoras alogénicas irradiadas (PBMC reducidas en células T tomadas de otros donantes) en presencia de 10 µg/ml del "AcM candidato", Ac quimérico IgG1 de control y fragmento F(ab')₂ de anticuerpo de cabra anti-Ig humana. Se determina la proliferación de MLR primaria en el día 5. Para la MLR secundaria, se cultivan las células que responden y estimuladoras durante 10 días en presencia del "AcM candidato", entonces se recogen las células, se lavan dos veces en RPMI1640 y se reestiman con estimulador específico, estimuladores de terceras partes o IL-2 (50 U/ml) en ausencia de cualquier Ac. Se determina la proliferación celular en el día 3. Los resultados se exponen en la tabla 2:

30

TABLA 2

N.º de donante de células T CD4+ que responden	% de inhibición de MLR secundaria
n.º 211	49,90*
n.º 220	59,33*
n.º 227	58,68*
* Significativamente diferente del valor control (p=<0,001 determinado mediante la prueba de la t, SigmaStat V.2.03). n.º p=<0,046	

5 Con el fin de evaluar si la proliferación alterada se debe a la falta de respuesta como consecuencia del tratamiento con un "AcM candidato", se cultivan las células derivadas de MLR primaria en presencia de IL-2 (50 U/ml). La adición de IL-2 da como resultado el rescate de las respuestas proliferativas de las células T que se habían tratado con un "AcM candidato" en MLR primaria, hasta niveles similares a los observados en presencia de Ac de control IgG₁. Estos datos indican que la respuesta secundaria alterada en células T tratadas con un "AcM candidato" se debe a la alteración funcional de las células T que responden que se vuelven carentes de respuesta a las células estimuladoras específicas. Se calcula el porcentaje de inhibición según la siguiente fórmula:

$$10 \quad \frac{\text{c.p.m con Ac de control} - \text{c.p.m. con "Acm candidato"}}{\text{c.p.m. con Ac de control}} \times 100$$

El análisis estadístico se realiza usando SigmaStat (vers. 2.03). Se analizan los datos mediante ANOVA de dos vías seguido por el método de Dunnett. En todos los procedimientos de prueba, las probabilidades <0,05 se consideran significativas. En algunos experimentos se usa la prueba de la t (SigmaStat v. 2.03).

Ejemplo 3: Estudios de supervivencia *in vivo* en ratones SCID

15 *Injerto de hu-PBL en ratones SCID*

Se inyectan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas por vía intraperitoneal en ratones SCID C.B 17 / ratones GbmsTac-Prkdc^{scid} Lysr^{bg} (Taconic, Germantown, NY) en una cantidad suficiente para inducir una enfermedad de injerto xenogénico frente a huésped letal (xGvHD) en >90% de los ratones en el plazo de 4 semanas tras la transferencia de células. Tales ratones SCID tratados se denominan a continuación en el presente documento ratones hu-PBL-SCID.

Tratamiento con AcM de ratones hu-PBL-SCID

25 Se tratan ratones Hu-PBL SCID con un "AcM candidato" o controles de AcM de isotipo coincidente quiméricos o de control en el día 0, inmediatamente tras la inyección de PBMC, en el día 3, día 7 y a intervalos semanales después de eso. Se administran los AcM por vía subcutánea en 100 µl de PBS a una concentración final de 5 mg/kg de peso corporal. Se detuvo el tratamiento cuando todos los ratones control murieron.

Evaluación de los resultados de tratamiento

30 El criterio principal para evaluar la eficacia de un "AcM candidato" en este estudio era la supervivencia de los ratones hu-PBLSCID. Se evalúa la significación de los resultados mediante el método estadístico de análisis de la supervivencia usando la prueba de rangos logarítmicos (método de Mantel) con la ayuda del software Systat v9.01. El método de análisis de la supervivencia es una prueba no paramétrica, que no sólo considera si un ratón particular está todavía vivo sino también si se sacrificó por motivos irrelevantes para el tratamiento/enfermedad tales como el requisito de realizar análisis *in vitro* con sus órganos/células. Se obtienen biopsias del hígado, pulmón, riñón y bazo de ratones muertos para su evaluación adicional. Además, se pesan ratones hu-PBL-SCID al comienzo (antes de la transferencia de células) y durante (cada dos días) todo el experimento como estimación indirecta de su estado de salud. Se generaron líneas de regresión lineal usando los valores de peso corporal frente a los días tras la transferencia de PBMC obtenidos de cada ratón y posteriormente se compararon sus pendientes (control frente a ratones tratados con anti-CD45) usando la prueba de Mann-Whitney no paramétrica.

Resultados

5 Todos los ratones hu-PBL-SCID tratados con controles de AcM de ratón tenían leucocitos humanos infiltrados en el pulmón, hígado y bazo y murieron (4/4) en el plazo de aprox. 2 a 3 semanas tras la transferencia de células. La muerte es probablemente una consecuencia de xGvHD. Además, los ratones tratados con AcM de control perdieron peso de una manera lineal, aprox. el 10% y más en el plazo de 3 semanas. Todos los ratones hu-PBL-SCID tratados con un "AcM candidato" sobrevivieron (4/4) sin ningún signo aparente de enfermedad más de 4 semanas, aún cuando se detuvo el tratamiento con "AcM candidato" tras 3 semanas. Los ratones tratados con "AcM candidato" aumentaron de peso de una manera lineal, hasta aprox. el 5% en el plazo de 4 semanas.

Ejemplo 4: Expresión de anticuerpos de la invención

10 Expresión de anticuerpo humanizado que comprende una SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10

15 Se construyen vectores de expresión según el mapa de plásmido mostrado en las figuras 2 a 5, que comprenden los nucleótidos correspondientes que codifican para la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera humanizada humV1 (SEQ ID NO:7), región variable de cadena ligera humanizada humV2 (SEQ ID NO:8), región variable de cadena pesada humanizada VHE (SEQ ID NO:9) o región variable de cadena pesada humanizada VHQ (SEQ ID NO:10), respectivamente. Estos vectores de expresión tienen las secuencias de ADN (nucleótidos) SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17 o SEQ ID NO 18, respectivamente.

Construcción de vectores de expresión de cadena ligera y pesada de anticuerpo humanizado

Vectores de expresión de cadena ligera kappa humana para las versiones VLh y VLm

20 Con el fin de construir el vector de expresión final que codifica para la cadena ligera humanizada completa de isotipo kappa humano, se escindieron fragmentos de ADN que codificaban para las regiones variables de cadena ligera completas (VLh y VLm) de los vectores de clonación PCR-Script que contenían VLh y VLm (Stratagene) (región VLm) usando HindIII y BglII. Entonces se subclonaron los fragmentos purificados en gel en los sitios de HindIII y BamHI del vector de expresión C21-HCMV Kappa que se creó durante la construcción del anticuerpo humanizado anti-IgE TESC-21 (Kolbinger *et al* 1993) y que originalmente se recibió de M. Bendig (MRC Collaborative Centre, Londres, R.U.) (Maeda *et al.* 1991). Se purificaron los productos de ligación mediante extracción con fenol/cloroformo, y se sometieron a electroporación en la cepa Epicurian Coli® XL1-Blue competente para electroporación (n.º de catálogo 200228, Stratagene). Tras sembrar en placa en placas de agar LB/amp durante la noche a 37°C, se recogieron una de cada 12 colonias para preparar ADN de plásmido a partir de un cultivo de 3 ml usando el equipo BioRobot 9600 (Qiagen). Esto proporcionó los vectores de expresión de cadena ligera para las versiones de anticuerpo humanizado VLh y VLm, respectivamente, tal como se describe adicionalmente en las figuras.

