

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 319**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99934931 .9**
96 Fecha de presentación: **21.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1098909**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2001**

54 Título: **Anticuerpo IGG contra CD3 híbrido humano/roedor, y métodos de construcción del mismo**

30 Prioridad:
21.07.1998 GB 9815909

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.07.2012

73 Titular/es:
BTG International Limited
5 Fleet Place
London EC4M 7RD, GB

72 Inventor/es:
WALDMANN, Herman y
FREWIN, Mark

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 384 319 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo IGG contra CD3 híbrido humano/roedor, y métodos de construcción del mismo

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos dirigidos contra el complejo antigénico CD3 humano, al ADN y al ARN que codifican la producción de estos anticuerpos, a las líneas celulares que contienen dicho ADN y/o ARN capaces de producirlos y a los métodos de producción de los anticuerpos utilizando el ADN, el ARN y/o las células.

El antígeno CD3 humano consta de un mínimo de cuatro cadenas polipeptídicas invariables, que están asociadas no-covalentemente a los receptores de células T sobre la superficie de las células T, y generalmente se conoce en la actualidad como complejo antigénico CD3. Éste está íntimamente implicado en el proceso de activación de las células T en respuesta al reconocimiento de antígenos por los receptores de las células T. Todos los anticuerpos monoclonales para CD3 pueden ser utilizados para sensibilizar las células T a estímulos proliferativos secundarios tales como IL1 (interleuquina 1) e IL2 (interleuquina 2). Además, ciertos anticuerpos monoclonales para CD3 son a su vez mitogénicos para las células T. Esta propiedad es dependiente del isotipo y resulta de la interacción del dominio Fc del anticuerpo para con los receptores de Fc sobre la superficie de las células accesorias.

Los anticuerpos para CD3 de roedor se han utilizado para influir en el estado inmunológico mediante la supresión, mejora o redireccionamiento de las respuestas de las células T a los antígenos. Por lo tanto, tienen un potencial terapéutico considerable en el ser humano para su uso como agentes inmunosupresores, por ejemplo para el tratamiento de episodios de rechazo después del trasplante de aloinjertos renales, hepáticos y cardíacos.

El documento WO 92/06193 y sus equivalentes (GB 2249310A, Appn Nos. EP. 91917169.4, JP 516117/91) estudian el problema de la respuesta de antiglobulinas al anticuerpo para CD3 reestructurando o "humanizando" los genes de la región variable para los anticuerpos y expresándolos asociados con los genes de los dominios constantes humanos correspondientes. Esto reduce el contenido no humano del anticuerpo monoclonal a un nivel tan bajo que es poco probable una respuesta de antiglobulina.

El documento WO 93/19196 y sus equivalentes (por ejemplo, EP 0586617, US 5585097) estudian el problema de la respuesta a la primera dosis. Estos ilustran el uso de anticuerpos para CD3 aglicosilados humanizados de la subclase IgG que, sorprendentemente, conservan su especificidad de unión al antígeno y sus propiedades inmunosupresoras y sin embargo no inducen la mitogénesis de las células T *in vitro* e inducen un nivel reducido de liberación de citoquinas *in vivo*, mientras que todavía mantienen cierta capacidad de unión a Fc.

Si bien estos anticuerpos para CD3 tienen gran valor terapéutico, se ha demostrado que su producción en cultivos de células no es fácil. En la práctica, el rendimiento escaso de anticuerpos se encuentra acompañado por un crecimiento pobre de la línea de células transfectadas. Después de mucho trabajo durante varios años los mejores niveles de anticuerpos alcanzados han sido alrededor de 10 µg/ml, con células que expresan anticuerpos para CD3 que crecen muy lentamente. Además, estas células tienden a anularse con el tiempo en los sistemas de cartuchos huecos utilizados para la producción a gran escala.

El sistema vector para la Síntesis de Glutamina de Celltech PEE12 utilizado en la expresión antes mencionada de anticuerpos para CD3 proporciona rutinariamente una expresión de otros anticuerpos humanizados de alrededor de 200 µg/ml. La línea celular de hibridoma original de rata (YTH 12.5) se expresó a un nivel relativamente normal de 100 µg/ml en cultivo celular, lo que indica la escasa producción de anticuerpos que se asocia con la forma humanizada. Parece que son una o más de las proteínas humanizadas expresadas las que resultan tóxicas para las células, ya que después de la transfección de las células, éstas tienden a anularse más rápido de lo que crecen.

Los autores de la presente invención han encontrado ahora sorprendentemente que mediante la producción de una forma quimérica del anticuerpo anti-CD3, que une la región variable de la cadena ligera para CD3 de rata con la región constante lambda humana y la clonación de ésta en PEE12 que contiene la cadena pesada aglicosilada para CD3 humanizada, pueden producir líneas celulares de mieloma que proporcionan la expresión de anticuerpos para CD3 aglicosilados funcionales en 60 a 100 µg/ml de cultivo. Mediante el uso de la clonación por dilución limitante algunos de los clones se pueden seleccionar para proporcionar niveles aún más altos de expresión, por ejemplo del orden de 120 µg/ml, y permanecer estables en el cultivo a largo plazo con producción a gran escala sin ningún efecto adverso sobre el crecimiento celular. De este modo, los anticuerpos quiméricos de la presente invención ofrecen una buena capacidad de producción sin la respuesta de antiglobulina normalmente asociada con los anticuerpos derivados de rata.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo IgG que tiene afinidad de unión por el complejo antigénico CD3 en el que en la cadena pesada tiene un marco de la región variable junto con al menos una CDR seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de los SEC ID No. 2, 4 y 6 y las respectivas variantes modificadas conservativamente de las mismas y la cadena ligera tiene un marco de la región variable con al menos una CDR seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de los SEC ID No. 8, 10 y 12 y las respectivas variantes modificadas conservativamente de las mismas caracterizadas por que el marco de la región variable de la

cadena pesada corresponde, en cuanto a la secuencia, a la secuencia de tipo humano y la región variable de la cadena ligera incluye uno o más de los aminoácidos específicos característicos de la secuencia de tipo roedor.