Vectores de expresión de cadena pesada gamma 1 humana para VHQ

35 Para la construcción del vector de expresión VHQ, se adoptó un enfoque gradual. En primer lugar, se ensambló la región variable completa de VHQ mediante PCR según la metodología descrita en Kolbinger *et al* 1993 (Protein Eng. 1993 Nov; 6(8):971-80) y se subclonó en el vector de expresión C21-HCMV-gamma-1 del que se había retirado el inserto C21 usando las mismas enzimas. Entonces se subclonó un fragmento de HindIII/BamHI del clon VHQ de PCRScript que contenía la región variable completa en el vector de expresión C21-HCMV-gamma-1 escindido con las mismas enzimas. Esto proporcionó el vector de expresión final para la versión VHQ del anticuerpo humanizado.

40 Vectores de expresión de cadena pesada gamma 1 humana para VHE

45 Se logró la construcción del vector de expresión de VHE final que codificaba para la cadena pesada humanizada completa de isotipo gamma 1 humano ligando directamente un fragmento de PCR sometido a restricción por HindIII y BamHI que codificaba para la región variable en los sitios de HindIII y BamHI del vector de expresión C21-HCMV gamma-1 que se creó durante la construcción del anticuerpo humanizado anti-IgE TESC-21 (Kolbinger *et al* 1993) y que también se recibió originalmente de M. Bendig (MRC Collaborative Centre, Londres, R.U.) (Maeda *et al.* 1991).

Expresión transitoria en células COS

50 El siguiente protocolo de transfección está adaptado para células COS adherentes en placas de cultivo celular de 150 mm, usando reactivo de transfección SuperFect™ (n.º de catálogo 301305, Qiagen). Los cuatro vectores de expresión diferentes descritos anteriormente se usan para la transfección transitoria de células. Para la expresión de anticuerpo humanizado, cada uno dos clones que contienen insertos de cadena pesada (VHE o VHQ, respectivamente) se transfectan conjuntamente en células con cada uno de los dos clones que codifican para las

5 cadenas ligeras (humV1 o humV2, respectivamente), en total 4 combinaciones diferentes de vectores de expresión de cadena pesada y ligera (VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 y VHQ/humV2). Antes de la transfección, se linealizan los plásmidos con la endonucleasa de restricción PvuI que escinde en la región que codifica para el gen de resistencia para ampicilina. El día antes de la transfección, se siembran 4×10^6 células COS en 30 ml de medio de cultivo reciente en placas de cultivo celular de 150 mm. La siembra a esta densidad celular proporcionó generalmente una confluencia al 80% tras 24 horas. En el día de la transfección, se diluyen cuatro combinaciones diferentes de vectores de expresión de ADN de cadena pesada y ligera linealizados (15 μ g cada uno) en un volumen total de 900 μ l de medio reciente sin suero ni antibióticos. Entonces se mezclan meticulosamente 180 μ l de reactivo de transfección SuperFect con la disolución de ADN. Se incuba la mezcla de ADN durante 10 min. a temperatura ambiente para permitir la formación de complejo. Mientras tiene lugar la formación de complejo, se retira el medio de crecimiento de los cultivos de células COS, y se lavan las células una vez con PBS. Entonces se añaden 9 ml de medio de cultivo reciente (que contiene el 10% de FBS y antibióticos) a cada tubo de reacción que contiene los complejos de transfección y se mezcla bien. Se transfiere inmediatamente la preparación final a cada uno de los 4 cultivos que van a transfectarse y se mezcla suavemente. Entonces se incuban los cultivos celulares con los complejos de ADN durante 3 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Tras la incubación, se retira el medio que contiene complejos de transfección y se sustituye por 30 ml de medio de cultivo reciente. A las 48 h tras la transfección, se recogen los sobrenadantes de cultivo.

Concentración de sobrenadantes de cultivo

20 Para el análisis de ELISA y FACS, se concentran los sobrenadantes de cultivo recogidos de células COS transfectadas con plásmidos de cadena pesada y ligera tal como sigue. Se añaden 10 ml de cada sobrenadante a dispositivos de filtración centrífuga Centriprep YM-50 (n.º de catálogo 4310, Millipore) tal como se describe por el fabricante. Se centrifugan los filtros Centriprep durante 10 min. a 3000 rpm a temperatura ambiente. Entonces se repite la etapa de centrifugación de nuevo con los 20 ml restantes de sobrenadante usando sólo 5 min. de centrifugación y supervisando la evolución de la concentración. Se recuperan los 500 μ l intermedios de sobrenadante concentrado, se transfieren a nuevos dispositivos de filtración centrífuga Microcon (n.º de catálogo 42412, Microcon) y se concentran adicionalmente siguiendo las instrucciones del fabricante. Se centrifugan los sobrenadantes concentrados cuatro veces durante 24 min. a 3000 rpm a temperatura ambiente, una vez durante 10 min a 6000 rpm y después tres veces durante 5 min, siempre supervisando la evolución de la concentración.

30 El volumen final de medio condicionado concentrado logrado es de 100-120 μ l correspondiente a una concentración de 250 a 300 veces del medio de cultivo original y se almacena a 4°C hasta su uso. Para comparación y control, se concentra de manera similar medio de cultivo a partir de células sin transfectar, usando el mismo protocolo de centrifugación descrito anteriormente.

Ejemplo 5: Determinación de la expresión de IgG humanizada recombinante mediante ELISA

35 Para determinar las concentraciones de IgG de anticuerpo humanizado recombinante expresado en los sobrenadantes de cultivo, se ha desarrollado un protocolo de ELISA tipo sándwich y se ha optimizado usando IgG humana como patrón. Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (n.º de catálogo 4-39454, Nunc Immunoplate Maxisorp) durante la noche a 4°C con 100 μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG humana (molécula completa, n.º de catálogo 11011, SIGMA) a la concentración final de 0,5 μ g/ml en PBS. Entonces se lavan los pocillos 3 veces con tampón de lavado (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%) y se bloquean durante 1,5 horas a 37°C con tampón de bloqueo (BSA al 0,5% en PBS). Tras 3 ciclos de lavado, se preparan las muestras de anticuerpo y la IgG humana patrón (n.º de catálogo 14506, SIGMA) mediante dilución de 1,5 veces en serie en tampón de bloqueo. Se transfieren 100 μ l de muestras diluidas o patrón por duplicado a la placa recubierta y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavan las placas 3 veces con tampón de lavado y posteriormente se incuban durante 1 hora con 100 μ l de anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa del rábano anti-cadena ligera kappa de IgG humana (n.º de catálogo A-7164, SIGMA) diluido a 1/4000 en tampón de bloqueo. Los pocillos de control recibieron 100 μ l de tampón de bloqueo o medio de cultivo normal concentrado. Tras el lavado, se realiza la cuantificación colorimétrica de peroxidasa unida en los pocillos de muestra y patrón, usando un kit TMB Peroxidase EIA Substrate (n.º de catálogo 172-1067, Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante.

50 Se añade la mezcla de peroxidasa a 100 μ l por pocillo y se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente en la oscuridad. Se detiene la reacción colorimétrica mediante adición de 100 μ l de ácido sulfúrico 1 M y se lee la absorbancia de cada pocillo a 450 nm, usando un lector de placas de ELISA (modelo 3350-UV, BioRad).

Con un coeficiente de correlación de 0,998 para la curva patrón de IgG, se determinan las siguientes concentraciones para los cuatro concentrados de cultivo diferentes (concentrado aprox. 250-300 veces):

sobrenadante de VHE/humV1 = 8,26 μ g/ml

55 sobrenadante de VHE/humV2 = 6,27 μ g/ml

sobrenadante de VHQ/humV1 = 5,3 µg/ml

sobrenadante de VHQ/humV2 = 5,56 µg/ml

Ejemplo 6: Análisis de competición de FACS (afinidad de unión)

- 5 Se elige la línea de células T humanas PEER como célula diana para el análisis de FACS porque expresaba el antígeno CD45 sobre su superficie celular. Para analizar la afinidad de unión de sobrenadantes de anticuerpo humanizado, se realizan experimentos de competición usando anticuerpo quimérico marcado con FITC como referencia y se compara con la inhibición de anticuerpo de ratón purificado y de anticuerpo quimérico. Se centrifugan cultivos de células PEER durante 10 a 3000 rpm y se retira el medio. Se resuspenden las células en tampón de FACS (PBS que contiene el 1% de FBS y el 0,1% de azida de sodio) y se siembran en una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos a una densidad celular de 1×10^5 células por pocillo. Se centrifuga la placa y se desecha el sobrenadante. Para estudios de bloqueo, en primer lugar se añaden 25 µl de medio no transfectado concentrado o anticuerpo de control de isotipo coincidente (controles negativos), anticuerpo quimérico o anticuerpo de ratón sin marcar (controles positivos) así como sobrenadante concentrado que contiene las diversas combinaciones de anticuerpo humanizado (muestras), en cada pocillo a las concentraciones indicadas en el texto.
- 10
- 15 Tras 1 hora de incubación a 4°C, se lavan células PEER con 200 µl de tampón de FACS mediante centrifugación. Posteriormente se incuban células durante 1 hora a 4°C con anticuerpo quimérico conjugado con FITC en 25 µl de tampón de FACS a la concentración final de 20 µg/ml. Se lavan las células y se resuspenden en 300 µl de tampón de FACS que contiene yoduro de propidio 2 µg/ml lo que permite activar células viables. Se analizan las preparaciones celulares en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson).
- 20 El análisis de FACS indica un bloqueo dependiente de la dosis de anticuerpo quimérico marcado con fluorocromo mediante los sobrenadantes de cultivo de anticuerpo humanizado concentrados. No se observa ningún bloqueo dependiente de la dosis de la unión de anticuerpo quimérico con el anticuerpo de control de isotipo coincidente, lo que indica que el efecto de bloqueo por las diferentes combinaciones de anticuerpo humanizado es específico de epítipo y que la especificidad de epítipo parece conservarse tras el proceso de humanización.

25 Ejemplo 7: Actividades biológicas de moléculas de unión a CD45RB/RO

En este estudio, se ha abordado si el anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO, cuando está presente en cultivos de células T humanas primarias activadas de manera policlonal (i) soporta la diferenciación de células T con un fenotipo Treg característico, (ii) impide o potencia la apoptosis tras la activación de células T y (iii) afecta a la expresión de receptores y antígenos específicos de subconjunto tras la reestimulación.

30 El anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO potencia la muerte celular de células T activadas de manera policlonal

- Se sometieron células T primarias (mezcla de subconjuntos T CD4+ y CD8+) a activación mediante AcM anti-CD3 más anti-CD28 (200 ng/ml cada uno) en presencia o ausencia (=control) de anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO. Se retiraron los anticuerpos en exceso mediante lavado el día 2. Se usó 7-amino-actinomicina D (7-AAD) como colorante de tinción de ADN captado por células apoptóticas y necróticas para medir la muerte celular tras la activación. Los resultados muestran que la activación de células T en presencia de anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO aumentó la fracción de células positivas para 7-AAD en dos veces en el día 2 tras el cultivo. En el día 7, la parte de células positivas para 7-AAD fue de nuevo similar en cultivos control y tratados con anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO.
- 35

40 Las células T tratadas con anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO, pero no con AcM control, muestran un fenotipo de célula T reguladora (Treg)

- El aumento de la expresión de CD25 y la proteína reguladora negativa CTLA-4 (CD152) es un marcador de células Treg. La supresión funcional de respuestas primarias y secundarias de células T mediante anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO puede deberse a la inducción de células Treg. Para abordar este asunto, se activaron células T mediante AcM anti-CD3 + CD28 y se cultivaron en presencia de anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO o AcM control anti-LPS. El tiempo tratar este asunto, se activaron células T mediante AcM anti-CD3 + CD28 y se cultivaron en presencia de anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO o AcM control anti-LPS. El transcurso de tiempo de la expresión de CTLA-4 y CD25 revela marcadas diferencias entre controles y células T tratadas con anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO en los días 1 y 3 tras la estimulación secundaria, lo que indica un fenotipo Treg.
- 45
- 50

La expresión de CTLA-4 intracelular se sostiene en presencia de anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO

5 Se ha notificado que también pueden encontrarse cantidades sustanciales de CTLA-4 de manera intracelular. Por tanto, en paralelo con la tinción de CTLA-4 de superficie, se analizó la expresión de CTLA-4 intracelular. Se observaron diferencias moderadas entre cultivos de células T en el día 4 tras la estimulación. Sin embargo, tras un cultivo prolongado sólo se sostuvieron altos niveles de CTLA-4 intracelular en células T tratadas con anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO pero no en células T de control.

Las células T tratadas con anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO se vuelven dobles positivas para CD4 y CD8

10 Tras la estimulación, las células T inducen y regulan por incremento la expresión de varios receptores de superficie, tales como CD25, CD152 (CTLA-4), CD154 (CD40-ligando) y otros. En cambio, se piensa que el nivel de expresión de CD4 o CD8 permanece relativamente constante. Se observó de manera reproducible un fuerte aumento de antígenos tanto CD4 como CD8 en células T tratadas con anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO pero no tratadas con Ac de control tras la activación. La aparición de una población de células T dobles positivas para CD4/CD8 parece deberse a la regulación por incremento de CD4 en el subconjunto CD8+ y a la inversa, CD8 en el subconjunto CD4+. Esto contrasta con un porcentaje moderadamente bajo de células T dobles positivas en los cultivos de control.

Alta expresión de cadena alfa de receptor de IL-2, pero muy baja de cadena beta por células T tratadas con anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO

20 Se sabe que las células Treg son constitutivamente positivas para CD25, la cadena alfa del receptor de IL-2. Se desconoce la regulación de otras subunidades del receptor de IL-2 trimérico en células Treg. Recientemente se ha comparado la expresión de la cadena beta del receptor de IL-2, por ejemplo CD122, en células T activadas y propagadas en presencia o ausencia de anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO. Los resultados muestran que células T tratadas con anticuerpo quimérico de unión a CD45RB/RO tienen aproximadamente diez veces menos expresión de CD122 en comparación con células T en cultivos de control. Esta diferencia puede indicar que las células Treg requieren factores distintos de IL-2 para proliferar.