Preferiblemente, la región variable de la cadena ligera incluye suficientes aminoácidos específicos para la secuencia de tipo roedor de manera que las cadenas ligeras y pesadas se asocian más fuertemente que cuando la región variable de cadena ligera es del tipo completamente humano correspondiente. Ésta puede ser convenientemente tal que la región variable de la cadena ligera se corresponda enteramente con la secuencia de roedor, por ejemplo, rata. Alternativamente se pueden incluir sólo algunos o incluso uno de los aminoácidos característicos de rata.

Los aminoácidos concretos que son de tipo roedor en lugar de tipo humano en la secuencia de la región variable de cadena ligera se seleccionan entre los que se muestran en la SEC ID No. 14 en la lista de secuencias adjunta, que es la secuencia marco de la región variable de la cadena ligera preferida donde han sido incluidos todos los posibles aminoácidos característicos del marco de rata posible, junto con las respectivas secuencias de CDR. Así los aminoácidos característicos de la región marco variable de la cadena ligera de rata del SEC ID No. 14 son: Gln-1, Ala-2, Val-3, Val-4, Ala-7, Asn-8, Thr-12, Leu-14, Ser-16, Lys-19, Leu-20, Leu-39, Tyr-40, Glu-41, Ser-44, Met-48, Tyr-50, Phe-75, Ser-79, Asn-80, Val-81, Ala-82, Ile-83, Ile-88 y Phe-90. Los correspondientes aminoácidos humanos son en cada caso Asp-1, Phe-2, Met-3, Leu-4, Pro-7, His-8, Glu-12, Pro-14, Lys-15, Ile-19, Ile-20, Gln-39, Arg-40, Pro-41, Ala-44, Val-48, Phe-50, Ser-75, Ser-79, Gly-80, Leu-81, Gln-82, Thr-83, Asp-88 y Tyr-90. La última secuencia humana se ilustra en la página 6 del documento EP 0586617 B y en la correspondiente solicitud de patente de los Estados Unidos.

Convenientemente, el marco de la región variable de la cadena pesada es de tipo humano y la región variable de la cadena ligera es de tipo roedor, teniendo ésta todos los aminoácidos anteriormente mencionados del tipo de rata del SEC ID No. 14. Sin embargo, una o más, pero no todas estas posiciones del SEC ID No. 14 pueden ser del tipo humano, siempre y cuando se encuentre presente suficiente secuencia de roedor, p. ej. rata para permitir que se logre una interacción cadena ligera-cadena pesada estable por encima de la proporcionada por la forma completamente humanizada de la técnica anterior. Dicha interacción es preferentemente de tal manera que cuando el anticuerpo es expresado en células PEE 12 utilizando las instrucciones del proveedor (Celltech) se consigue un exceso de 50 µg/ml, más preferiblemente un exceso de 100 µg/ml. Preferiblemente, estas células no deben tender a anularse en un número significativo después de varias semanas de utilización.

Los expertos en la técnica comprenderán que mecanismos tales como la mutagénesis dirigida al sitio utilizando PCR permitirán la producción necesaria de estas diversas cadenas variables ligeras de manera que todas las realizaciones de la invención puedan ser producidas sin una carga indebida y escrutadas para determinar los niveles de expresión a partir de las células PEE12.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de los SEC ID No. 2, 4, 6, 8, 10 y 12 corresponden a las CDR (a)', (b), (c), (d), (e) y (f) del documento WO 93/19196 y las propias CDR también pueden ser referidas como las respectivas CDR (a) a (f) de más abajo.

Preferiblemente, la cadena pesada y/o la cadena ligera tienen cada una sus tres CDR respectivas del SEC ID No. 2, 4 y 6 y del SEQ. ID. No. 8, 10 y 12.

Preferiblemente, el anticuerpo es aglicosilado. El término aglicosilado se emplea en su uso normal para indicar que los anticuerpos de acuerdo con la invención no están glicosilados.

Por el término "tipo humano" con respecto a la región marco se entiende un marco que es bastante similar al marco humano que es sustancialmente no inmunogénico en seres humanos cuando está presente en un anticuerpo intacto. Preferiblemente un anticuerpo de la invención que tiene una cadena pesada con un marco de tipo humano tiene una afinidad entre 60 y 140%, más típicamente al menos 80 a 100%, con los anticuerpos de roedores para el antígeno CD3. Las características de los anticuerpos monoclonales humanizados y los métodos para producir estos anticuerpos monoclonales de roedores se describen en el documento US 5585089. La comparación de la región variable de la cadena pesada de tipo humano con la de su contraparte de rata puede realizarse mediante la comparación del SEC ID No. 16 (rata) con la región correspondiente encontrada en el extremo N-terminal del SEC ID No. 20. El SEC ID No. 15 es el del ADN que codifica el SEC ID No. 16. De este modo, una región marco de tipo humano puede tener, por ejemplo, siete o más de los trece cambios que distinguen la secuencia de los 119 aminoácidos N-terminales del SEC ID No. 20 de la del SEC ID No. 16. Más preferiblemente se incorporan todos los aminoácidos del tipo humano. Estos cambios pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las posiciones 5, 18, 19, 42, 49, 75, 77, 78, 88, 93, 97, 98 y 114 de estas secuencias.

Por el término "tipo de roedor" con respecto a la región marco se entiende un marco que corresponde, en cuanto a la secuencia de aminoácidos, a la de un anticuerpo de un roedor, por ejemplo, una rata o un ratón. En el caso de los anticuerpos anti-CD3 los aminoácidos del marco convenientes son los de un anticuerpo de rata.

Se encuentra un estudio más amplio de los antígenos CD3 en el informe de First International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens y la descripción de varios anticuerpos glicosilados dirigidos

contra el antígeno CD3 también se encuentra en los informes de esta serie de Workshops and Conferences, en particular el Tercero y Cuarto, publicados por Oxford University Press. Los ejemplos específicos de tales anticuerpos incluyen los descritos por Van Lier et al., Euro. J. Immunol., 1987, 17, 1599-1604, Alegre et al., J. Immunol., 1991, 140, 1184, y por Smith et al., ibid, 1986, 16, 478, refiriéndose la última publicación a los anticuerpos IgG1 UCHT1 y variantes de los mismos.

Sin embargo, tienen un particular interés como base para los anticuerpos de acuerdo con la presente invención las CDR contenidas en los anticuerpos OKT3 e YTH 12.5.14.2. El anticuerpo OKT3 se comenta en publicaciones tales como Chatenaud et al., Transplantation, 1991, 51, 334 y New England Journal of Medicine, 1985, 313, 339, y también en las patentes EP 0 018 795 y US 4.361.539. El anticuerpo YTH 12.5.14.2 (denominado en lo sucesivo YTH 12.5) se comenta en publicaciones tales como Clark et al., European J. Immunol., 1989, 19, 381-388 y los anticuerpos YTH 12.5 reformados son el objeto de las patentes EP 0504350 y US 5585097, describiendo en detalle estas solicitudes las CDR presentes en este anticuerpo.

El término "variantes modificadas conservativamente" es bien conocido en la técnica e indica las variantes que contienen cambios que no tienen sustancialmente efecto sobre la afinidad anticuerpo-antígeno. Este término se define convenientemente como se encuentra en el documento US 5380712.

De las CDR, las CDR de la cadena pesada (a), (b) y (c) son de la mayor importancia. Los expertos en la técnica comprenderán que los anticuerpos de la invención también comprenden dominios constantes.

Las CDR (a), (b) y (c) están dispuestas en la cadena pesada en el orden de secuencia: región marco humana 1 / (a) / región marco humana 2 / (b) / región marco humana 3 / (c) / región marco humana 4 en una dirección líder a dominio constante (N-terminal a C-terminal) y las CDR (d), (e) y (f) están dispuestas en la cadena ligera en la secuencia: región marco de roedor 1 / (d) / región marco de roedor 2 / (e) / región marco de roedor 3 / (f) / región marco de roedor 4 en una dirección líder a dominio constante. Se prefiere, por lo tanto, que cuando las tres estén presentes las CDR de la cadena pesada estén dispuestas en la secuencia (a), (b), (c) en una dirección líder a dominio constante y las CDR de la cadena ligera estén dispuestas en la secuencia (d), (e), (f) en una dirección líder a dominio constante. La región marco de roedor es preferiblemente de rata.

Se debe apreciar sin embargo, que los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden contener CDR bastante diferentes de las que se han descrito anteriormente y que, incluso cuando éste no sea el caso, puede ser posible tener cadenas pesadas y cadenas ligeras en particular que contengan sólo una o dos de las CDR (a), (b) y (c) y (d), (e) y (f), respectivamente. No obstante, aunque la presencia de las seis CDR definidas anteriormente no se requiere necesariamente en un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, las seis CDR estarán presentes muy usualmente en los anticuerpos más preferidos.

Por consiguiente un anticuerpo particularmente preferido tiene una cadena pesada de tipo humano con las tres CDR (a), (b) y (c) que comprenden las secuencias de aminoácidos de los SEC ID No. 2, 4 y 6 o las respectivas variantes modificadas conservativamente de las mismas y una cadena ligera de rata con las tres CDR (d), (e) y (f) que comprenden las secuencias de aminoácidos de los SEC ID No. 8, 10 y 12 o las respectivas variantes modificadas conservativamente de las mismas en el que las CDR de la cadena pesada se disponen en el orden (a), (b), (c) en la dirección líder - región constante y las CDR de la cadena ligera están dispuestas en el orden (d), (e), (f) en la dirección líder - región constante.

Una forma preferida del primer aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo, particularmente aglicosilado, que tiene una afinidad de unión por el antígeno CD3 humano en el que la región constante del anticuerpo es de origen humano o derivada de una de origen humano, estando concretamente la región constante lambda unida a la región variable de la cadena ligera de rata.

Una posibilidad conveniente es que el anticuerpo tenga una región marco del dominio variable de la cadena ligera de rata correspondiente, en cuanto a la secuencia de aminoácidos, a la del híbrido YTH12.5, es decir, a la del SEC ID No. 14, aunque la región constante aún será preferiblemente de origen humano o derivado de una de las de origen humano, por ejemplo, será la región constante lambda humana. Una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y la región constante lambda quimérica de rata-humano preferida es la del SEC ID No. 18. Un ácido nucleico recombinante, por ejemplo, ADN, que codifica YTH12.5 comprende una secuencia de aminoácidos del SEC ID No. 13, mientras que el que codifica la región variable de la cadena ligera de rata y la región constante lambda humana comprende el SEC ID No. 17.