25 **Ejemplo 8: Secuencias de la invención (las secuencias de CDR de la invención están subrayadas)**

SEQ ID NO:1

Parte de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera quimérica

**DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNIGTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQSNTWPFTFGSGTKLEIK**

SEQ ID NO:2

30 Parte de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada quimérica

**EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTY
NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGQGTTVVSS**

SEQ ID NO:3

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera quimérica

**DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQNIGTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQSNTWPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

35 SEQ ID NO:4

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada química

**EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARS~~GPYAWFDT~~WGQGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEQ ID NO:5

Secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de SEQ ID NO:1

**GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCA
GTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATAACAGTGGTATCAACAAAGA
ACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCT
TCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGA
GTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTCACGTTCCGG
CTCGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA**

5

SEQ ID NO:6

Secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de SEQ ID NO:2

**GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
ATGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCATAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCTCCAACACA
GCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA**

SEQ ID NO:7

10 Parte de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera humanizada denominada humV2 (humV2 = VLm)

**DILLTQSPAT LSLSPGERAT FSCRASQNIG TSIQWYQQKT NGAPRLLIRS SSESISGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK**

SEQ ID NO:8

Parte de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera humanizada denominada humV1 (humV1 = VLh)

**DILLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQNIG TSIQWYQQKP GQAPRLIRS SSESISGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK**

SEQ ID NO:9

5 Parte de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada humanizada denominada VHE

**EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGTKY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTT~~TV~~SS**

SEQ ID NO:10

Parte de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada humanizada denominada VHQ

**QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGTKY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTT~~TV~~SS**

10 SEQ ID NO:11

Secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9

**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA**

SEQ ID NO:12

Secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10

**CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA**

SEQ ID NO:13

Secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7

**GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAA
ACAAATGGTGTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTCACGTTT
GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA**

5 SEQ ID NO:14

Secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8

**GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAA
CCAGGTCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTCACGTTT
GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA**

SEQ ID NO:15

Secuencia de nucleótidos del vector de expresión HCMV-G1 HuAb-VHQ

10 (secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena pesada humanizada que comprende SEQ ID NO:12 (VHQ) desde 3921-4274)

1 AGCTTTTTGC AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
51 GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCATGCATAA ATAAAAAAAAA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTFTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGFTGC TGACTAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTC
301 ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT

401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
 451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
 501 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
 551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
 651 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
 701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
 751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
 801 TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
 851 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
 901 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
 951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT AGCTCACGCT
 1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
 1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG
 1101 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
 1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
 1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
 1301 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG
 1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
 1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCACGT TAAGGGATTT
 1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATFAA
 1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
 1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
 1601 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGAATCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
 1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
 1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
 1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 1801 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC
 1851 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
 1901 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
 1951 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
 2001 TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC

2051 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
 2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
 2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA
 2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
 2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TFACTFTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
 2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
 2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
 2501 AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
 2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC
 2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
 2651 TGTGTGTTTG TCCGAAATAC GCGTTTTGAG ATTTCTGTCTG CCGACTAAAT
 2701 TCATGTCGCG CGATAGTGGT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
 2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTCTG CCGATGTGAG
 2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTCC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
 2851 CGCGATATCT GCGGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
 2901 CGACTTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCTG
 2951 ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA
 3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
 3051 CCATTAGCCA TATTATTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
 3101 TTGGCCATTG CACACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
 3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT
 3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
 3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
 3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
 3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC
 3401 CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCTATTG
 3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
 3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
 3551 TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
 3601 TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
 3651 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAAATGTC GTAACAACCTC

3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
3901 TGGCCCCCGG CGCCACAGC CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
3951 GTGAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
4101 AATGAGAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG
4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCT GGTGTGACAC CTGGGGCCAA
4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
4301 AGCTTTCTGG GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCACAA CCGCGGTCAC ATGGCACCAC
4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCTT
4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC
4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT
4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTAC CCGGAGGCCT CTGCCCGCCC
4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTCCCCA GGCTCTGGGC
5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGACAG
5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCTG
5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCT CACTCCCTCA GCTCGGACAC
5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
5201 CAAATCTTGT GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GGTAAGCCAG
5251 CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCC TAGAGTAGCC
5301 TGATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT

5351 CTTCCCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
5401 CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG
5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCA CCCTCTGCCC
5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCCGAGAA
5801 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
5851 GGTACAGCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCAGC GACATCGCCG
5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
6101 GGTAATGAG TCGGACGGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG
6151 TCGCACGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCTT GTACATACTT CCCGGGCGCC
6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCTT GCGAGACTGT
6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA
6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAAC T AGAATGCAGT
6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCAFTT
6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTA AAAA GCTAAAGGTA
6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG
6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
6751 AGGTTACAGA ATATTTTTCC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
6801 TCCTTTGTGG TGTAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
6851 AGCATGACTC AAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT
6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTCTTCT GAGCAAACA GGTTTTCTC

7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTG ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
7051 TCTAAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
7101 AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTG
7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTACAAAAG ATCCGGGACC
7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTTCGGGGG CATGGATGCG
7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTG CACTGCCGGT
7301 AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
7451 TTTCATAGAA GCGGCGGGTG GAATCGAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGGC
7501 GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCAGTA GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
7601 GTAAAGCACG AGGAAGCGGT CAGCCCATTG GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCCGGCA
7801 TGCGCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTCGAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC
8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
8101 CGCAAGGAAC GCCCGTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCTCGTCC
8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
8201 GCGCCCCTGC GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
8451 GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCCAGTC
8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
8551 TTGCGTTTTT CCTTGTCAG ATAGCCCAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCFTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA

8651 GCCCTTGGCG CCTGAGTGCT TGGGCAGCG TGAAGCT

SEQ ID NO:16

Secuencia de nucleótidos del vector de expresión HCMV-G1 HuAb-VHE

(secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena pesada humanizada que comprende SEQ ID NO: 11 (VHE) desde 3921-4274)

5

1 AGCTTTTTCG AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCTCCTC ACTACTTCTG
51 GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAAA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTTGC AACTTCTGCT CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGAATAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
501 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCCTCGGT
651 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801 TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TCGCCTCTCC TGTTCGGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG
1101 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT

1301 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGT'TTGCAAG
1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAAC'TCACGT TAAGGGATTT
1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTA
1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
1601 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
1801 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
1851 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTG
1901 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
1951 TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
2001 TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
2051 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCACCGAG
2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA
2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTA'CTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
2501 AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCATATCAC
2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
2651 TGTGTGTTTG TCCGAAATAC GCGTTTTGAG ATTTCTGTCG CCGACTAAAT
2701 TCATGTCGCG CGATAGTGGT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTCG CCGATGTGAG
2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTCC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
2851 CGCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
2901 CGACTTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG

2951 ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GCGGACATCA
 3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
 3051 CCATTAGCCA TATTATTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
 3101 TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
 3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT
 3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
 3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
 3301 ACCCCCAGCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
 3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC
 3401 CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG
 3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
 3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
 3551 TACCATGGTG ATGCGGTTT TGGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
 3601 TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
 3651 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC GTAACAACTC
 3701 CGCCCCATG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
 3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
 3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
 3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
 3901 TGGCCCCCGG CGCCCACAGC GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
 3951 GTGAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
 4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
 4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
 4101 AATGAGAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG
 4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
 4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCT GGTTTGACAC CTGGGGCCAA
 4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
 4301 AGCTTTCTGG GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
 4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
 4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
 4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCACA CCGCGGTAC ATGGCACCAC
 4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCT
 4551 CCTCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCTGGGCTG CCTGGTCAAG