Ciertas secuencias marco del dominio variable de la cadena pesada humana serán preferibles para el injerto de las secuencias de CDR preferidas, puesto que la conformación tridimensional de las CDR se mantendrá mejor en dichas secuencias y el anticuerpo conservará un elevado nivel de afinidad de unión por el antígeno. Los marcos de la región variable (V) de la cadena pesada son preferiblemente aquellos codificados por el gen VH de tipo III humano VH26.DJ que es de la línea celular de híbrido de células B 18/2 (Huminghat, Dersimonian et al., Journal of Immunology, 139, 2496-2501 y documento WO 93/19196).

En una forma preferida del primer aspecto de la presente invención, las una o más CDR preferidas de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 de rata están por tanto presentes en un marco del dominio variable humano que tiene la siguiente lectura de la secuencia de aminoácidos en la dirección líder a región constante, indicando CDR una CDR (a), (b) o (c) como se ha definido anteriormente, una variante modificada conservativamente de la misma o una CDR alternativa:

SEC ID No. 21 / CDR / SEC No. 22 / CDR / SEC ID No. 23 / CDR / SEC No. 24

De manera similar, las una o más CDR preferidas de la cadena ligera del anticuerpo para CD3 de rata están presentes en un marco del dominio variable de roedor que tiene la siguiente lectura de la secuencia de aminoácidos en la dirección líder a región constante, indicando CDR una CDR (d), (e) y (f) como se ha definido anteriormente, una variante modificada conservativamente de la misma o una CDR alternativa:

SEC ID No. 25 / CDR / SEC ID No. 26 / CDR / SEC ID No. 27 / CDR / SEC ID No. 28.

En un anticuerpo aglicosilado que contiene las tres CDR de la cadena ligera preferidas la región variable de la cadena ligera comprende el SEC ID No. 14.

Las regiones constantes de la cadena pesada y ligera se pueden basar en anticuerpos de diferentes tipos como sujeto deseado para que el anticuerpo sea un anticuerpo IgG, pero aunque pueden ser de origen roedor o derivadas de las de los roedores, por ejemplo, rata o ratón, son preferentemente de origen humano o derivan de las de origen humano. Como se describió anteriormente, para la cadena ligera la región constante es preferiblemente del tipo lambda y para la cadena pesada es preferiblemente de un isotipo IgG, especialmente IgG1, modificada para efectuar la aglicosilación según proceda.

Un anticuerpo aglicosilado que contiene las tres CDR preferidas de la cadena pesada, la región variable de cadena pesada y CH1-bisagra-aglicosilCH2CH3 de IgG1 humana comprende el SEC ID No. 20 y está codificado por el ADN del SEC ID No. 19.

Se sabe que todas las regiones constantes humanas del isotipo IgG están glicosiladas en el residuo de asparragina en la posición 297, que forma parte del motivo de N-glicosilación Asparragina²⁹⁷ - X²⁹⁸ - Serina²⁹⁹ o Treonina²⁹⁹, donde X es el residuo de cualquier aminoácido excepto prolina. El anticuerpo de la invención por lo tanto puede ser aglicosilados por medio de la sustitución de la Asparragina²⁹⁷ de dicha región constante por otro aminoácido que no pueda ser glicosilado. Cualquier otro residuo de aminoácido puede ser utilizado potencialmente, pero la alanina es el más preferido. Alternativamente, la glicosilación de la Asparragina²⁹⁷ puede prevenirse mediante la alteración de uno de los demás residuos del motivo, por ejemplo, mediante la sustitución del residuo 298 por prolina, o el residuo 299 por cualquier otro aminoácido distinto de serina o treonina. Los mecanismos para realizar esta mutagénesis dirigida al sitio son bien conocidos por los expertos en la técnica y puede, por ejemplo, ser realizada utilizando un kit de mutagénesis dirigida al sitio tal como, por ejemplo, el disponible en el mercado de Amersham. El procedimiento se ilustra más adelante.

Es bien sabido en la técnica que la sustitución de un aminoácido en una CDR por otro aminoácido que tiene propiedades similares, por ejemplo la sustitución de un residuo de ácido glutámico por un residuo de ácido aspártico, puede no alterar sustancialmente las propiedades o la estructura del péptido o proteína en los que se realizaron una o varias sustituciones. Así, los anticuerpos aglicosilados de la presente invención incluyen aquellos anticuerpos que contienen las CDR preferidas pero con una secuencia de aminoácidos especificada en la que tal sustitución o sustituciones se han producido sin alterar sustancialmente la afinidad de unión y la especificidad de las CDR. Alternativamente, las supresiones se pueden realizar en la secuencia de residuos de aminoácido de las CDR o se pueden ampliar las secuencias en uno o ambos extremos N y C terminales, mientras conserven su actividad.

Los anticuerpos aglicosilados preferidos de acuerdo con la presente invención son tales que la constante de afinidad para el antígeno es 10^5 moles⁻¹ o más, por ejemplo hasta 10^{12} moles⁻¹. Los ligandos de diferentes afinidades pueden ser adecuados para usos diferentes de modo que, por ejemplo, una afinidad de 10^6 , 10^7 o 10^8 moles⁻¹ o más puede ser apropiada en algunos casos. Sin embargo a menudo serán adecuados anticuerpos con una afinidad en el intervalo de 10^6 a 10^8 moles⁻¹. Convenientemente, los anticuerpos tampoco presentan ninguna afinidad de unión sustancial por otros antígenos. Las afinidades de unión del anticuerpo y la especificidad del anticuerpo se pueden someter a ensayo mediante procedimientos de ensayo, tales como los descritos en la sección de Ejemplos del documento EP 0586617 (véase el Análisis de Redireccionamiento de Células Efectoras - Ejemplo 5), o mediante técnicas tales como ELISA y otros inmunoanálisis.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención son anticuerpos para CD3 IgG aglicosilados que tienen una configuración en forma de "Y" que puede tener dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas y son por consiguiente bivalentes teniendo cada sitio de unión al antígeno afinidad por el antígeno CD3. Alternativamente, la invención es también aplicable a los anticuerpos en los que sólo uno de los brazos del anticuerpo tiene afinidad de unión por el antígeno CD3. Tales anticuerpos pueden adoptar diversas formas. Así, el otro brazo del anticuerpo puede tener una afinidad de unión para un antígeno distinto de CD3 de manera que el anticuerpo es un anticuerpo