4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAACCTCAG GCGCCCTGAC
 4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCCTCA GGACTCTACT
 4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
 4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
 4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
 4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
 4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGCCCCGCC
 4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTCCCCA GGCTCTGGGC
 5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG
 5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCCTG
 5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
 5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
 5201 CAAATCTTGT GACAAAATC ACACATGCC ACCGTGCCA GGTAAGCCAG
 5251 CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCC TAGAGTAGCC
 5301 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
 5351 CTTCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
 5401 CCAAAAACCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG
 5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
 5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
 5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
 5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
 5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
 5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCA CCCTCTGCCC
 5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCCGAGAA
 5801 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
 5851 GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCAGC GACATCGCCG
 5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
 5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCCGT
 6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
 6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
 6101 GGTAAATGAG TCGGACGGCC GGCAAGCCCC CGTCCCCGG GCTCTCGCGG
 6151 TCGCACGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCTT GTACATACTT CCCGGGCGCC
 6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCTT GCGAGACTGT

6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA
6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAAC TACAATGCAGT
6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCATTT
6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTFTTTTAA AGCAAGTAAA
6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG
6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
6751 AGGTTACAGA ATATTTTTCC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
6801 TCCTTTGTGG TGTAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
6851 AGCATGACTC AAAAACTTA GCAATCTGA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT
6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTTCTTCT GAGCAAACA GGTFTTCCTC
7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTC ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
7051 TCTAAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
7101 AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTACAAAG ATCCGGGACC
7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTCGGGGG CATGGATGCG
7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTTG CACTGCCGGT
7301 AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351 AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
7451 TTTCATAGAA GCGCGCGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGGC
7501 GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCAGA GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
7601 GTAAAGCACG AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCCGGCA
7801 TGCGCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG

7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
 7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
 8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC
 8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
 8101 CGCAAGGAAC GCCCGTCTGT GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCCTCGTCC
 8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
 8201 GCGCCCCGTC GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
 8251 TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
 8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
 8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
 8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
 8451 GCCCCAGCTG GCAATTCCGG TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCAGTC
 8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
 8551 TTGCGTTTTTC CTTTGTCCAG ATAGCCCAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
 8601 CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
 8651 GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

SEQ ID NO:17

Secuencia de nucleótidos del vector de expresión HCMV-K HuAb-VL1 hum V1

(secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena ligera humanizada que comprende SEQ ID NO: 14 (humV1=VLh) desde 3964-4284)

5

1 CTAGCTTTTT GCAAAGCCT AGGCCTCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
 51 TGGAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
 101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAC TGGGC GGAGTTAGGG
 151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
 201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
 251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
 301 CCACACCCTA ACTGACACAC AFTCCACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
 351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
 401 GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
 451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
 501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTA CTGAG

551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
651 GTCGTTCCGGC TGCCGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCCTTTTTTC
801 CATAGGCTCC GCCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTC CCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCCTCTT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGT GCGCTTTCTC ATAGCTCAGC
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
1051 TGCACGAACC CCCCCTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT
1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA
1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACCTAC GTTAAGGGAT
1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
1501 AAAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
1601 ATTTCTGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCTGTAG ATAACCTACGA
1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
1801 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT
1901 TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCCTCCGATC
2001 GTTGTTCAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC
2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
2151 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG

2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT
 2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
 2301 CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
 2351 AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA
 2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATAATTATTG AAGCATTAT
 2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAA
 2501 TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
 2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
 2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
 2651 AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
 2701 ATTCATGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
 2751 GGAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
 2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAGTGA TTTTGGGCA
 2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTACGGGG GATGGCGATA
 2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTCGCAAAT ATCGCAGTTT
 2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
 3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
 3051 GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC
 3101 TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
 3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
 3201 ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG
 3251 TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAATGGC CCGCCTGGCT GACCCCCAA
 3301 CGACCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
 3351 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATT ACGGTAAACT
 3401 GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
 3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
 3501 CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
 3551 ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
 3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA CCCCATGAC GTCAATGGGA
 3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
 3701 TCCGCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
 3751 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC
 3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC

3851 AAGCTTGATA TCGAATTCCT GCAGCCCGGG GGATCCGCCC GCTTGCCGCC
3901 ACCATGGAGA CCCCCGCCA GCTGCTGTTC CTGCTGCTGC TGTGGCTGCC
3951 CGACACCACC GCGACATTC TGCTGACCCA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTC
4001 TGAGTCCAGG AGAAAGAGCC ACTCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAACATT
4051 GGCACAAGCA TACAGTGGTA TCAACAAAA CCAGGTCAGG CTCCAAGGCT
4101 TCTCATAAGG TCTTCTCTG AGTCTATCTC TGGGATCCCT TCCAGGTTTA
4151 GTGGCAGTGG ATCAGGGACA GATTTTACTC TTACCATCAG CAGTCTGGAG
4201 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTAGTGTCAA CAAAGTAATA CCTGGCCATT
4251 CACGTTCCGC CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAACGTGAG TATTCTAGAA
4301 AGATCCTAGA ATTCTAAACT CTGAGGGGGT CGGATGACGT GGCCATTCTT
4351 TGCCTAAAGC ATTGAGTTTA CTGCAAGGTC AGAAAAGCAT GCAAAGCCCT
4401 CAGAATGGCT GCAAAGAGCT CCAACAAAAC AATTTAGAAC TTTATTAAGG
4451 AATAGGGGGA AGCTAGGAAG AAACCAAAA CATCAAGATT TTAAATACGC
4501 TTCTTGGTCT CCTFGCTATA ATTATCTGGG ATAAGCATGC TGTTTTCTGT
4551 CTGTCCCTAA CATGCCCTGT GATTATCCGC AAACAACACA CCCAAGGGCA
4601 GAACTTTGTT ACTTAAACAC CATCCTGTTT GCTTCTTTCC TCAGGAACTG
4651 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
4701 TCTGGAAGTGG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
4751 GGCCAAAGTA CAGTGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
4801 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
4851 AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
4901 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
4951 ACAGGGGAGA GTGTTAGAGG GAGAAGTGCC CCCACCTGCT CCTCAGTTCC
5001 AGCCTGACCC CCTCCCATCC TTTGGCCTCT GACCCTTTTT CCACAGGGGA
5051 CCTACCCCTA TTGCGGTCCT CCAGCTCATC TTTCACCTCA CCCCCCTCCT
5101 CCTCCTTGGC TTTAATTATG CTAATGTTGG AGGAGAATGA ATAAATAAAG
5151 TGAATCTTTG CACCTGTGGT TTCTCTCTTT CCTCATTTAA TAATTATTAT
5201 CTGTTGTTTA CCAACTACTC AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG
5251 TCATCCTAAG GCGCATAACC ATTTATAAAA ATCATCCTTC ATTCTATTTT
5301 ACCCTATCAT CCTCTGCAAG ACAGTCCCTC CTCAAACCCA CAAGCCTTCT
5351 GTCCTCACAG TCCCCTGGGC CATGGTAGGA GAGACTTGCT TCCTTGTTTT
5401 CCCCTCCTCA GCAAGCCCTC ATAGTCTTTT TTAAGGGTGA CAGGTCTTAC
5451 AGTCATATAT CCTTTGATTC AATTCCTGA GAATCAACCA AAGCAAATTT

5501 TTCAAAGAA GAAACCTGCT ATAAAGAGAA TCATTCATTG CAACATGATA
5551 TAAAATAACA ACACAATAAA AGCAATTAAA TAAACAAACA ATAGGGAAAT
5601 GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TGGAATGTCA TGCCTTATTT
5651 ACATTTTTAA ACAGGTACTG AGGGACTCCT GTCTGCCAAG GGCCGTATTG
5701 AGTACTTTCC ACAACCTAAT TTAATCCACA CTATACTGTG AGATTAAAAA
5751 CATTCATTAA AATGTTGCAA AGGTTCTATA AAGCTGAGAG ACAAATATAT
5801 TCTATAACTC AGCAATCCCA CTTCTAGATG ACTGAGTGTC CCCACCCACC
5851 AAAAACTAT GCAAGAATGT TCAAAGCAGC TTTATTTACA AAAGCCAAAA
5901 ATTGGAAATA GCCCGATTGT CCAACAATAG AATGAGTTAT TAACTGTGG
5951 TATGTTTATA CATTAGAATA CCCAATGAGG AGAATTAACA AGCTACAAC
6001 ATACCTACTC ACACAGATGA ATCTCATAAA AATAATGTTA CATAAGAGAA
6051 ACTCAATGCA AAAGATATGT TCTGTATGTT TTCATCCATA TAAAGTTCAA
6101 AACCAGGTAA AAATAAAGTT AGAAATTTGG ATGGAAATTA CTCTTAGCTG
6151 GGGGTGGGCG AGTTAGTGCC TGGGAGAAGA CAAGAAGGGG CTTCTGGGGT
6201 CTTGGTAATG TTCTGTTCCCT CGTGTGGGGT TGTGCAGTTA TGATCTGTGC
6251 ACTGTTCTGT ATACACATTA TGCTTCAAAA TAACTTCACA TAAAGAACAT
6301 CTTATACCCA GTTAATAGAT AGAAGAGGAA TAAGTAATAG GTCAAGACCA
6351 CGCAGCTGGT AAGTGGGGGG GCCTGGGATC AAATAGCTAC CTGCCTAATC
6401 CTGCCCTCTT GAGCCCTGAA TGAGTCTGCC TTCCAGGGCT CAAGGTGCTC
6451 AACAAAACA CAGGCCTGCT ATTTTCCCTGG CATCTGTGCC CTGTTTGGCT
6501 AGCTAGGAGC ACACATACAT AGAAATTTAAA TGAAACAGAC CTTCAGCAAG
6551 GGGACAGAGG ACAGAATTAA CCTTGCCAG AACTGGAAA CCCATGTATG
6601 AACACTCACA TGTTTGGGAA GGGGAAGGG CACATGTAAA TGAGGACTCT
6651 TCCTCATTCT ATGGGGCACT CTGGCCCTGC CCCTCTCAGC TACTCATCCA
6701 TCCAACACAC CTTTCTAAGT ACCTCTCTCT GCCTTACTC TGAAGGGGTT
6751 CAGGAGTAAC TAACACAGCA TCCCTTCCCT CAAATGACTG ACAATCCCTT
6801 TGTCTGTCTT TGTTTTTCTT TCCAGTCAGT ACTGGGAAAAG TGGGGAAGGA
6851 CAGTCATGGA GAAACTACAT AAGGAAGCAC CTTGCCCTTC TGCCTCTTGA
6901 GAATGTTGAT GAGTATCAA TCTTTCAAAC TTTGGAGGTT TGAGTAGGGG
6951 TGAGACTCAG TAATGTCCCT TCCAATGACA TGAACCTGCT CACTCATCCC
7001 TGGGGGCCAA ATTGAACAAT CAAAGGCAGG CATAATCCAG CTATGAATTC
7051 TAGGATCGAT CCAGACATGA TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA
7101 CAACTAGAAT GCAGTGAAAA AAATGCTTTA TTTGTGAAAT TTGTGATGCT

7151 ATTGCTTTAT TTGTAACCAT TATAAGCTGC AATAACAAG TTAACAACAA
7201 CAATTGCATT CATTTTATGT TTCAGGTTCA GGGGGAGGTG TGGGAGGTTT
7251 TTAAAGCAA GTAAAACCTC TACAAATGTG GTATGGCTGA TTATGATCTC
7301 TAGTCAAGGC ACTATACATC AAATATTCCT TATTAACCCC TTTACAAATT
7351 AAAAAGCTAA AGGTACACAA TTTTGAGCA TAGTTATTAA TAGCAGACAC
7401 TCTATGCCTG TGTGGAGTAA GAAAAACAG TATGTTATGA TTATAACTGT
7451 TATGCCTACT TATAAAGGTT ACAGAATATT TTTCCATAAT TTTCTTGTAT
7501 AGCAGTGCAG CTTTTTCCTT TGTGGTGTA ATAGCAAAGC AAGCAAGAGT
7551 TCTATTACTA AACACAGCAT GACTCAAAAA ACTTAGCAAT TCTGAAGGAA
7601 AGTCCTTGGG GTCTTCTACC TTTCTCTTCT TTTTGGAGG AGTAGAATGT
7651 TGAGAGTCAG CAGTAGCCTC ATCATCACTA GATGGCATT TTTCTGAGCA
7701 AACAGGTTT TCCTCATTAA AGGCATTCCA CCACTGCTCC CATTCATCAG
7751 TTCCATAGGT TGGAACTAA AATACACAAA CAATTAGAAT CAGTAGTTTA
7801 ACACATTATA CACTTAAAA TTTTATATTT ACCTTAGAGC TTTAAATCTC
7851 TGTAGGTAGT TTGTCCAATT ATGTCACACC ACAGAAGTAA GGTTCTTCA
7901 CAAAGATCCG GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CTGTCAGTTC
7951 GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTTCTGG ATGCCGACGG
8001 ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG
8051 CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA AGAACTCCAG
8101 CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC CGGAAAACGA
8151 TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC GAAATCTCGT
8201 GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCGGTC ATTTTGAACC CCAGAGTCCC
8251 GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC
8301 GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC CATTGCGCGC
8351 CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC CTGATAGCGG
8401 TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA AGCGGCCATT
8451 TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC ACGACGAGAT
8501 CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTCGGCTGGC
8551 GCGAGCCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC
8601 TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCTGCT TGGTGGTCGA
8651 ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGAT TGCATCAGCC
8701 ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA GGAGATCCTG
8751 CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT TCAGTGACAA

8801 CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG CCACGATAGC
 8851 CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCATTCAGG GCACCGGACA GGTCGGTCTT
 8901 GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC ACGGCGGCAT
 8951 CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCAGT CATAGCCGAA TAGCCTCTCC
 9001 ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TGCCTGCAAT CCATCTTGTT CAATCATGCG
 9051 AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCGCCATC
 9101 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA GGGCTTCCCA
 9151 ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCGC TTGCTGTCCA
 9201 TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT
 9251 GCTTTCTCTT TGCCTTGC G TTTCCCTTG TCCAGATAGC CCAGTAGCTG
 9301 ACATTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT TCTACGTGTT
 9351 CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TGCGCCCTGA GTGCTTGCGG CAGCGTGAAG

SEQ ID NO:18

Secuencia de nucleótidos del vector de expresión HCMV-K HuAb-VL1 hum V2

(secuencia de ADN completa de un vector de expresión de cadena ligera humanizada que comprende SEQ ID NO: 13 (humV2=VLm) desde 3926-4246)

5

1 CTAGCTTTTT GCAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
 51 TGGAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGCCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
 101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
 151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
 201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
 251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
 301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
 351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
 401 GTCTGTAAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
 451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
 501 CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTAAGTGA
 551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAA
 601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
 651 GTCGTTCCGGC TCGGCGGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
 701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAAG

751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCCTTTTTTC
801 CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCCTCTT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCTT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCACG
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
1051 TGCACGAACC CCCCCTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT
1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTTT TTTGTTTGCA
1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
1601 ATTTCTGTTA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACGA
1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCTCC ATCCAGTCTA
1801 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCTGT
1901 TGGTATGGCT TCATTAGCTT CCGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
2001 GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC
2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
2151 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG
2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT
2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
2301 CCCAACTGAT CTTTACGATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
2351 AAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA

2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT
 2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
 2501 TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
 2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
 2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
 2651 AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
 2701 ATTCATGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
 2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
 2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAGTGA TTTTGGGCA
 2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA
 2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCGTG TGTCGCAAAT ATCGCAGTTT
 2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
 3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
 3051 GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC
 3101 TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
 3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
 3201 ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG
 3251 TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA
 3301 CGACCCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAAACG
 3351 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT
 3401 GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
 3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
 3501 CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
 3551 ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
 3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
 3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
 3701 TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
 3751 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC
 3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC
 3851 AAGCTTGCCG CCACCATGGA GACCCCCGCC CAGCTGCTGT TCCTGCTGCT
 3901 GCTGTGGCTG CCCGACACCA CCGGCGACAT TCTGCTGACC CAGTCTCCAG
 3951 CCACCCTGTC TCTGAGTCCA GGAGAAAGAG CCACTTTCTC CTGCAGGGCC
 4001 AGTCAGAACA TTGGCACAAG CATAAGTGG TATCAACAAA AAACAAATGG

4051 TGCTCCAAGG CTTCTCATAA GGTCTTCTTC TGAGTCTATC TCTGGGATCC
 4101 CTTCCAGGTT TAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTTAC TCTTACCATC
 4151 AGCAGTCTGG AGCCTGAAGA TTTTGCAGTG TATTACTGTC AACAAAGTAA
 4201 TACCTGGCCA TTCACGTTTC GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGTG
 4251 AGTATTCTAG AAAGATCCTA GAATTCTAAA CTCTGAGGGG GTCGGATGAC
 4301 GTGGCCATTC TTTGCCTAAA GCATTGAGTT TACTGCAAGG TCAGAAAAGC
 4351 ATGCAAAGCC CTCAGAATGG CTGCAAAGAG CTCCAACAAA ACAATTTAGA
 4401 ACTTTATTAA GGAATAGGGG GAAGCTAGGA AGAAACTCAA AACATCAAGA
 4451 TTTTAAATAC GCTTCTTGGT CTCCTTGCTA TAATTATCTG GGATAAGCAT
 4501 GCTGTTTTCT GTCTGTCCCT AACATGCCCT GTGATTATCC GCAAACAACA
 4551 CACCCAAGGG CAGAACTTTG TTACTTAAAC ACCATCCTGT TTGCTTCTTT
 4601 CCTCAGGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC GCCATCTGAT
 4651 GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCTGTC TGAATAACTT
 4701 CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT
 4751 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC
 4801 TACAGCCTCA GCAGCACCTT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA
 4851 CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA
 4901 CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTAGA GGGAGAAGTG CCCCACCTG
 4951 CTCCTCAGTT CCAGCCTGAC CCCCTCCCAT CCTTTGGCCT CTGACCCTTT
 5001 TTCCACAGGG GACCTACCCC TATGCGGTC CTCCAGCTCA TCTTTCACCT
 5051 CACCCCCCTC CTCCTCCTTG GCTTTAATTA TGCTAATGTT GGAGGAGAAT
 5101 GAATAAATAA AGTGAATCTT TGCACCTGTG GTTTCTCTCT TTCCTCATTT
 5151 AATAATTATT ATCTGTTGTT TACCAACTAC TCAATTTCTC TTATAAGGGA
 5201 CTAAATATGT AGTCATCCTA AGGCGCATAA CCATTTATAA AAATCATCCT
 5251 TCATTCTATT TTACCCTATC ATCCTCTGCA AGACAGTCCT CCCTCAAACC
 5301 CACAAGCCTT CTGTCCTCAC AGTCCCCTGG GCCATGGTAG GAGAGACTTG
 5351 CTTCCTTGTT TTCCCCTCCT CAGCAAGCCC TCATAGTCCT TTTTAAGGGT
 5401 GACAGGTCCT ACAGTCATAT ATCCTTTGAT TCAATTCCTT GAGAATCAAC
 5451 CAAAGCAAAT TTTTCAAAG AAGAAACCTG CTATAAAGAG AATCATTCAT
 5501 TGCAACATGA TATAAATAA CAACACAATA AAAGCAATTA AATAAACAAA
 5551 CAATAGGGAA ATGTTTAAGT TCATCATGGT ACTTAGACTT AATGGAATGT
 5601 CATGCCTTAT TTACATTTTT AACAGGTAC TGAGGGACTC CTGTCTGCCA
 5651 AGGGCCGTAT TGAGTACTTT CCACAACCTA ATTTAATCCA CACTATACTG

5701 TGAGATTAAA AACATTCATT AAAATGTTGC AAAGGTTCTA TAAAGCTGAG
 5751 AGACAAATAT ATTCTATAAC TCAGCAATCC CACTTCTAGA TGA CTGAGTG
 5801 TCCCCACCCA CCAAAAAACT ATGCAAGAAT GTTCAAAGCA GCTTTATTTA
 5851 CAAAAGCCAA AAATTGGAAA TAGCCCGATT GTCCAACAAT AGAATGAGTT
 5901 ATTAAACTGT GGTATGTTTA TACATTAGAA TACCCAATGA GGAGAATTAA
 5951 CAAGCTACAA CTATACCTAC TCACACAGAT GAATCTCATA AAAATAATGT
 6001 TACATAAGAG AAACTCAATG CAAAAGATAT GTTCTGTATG TTTTCATCCA
 6051 TATAAAGTTC AAAACCAGGT AAAAATAAAG TTAGAAATTT GGATGGAAAT
 6101 TACTCTTAGC TGGGGGTGGG CGAGTTAGTG CCTGGGAGAA GACAAGAAGG
 6151 GGCTTCTGGG GTCTTGGTAA TGTCTGTTC CTCGTGTGGG GTTGTGCAGT
 6201 TATGATCTGT GCACTGTTCT GTATACACAT TATGCTTCAA AATAACTTCA
 6251 CATAAAGAAC ATCTTATACC CAGTTAATAG ATAGAAGAGG AATAAGTAAT
 6301 AGGTCAAGAC CACGCAGCTG GTAAGTGGGG GGGCCTGGGA TCAAATAGCT
 6351 ACCTGCCTAA TCCTGCCCTC TTGAGCCCTG AATGAGTCTG CCTTCCAGGG
 6401 CTCAAGGTGC TCAACAAAAC AACAGGCCTG CTATTTTCTT GGCATCTGTG
 6451 CCGTGTTTGG CTAGCTAGGA GCACACATAC ATAGAAATTA AATGAAACAG
 6501 ACCTTCAGCA AGGGGACAGA GGACAGAATT AACCTTGCCC AGACACTGGA
 6551 AACCCATGTA TGAACACTCA CATGTTTGGG AAGGGGGAAG GGCACATGTA
 6601 AATGAGGACT CTTCTCATF CTATGGGGCA CTCTGGCCCT GCCCCTCTCA
 6651 GCTACTCATC CATCCAACAC ACCTTTCTAA GTACCTCTCT CTGCCTACAC
 6701 TCTGAAGGGG TTCAGGAGTA ACTAACACAG CATCCCTTCC CTCAAATGAC
 6751 TGACAATCCC TTTGTCTG CTTGTTTTTC TTTCCAGTCA GTACTGGGAA
 6801 AGTGGGGAAG GACAGTCATG GAGAACTAC ATAAGGAAGC ACCTTGCCCT
 6851 TCTGCCTCTT GAGAATGTTG ATGAGTATCA AATCTTTCAA ACTTTGGAGG
 6901 TTTGAGTAGG GGTGAGACTC AGTAATGTCC CTTCCAATGA CATGAACFTG
 6951 CTCACTCATC CCTGGGGGCC AAATTGAACA ATCAAAGGCA GGCATAATCC
 7001 AGCTATGAAT TCTAGGATCG ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT
 7051 TTGGACAAAC CACAAC TAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT TATTTGTGAA
 7101 ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC ATTATAAGCT GCAATAAACA
 7151 AGTTAACAAC AACAATTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG
 7201 TGTGGGAGGT TTTTTAAAGC AAGTAAAACC TCTACAAATG TGGTATGGCT
 7251 GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA TCAAATATTC CTTATTAACC
 7301 CCTTTACAAA TTAAAAAGCT AAAGGTACAC AATTTTTGAG CATAGTTATT