biespecífico, por ejemplo como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.474.893 y las Solicitudes de Patente Europeas Núms. 87907123.1 y 87907124.9. Alternativamente, el anticuerpo puede tener sólo un brazo que exhibe una afinidad de unión, tal anticuerpo se denomina "monovalente".

Los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos) monovalentes se pueden preparar de numerosas maneras. Glennie y Stevenson (Nature, 295, 712-713, (1982)) describen un método para preparar anticuerpos monovalentes por medio de digestión enzimática. Stevenson *et al.* describen un segundo enfoque de la preparación de anticuerpos monovalentes en el que los fragmentos Fab' y Fc producidos enzimáticamente son entrecruzados químicamente (Anticancer Drug Design, 3, 219-230 (1989)). En estos métodos los anticuerpos monovalentes resultantes han perdido uno de sus brazos del Fab'. Un tercer método de preparación de anticuerpos monovalentes se describe en la Patente Europea Núm. 131424. En este enfoque, la forma en "Y" del anticuerpo se mantiene, pero sólo uno de los dos dominios Fab' se unirá al antígeno. Esto se consigue introduciendo en el hibridoma un gen que codifica una cadena ligera irrelevante que se combinará con la cadena pesada del anticuerpo para producir una mezcla de productos en la cual el anticuerpo monovalente es el que tiene interés.

Más preferiblemente, sin embargo, los anticuerpos para CD3 aglicosilados monovalentes de la invención se preparan mediante el siguiente método. Éste implica la introducción en un sistema de expresión adecuado, por ejemplo de un sistema de células como se describe más adelante, junto con los genes que codifican las cadenas pesada y ligera, de un gen que codifica una cadena pesada truncada en la que el dominio de la región variable y el primer dominio de la región constante de la cadena pesada están ausentes, careciendo el gen del exón para cada uno de estos dominios. Esto da como resultado la producción, por el sistema de células, de una mezcla de (a) anticuerpos que son anticuerpos bivalentes completos, (b) fragmentos de anticuerpo que consisten solamente en dos cadenas pesadas truncadas (es decir, un fragmento Fc) y (c) fragmentos de anticuerpo que son monovalentes para el antígeno CD3, que constan de una cadena pesada truncada y una cadena ligera en asociación con la cadena pesada normal. Tal fragmento de anticuerpo (c) es monovalente, ya que tiene sólo un brazo Fab'. La producción de un anticuerpo monovalente en forma de dicho fragmento por medio de este método es la preferida por numerosas razones. De este modo, el fragmento de anticuerpo resultante es fácil de purificar a partir de una mezcla de anticuerpos producidos por el sistema celular, ya que, por ejemplo, puede ser separable simplemente basándose en su peso molecular. Esto no es posible en el método de la Patente Europea Núm. 131424 donde el anticuerpo monovalente producido tiene características similares a un anticuerpo bivalente en su tamaño y aspecto exterior.

Adicionalmente, la producción de un fragmento de anticuerpo monovalente por el nuevo método utiliza condiciones que pueden ser más fácilmente controladas y de este modo no tan al azar como un procedimiento de digestión enzimática/acoplamiento químico que requiere la separación de un producto de reacción complejo, con la ventaja adicional de que la línea celular utilizada continúa produciendo fragmentos de anticuerpos monovalentes, sin la necesidad de procedimientos de síntesis continua como se requiere en el procedimiento de digestión enzimática/acoplamiento químico.

Se cree que los anticuerpos aglicosilados de acuerdo con la invención no se producen en la naturaleza y estos anticuerpos aglicosilados en general pueden ser producidos sintéticamente de numerosas maneras. Muy convenientemente, sin embargo, los constructos génicos apropiados para las regiones constante y variable de las cadenas pesada y ligera que están presentes en el anticuerpo se obtienen por separado y después se insertan en un sistema de expresión adecuado.

Los genes que codifican los dominios variables de un ligando de la estructura deseada pueden ser producidos y unidos convenientemente a los genes que codifican los dominios constantes de un anticuerpo que se han sometido a mutagénesis dirigida al sitio. Estos genes constantes pueden obtenerse a partir de ADNc del hibridoma o del ADN cromosómico y han sido sometidos a mutagénesis dirigida al sitio para producir las regiones constantes aglicosiladas. Los genes que codifican las regiones variables también se pueden obtener por técnicas de síntesis de genes utilizadas en la identificación de las CDR contenidas en esta memoria. Los vehículos adecuados para la clonación del ADN pueden ser de varios tipos.

Los expertos en la técnica comprenderán que tales genes se pueden proporcionar por una variedad de métodos. Por ejemplo, es posible (i) originar una serie de hibridomas contra el antígeno CD3 de una manera conocida (ii) preparar ADN de estos hibridomas por medio de los procedimientos establecidos en los documentos WO 92/06193 y WO 93/19196 y sus correspondientes patentes de los Estados Unidos mediante la extracción de ARNm y la conversión de este en ADNc utilizando la PCR, (iii) escrutar este ADNc con sondas de oligonucleótidos correspondientes, en cuanto a la secuencia, a las secuencias de ADN complementarias de CDR, iv) secuenciar cualquier hibridoma identificado positivamente y (v) reestructurar la secuencia de rata mediante técnicas de humanización que figuran en las patentes mencionadas anteriormente. Con el fin de permitir la producción de varias y preferiblemente de las seis CDR preferidas, se puede emplear la mutagénesis dirigida al sitio para insertar el ADN deseado en los puntos correspondientes en el ADN que codifica el marco.

La expresión de estos genes a través del cultivo de un sistema de células para producir un ligando de CD3 funcional se efectúa muy convenientemente mediante la transformación de un sistema de células procariótico adecuado o particularmente eucariótico, concretamente una línea celular de mamífero inmortalizada tal como una línea celular

de mieloma, por ejemplo células de mieloma de rata YB2/3.01/Ag20 (referida en lo sucesivo como YO), células de mieloma NS0, o células de ovario de hámster Chino (aunque el uso de las células vegetales es también de interés), con vectores de expresión que incluyen ADN que codifica las regiones de anticuerpos diferentes, y a continuación el cultivo del sistema de células transformadas para producir el anticuerpo deseado. Tales mecanismos generales de uso para la fabricación de los ligandos de acuerdo con la presente invención son bien conocidos en la técnica y se describen en publicaciones tales como "Molecular Cloning" de Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 (2ª edición). Los mecanismos se ilustran adicionalmente mediante los Ejemplos contenidos en el documento WO 93/19196.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona así un procedimiento para la preparación de un anticuerpo IgG aglicosilado de acuerdo con el primer aspecto que tiene una afinidad de unión por el antígeno CD3, que comprende el cultivo de células capaces de expresar el anticuerpo con el fin de efectuar la expresión del mismo. Un tercer aspecto de la invención también proporciona una línea celular que expresa un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con la invención *per se*.

Las preferidas entre dichas líneas celulares son aquellas que comprenden secuencias de ADN que codifican las CDR preferidas descritas anteriormente. Un grupo de secuencias de nucleótidos que codifican las CDR (a) a (f) descritas anteriormente es el indicado en (a) a (f) más abajo, respectivamente, pero se apreciará que la degeneración del código genético permite realizar variaciones en estas secuencias, siempre que codifiquen las secuencias de aminoácidos de las CDR.

(a) SEC ID No. 1; (b) SEC ID No. 3; (c) SEC ID No. 5; (d) SEC ID No. 7;

(e) SEC ID No. 9; (f) SEC ID No. 11

Tales líneas celulares contendrán concretamente grandes secuencias de ADN que comprenden (1) ADN que expresa regiones marco variables de la cadena pesada humana que portan una o más de (a), (b) y (c), y (2) ADN que expresa regiones marco variables de la cadena ligera de roedor, por ejemplo, de rata que portan una o más de (d), (e) y (f).

Un ejemplo específico de dicho ADN es el SEC ID No. 19, que codifica las CDR (a), (b) y (c) dispuestas en el marco de la cadena pesada codificado por el gen de VH de tipo III humano VH26.D.J unido a CH1-bisagra-aglicosil-CH2CH3 de IgG humana como se ha comentado y la secuencia SEC ID No. 17, que codifica las CDR (d), (e) y (f) dispuestas en el marco de la cadena ligera codificado por la proteína quimérica de la región constante lambda humana YTH 12.5.

Los anticuerpos aglicosilados parcialmente humanizados quiméricos de acuerdo con la presente invención tienen valor terapéutico, en particular en la inmunosupresión, concretamente en el control del rechazo de injertos, donde es especialmente deseable que la inmunosupresión sea temporal en vez de total, y por lo tanto que las células T no sean completamente destruidas sino que en lugar de eso se conviertan en no funcionales por el bloqueo de anticuerpos del complejo antígeno CD3 - TCR. Además, los anticuerpos para CD3 aglicosilados pueden tener potencial en otras áreas tales como en el tratamiento del cáncer, específicamente en la construcción de anticuerpos biespecíficos (para el redireccionamiento de células efectoras) o productos conjugados de anticuerpo-toxina, donde la eficacia del agente terapéutico estaría comprometida por la destrucción mediada por Fc de las células efectoras o la destrucción no específica de células que portan receptores de Fc respectivamente.

En un cuarto aspecto, la presente invención incluye por consiguiente un método de tratamiento de pacientes con cáncer, particularmente linfoma, o con fines de inmunosupresión, por ejemplo, en un caso donde se puede producir el rechazo de un injerto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Los anticuerpos aglicosilados de acuerdo con el primer aspecto de la invención se pueden formular para la administración a pacientes mediante la administración de dicho anticuerpo junto con un diluyente o portador fisiológicamente aceptable. Los anticuerpos se administran preferiblemente en una forma inyectable junto con un diluyente o portador que es estéril y libre de pirógenos. A modo de orientación se puede afirmar que una dosis adecuada de anticuerpo es de aproximadamente 1-10 mg inyectados diariamente durante un período de tiempo de, por ejemplo 10 días, aunque debido a la eliminación de la respuesta a la primera dosis será posible, si se desea, administrar mayores cantidades de anticuerpo, por ejemplo, incluso hasta 100 mg al día, dependiendo de las necesidades individuales del paciente. El uso veterinario presenta una dosificación similar en g/kg.

La invención se describirá ahora a modo de ilustración solamente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, Figuras y Lista de secuencias no limitantes. A la luz de éstos, a los expertos en la técnica se les ocurrirán otras realizaciones de la invención que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones.