7351 AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT AAGAAAAAAC AGTATGTTAT
7401 GATTATAACT GTTATGCCTA CTTATAAAGG TTACAGAATA TTTTCCATA
7451 ATTTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTTCC TTTGTGGTGT AAATAGCAAA
7501 GCAAGCAAGA GTTCTATTAC TAAACACAGC ATGACTCAA AACTTAGCA
7551 ATTCTGAAGG AAAGTCCTTG GGGTCTTCTA CCTTTCTCTT CTTTTTTGGA
7601 GGAGTAGAAT GTTGAGAGTC AGCAGTAGCC TCATCATCAC TAGATGGCAT
7651 TTCTTCTGAG CAAAACAGGT TTTCCTCATT AAAGGCATTC CACCACTGCT
7701 CCCATTCATC AGTTCATAG GTTGAATCT AAAATACACA AACAATTAGA
7751 ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTTAAA AATTTTATAT TTACCTTAGA
7801 GCTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTTGTCCAA TTATGTCACA CCACAGAAGT
7851 AAGGTTCTT CACAAAGATC CGGGACCAA GCGGCCATCG TGCCTCCCA
7901 CTCCTGCAGT TCGGGGCAT GGATGCGCGG ATAGCCGCTG CTGGTTTCT
7951 GGATGCCGAC GGATTTGCAC TGCCGTTAGA ACTCCGCGAG GTCGTCCAGC
8001 CTCAGGCAGC AGCTGAACCA ACTCGCGAGG GGATCGAGCC CGGGGTGGC
8051 GAAGAACTCC AGCATGAGAT CCCCGCGCTG GAGGATCATC CAGCCGGCGT
8101 CCCGAAAAC GATTCCGAAG CCCAACCTTT CATAGAAGGC GCGGTGGAA
8151 TCGAAATCTC GTGATGGCAG GTTGGCGTC GCTTGGTCGG TCATTTCGAA
8201 CCCAGAGTC CCGCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAGGCGAT AGAAGGCGAT
8251 GCGCTGCGAA TCGGGAGCGG CGATACCGTA AAGCACGAGG AAGCGGTCAG
8301 CCCATTGCC GCCAAGCTCT TCAGCAATAT CACGGGTAGC CAACGCTATG
8351 TCCTGATAGC GGTCCGCCAC ACCCAGCCGG CCACAGTCGA TGAATCCAGA
8401 AAAGCGGCA TTTTCCACCA TGATATTCGG CAAGCAGGCA TCGCCATGGG
8451 TCACGACGAG ATCCTCGCCG TCGGGCATGC GCGCCTTGAG CCTGGCGAAC
8501 AGTTCGGCTG GCGCGAGCCC CTGATGCTCT TCGTCCAGAT CATCCTGATC
8551 GACAAGACCG GCTTCATCC GAGTACGTGC TCGCTCGATG CGATGTTTCG
8601 CTTGGTGGTC GAATGGGCAG GTAGCCGGAT CAAGCGTATG CAGCCGCCG
8651 ATTGCATCAG CCATGATGGA TACTTTCTCG GCAGGAGCAA GGTGAGATGA
8701 CAGGAGATCC TGCCCCGCA CTTCCGCCAA TAGCAGCCAG TCCCTTCCCG
8751 CTTCAAGTAC AACGTCGAGC ACAGCTGCGC AAGGAACGCC CGTCGTGGCC
8801 AGCCACGATA GCCGCGCTGC CTCGTCCTGC AGTTCATTCA GGCACCGGA
8851 CAGGTCGGTC TTGACAAAA GAACCGGGCG CCCCTGCGCT GACAGCCGGA
8901 ACACGGCGGC ATCAGAGCAG CCGATGTCT GTTGTGCCA GTCATAGCCG
8951 AATAGCCTCT CCACCAAGC GGCCGGAGAA CCTGCGTGCA ATCCATCTTG

ES 2 374 554 T3

9001 TTCAATCATG CGAAACGATC CTCATCCTGT CTCTTGATCA GATCTTGATC
9051 CCCTGCGCCA TCAGATCCTT GCGGCAAGA AAGCCATCCA GTTACTTTG
9101 CAGGGCTTCC CAACCTTACC AGAGGGCGCC CCAGCTGGCA ATTCCGGTTC
9151 GCTTGCTGTC CATAAAACCG CCCAGTCTAG CTATCGCCAT GTAAGCCCAC
9201 TGCAAGCTAC CTGCTTTCTC TTTGCGCTTG CGTTTTCCCT TGTCCAGATA
9251 GCCCAGTAGC TGACATTCAT CCGGGGTCAG CACCGTTTCT GCGGACTGGC
9301 TTTCTACGTG TTCCGCTTCC TTTAGCAGCC CTTGCGCCCT GAGTGCTTGC
9351 GGCAGCGTGA AG

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo humanizado anti-CD45RO/RB que comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID No:9 o de SEQ ID No:10 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID No:7 o de SEQ ID No:8.
2. Anticuerpo humanizado anti-CD45RO/RB según la reivindicación 1 que comprende:
 - 5 - una región variable de cadena pesada de SEQ ID No:9 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID No:7;
 - una región variable de cadena pesada de SEQ ID No:9 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID No:8;
 - una región variable de cadena pesada de SEQ ID No: 10 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID No:7, o
 - una región variable de cadena pesada de SEQ ID No: 10 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID No:8.
3. Polinucleótidos aislados que codifican para un anticuerpo humanizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
10
4. Polinucleótidos aislados que codifican para una región variable de cadena ligera de SEQ ID No:7 o SEQ ID No:8 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID No:9 o SEQ ID No:10.
5. Polinucleótido según la reivindicación 4, que comprende SEQ ID No:11 o SEQ ID No: 12 y SEQ ID No: 13 o SEQ ID No:14.
- 15 6. Vector de expresión que comprende polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. Sistema de expresión que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, pudiendo dicho sistema de expresión producir un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, cuando dicho sistema de expresión o parte del mismo está presente en una célula huésped compatible.
8. Célula huésped aislada que comprende un sistema de expresión según la reivindicación 7.
- 20 9. Uso del anticuerpo humanizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 como producto farmacéutico.
10. Uso del anticuerpo humanizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la preparación de un medicamento que va a usarse en el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y alergias.
- 25 11. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en asociación con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.