FIGURAS

FIGURA 1: muestra los gráficos del análisis FACS de la unión de aglicosilCD3 totalmente humanizado (de los documentos EP0586617, y US 5585097) y un anticuerpo quimérico de la presente invención en el que se emplea una región marco variable ligera de rata. La cadena ligera YTH12.5LAG1 sola no muestra una unión normal ya que no está asociada con una cadena pesada

FIGURA 2: muestra los gráficos del análisis FACS de la unión de dos transfectantes quiméricos producidos utilizando el vector pOXD52neo y que por lo tanto expresan el antígeno CD52 sobre su superficie. Estos ilustran el uso del vector pOXCD52neo como una forma de controlar si los transfectantes son una población clónica. TF 12.5L/CD3A..27 tiene un pico cuando se tiñe con CD52 demostrando que todas las células están produciendo anticuerpo para CD3, mientras que TF12.5L/CD3A.34 tiene dos picos que muestran una población negativa de células que no producen anticuerpo para CD3.

FIGURA 3: muestra los gráficos de la DO₄₉₂ frente a la dilución en un ELISA que compara la producción de IgG humana como una medida del rendimiento de anticuerpo para aglicosilCD3 quimérico presente y humanizado de la técnica anterior. Los sobrenadantes con CD3 sometidos a ensayo tres semanas después de la transfección muestran las células que contienen ADN que codifica un anticuerpo quimérico de la presente invención que produce aproximadamente 120 µg/ml y que el CD3 totalmente humanizado produce menos de 10 µg/ml.

FIGURAS 4 y 5: muestran gráficos de unión de los anticuerpos quiméricos de la presente invención y CD3 totalmente humanizado a células Jurkat para determinar la afinidad de los anticuerpos. Comenzar a partir de una concentración conocida de 100 µg/ml y diluir luego a 1/20 y siete titulaciones a 1/2560. Los patrones de tinción demuestran que las afinidades son las mismas.

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID No. 1 es la del ADN que codifica la CDR (a).

SEC ID No. 2 es la secuencia de aminoácidos de la CDR (a).

SEC ID No. 3 es la del ADN que codifica la CDR (b).

SEC ID No. 4 es la secuencia de aminoácidos de la CDR (b).

SEC ID No. 5 es la del ADN que codifica la CDR (c).

SEC ID No. 6 es la secuencia de aminoácidos de la CDR (c).

SEC ID No. 7 es la del ADN que codifica la CDR (d).

SEC ID No. 8 es la secuencia de aminoácidos de la CDR (d).

SEC ID No. 9 es la del ADN que codifica la CDR (e).

SEC ID No. 10 es la secuencia de aminoácidos de la CDR (e).

SEC ID No. 11 es la del ADN que codifica la CDR (f).

SEC ID No. 12 es la secuencia de aminoácidos de la CDR (f).

SEC ID No. 13 es la del ADN que codifica la región variable de la cadena ligera de rata.

SEC ID No. 14 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de rata.

SEC ID No. 15 es la del ADN que codifica la región variable de la cadena pesada de rata incluyendo las respectivas CDR.

SEC ID No. 16 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de rata incluyendo las respectivas CDR.

SEC ID No. 17 es la de ADN que codifica la región variable de la cadena ligera de rata con las respectivas CDR y la región constante lambda humana.

SEC ID No. 18 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de rata con CDR respectivas y la región lambda humana constante.

SEC ID No. 19 es la secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena pesada con las CDR y la CH1-bisagra-aglicosilCH₂CH₃ humana.

SEC ID No. 20 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada con las CDR y la CH1-bisagra-aglicosilCH₂CH₃ humana.

SEC ID de No. 21 a 24 son las secuencias de aminoácidos del marco del dominio variable de la cadena pesada humana sin las CDR.

- 5 SEC ID No. 25 a 28 son las secuencias de aminoácidos del marco del dominio variable de la cadena ligera de rata sin las CDR.

SEC ID No. 29 y 30 son de los cebadores utilizados para clonar la región variable de la cadena ligera de CD3 de rata en PEE12.

METODOLOGÍA GENERAL

10 Métodos generales de producción de anticuerpos monoclonales específicos de CD3 con la cadena pesada humanizada.

15 La clonación y la reestructuración del gen de la región V del anticuerpo de rata YTH 12.5 específico para el antígeno CD3 humano se realiza como describen Routledge et al., 1991, Eur. J. Immunol., 21, 2717 y en la solicitud de patente del Reino Unido Núm. 9121126.8 y sus equivalentes. YTH 12.5 es una línea celular de hibridoma de rata que secreta un anticuerpo monoclonal IgG2b específico para el complejo del antígeno CD3, pero la metodología es aplicable a otras células secretoras de anticuerpos específicos de CD3 con las mismas CDR (véase la descripción anterior).

20 En resumen, la metodología se basa en la de Orlandi et al., 1989, PNAS USA, 86, 3833, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen de V_H (gen de la región variable de la cadena pesada) se clonó usando cebadores de oligonucleótidos VH1FOR y VH1BACK. Los productos de la PCR se ligaron en el vector M13-VHPCR1 en el que se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al sitio utilizando cebadores de 6 oligonucleótidos. El gen de V_L (gen de la región variable de la cadena ligera) se clonó usando cebadores diseñados en base a las secuencias de V_L λ publicadas. El gen se clonó en el vector M13-VKPCR, junto con la región constante de la cadena ligera lambda humana. En este vector se realizó la mutagénesis del marco de V_L utilizando 5 oligonucleótidos. El gen de V_L humanizado se insertó después en el vector de expresión pHβApr-1.

25 Se generó el vector P316 en el que se podía expresar el gen de VH para CD3 reestructurado junto con diferentes genes de la región constante de la cadena H de inmunoglobulina, basándose este vector en el vector pHβ3Apr-gpt (Gunning et al., 1987, PNAS USA, 85, 7719-7723). Se insertó un fragmento de ADN de 1,65 Kb que llevaba el gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr) y las señales de expresión de SV 40 (Page & Sydenham, 1991, Biotechnology, 9, 64) en el único sitio EcoRI de pHβApr-gpt. Un fragmento de ADN HindIII-BamHI de 700 pb que codificaba el gen de VH para CD3 reestructurado se clonó después en el sitio de clonación múltiple del vector, aguas abajo y bajo el control del promotor de la actina α. El gen de la región constante de la cadena H deseado (en la configuración genómica), se pudo insertar después en el sitio de la enzima de restricción BamHI único aguas abajo del gen de VH para CD3.

35 La región constante de IgG1 humana aglicosilada se obtuvo del gen G1m de tipo salvaje (1,17) descrito por Takahashi et al., (1982, Cell, 29, 671-679) como sigue. El gen se clonó en el vector M13 tg131 donde se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al sitio (Amersham International PLC kit) para mutar el residuo de aminoácido de la posición 297 de un residuo de asparragina a un residuo de alanina.

40 El oligosacárido de la Asn-297 es un rasgo característico de todos los anticuerpos IgG humanos normales (Kabat et al., 1987, Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health Human Services Publication), teniendo cada una de las dos cadenas pesadas de las moléculas de IgG un único grupo carbohidrato de cadena ramificada que está ligado al grupo amida del residuo de asparragina (Rademacher y Dwek, 1984, Prog. Immunol., 5, 95-112). La sustitución de la asparragina por alanina impide la glicosilación del anticuerpo.

45 La región constante de IgG1 aglicosilada de 2,3 Kb se escindió de M13 mediante digestión doble utilizando BamHI y BglII y se ligó en el sitio BamHI del vector p316 para producir el clon p323.

50 Las monocapas subconfluentes de células de ovario de hámster Chino dhfr- se co-transfectaron con el vector p323 que contenía el gen de la cadena pesada y un segundo vector p274 que contenía la cadena ligera λ humana reestructurada (Routledge et al., 1991, Eur. J. Immunol., 21, 2717-2725). Antes de la transfección ambos ADN plasmídicos se linealizaron usando la endonucleasa de restricción PvuI. La transfección se llevó a cabo utilizando el reactivo DOTMA (Boehringer, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los transfectantes de cadena pesada y ligera se seleccionaron en IMDM libre de xantina/hipoxantina que contenía 5% (v/v) de suero de ternera fetal sometido a diálisis.

La producción del vector p278 con la cadena pesada para CD3 de IgG1 humana de tipo salvaje análoga se ha descrito en otra parte (Routledge et al., 1991, Eur. J. Immunol., 21, 2717-2725 y el documento GB 9121126.8). Los vectores de expresión de la cadena H que llevan los genes de la región constante de IgG2 humana no mutante (Flanagan y Rabbitts, 1982, Nature 300, 709-713), IgG3 (Huck et al., 1986, Nuc. Acid. Res., 14, 1779-1789), IgG4 (Flanagan y Rabbitts, 1982, Nature 300, 709-713), Epsilon (Flanagan y Rabbitts, 1982, EMBO. Journal 1, 655-660) y alfa-2 (Flanagan y Rabbitts, 1982, Nature 300, 709-713) (vectores p317, p318, p320, p321 y p325, respectivamente) se obtienen del vector p316. La introducción de estos vectores, junto con el vector de la cadena ligera p274, en células CHO dhfr⁻ como se ha descrito anteriormente, produjo líneas celulares que secretaban el anticuerpo para CD3 del isotipo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, ϵ y $\alpha 2$, respectivamente. Las células que expresaban anticuerpos para CD3 se sometieron a dos rondas de clonación en agar blando, y a continuación se expandieron en cultivos en botellas rodadoras. La inmunoglobulina de aproximadamente 4 litros de sobrenadante de cultivo de tejido de cada línea celular se concentró por precipitación con sulfato de amonio, se sometió a diálisis extensamente frente a PBS y después se cuantificó como sigue:

Como el anticuerpo no es puro, se utilizó un análisis de competición diseñado para cuantificar específicamente la concentración de anticuerpo con capacidad de unión al antígeno CD3. Se incubaron blastos de células T humanas con UCHT-1 marcado con FITC, un anticuerpo que se une al mismo epítipo del antígeno CD3 como panel quimérico. Se determinó previamente que la concentración de reactivo FITC utilizado fuera semi-saturante. Se tituló YTH 12.5 no marcado (purificado por HPLC) a partir de una concentración de partida conocida y se añadió a los pocillos que contenían células T y UCHT-1 FITC. El anticuerpo no marcado sirve como un competidor para el sitio de unión al antígeno. Esto se detecta como una disminución de la fluorescencia media observada cuando las células se estudian mediante análisis FACS. De este modo, la titulación de los anticuerpos quiméricos a partir de concentraciones de partida desconocidas produce una serie de curvas sigmoideas cuando se traza la fluorescencia media frente a la dilución de anticuerpo. Estas se pueden comparar directamente con la curva de YTH 12.5 patrón, se puede utilizar un anticuerpo equivalente.

EJEMPLO 1:

Preparación de un anticuerpo aglicosilado específico para el antígeno CD3 humano, que contiene las CDR correspondientes, en cuanto a la secuencia, a las del anticuerpo de rata YTH 12.5, en un marco variable de la cadena pesada humana unido a la región constante de IgG1 y el marco variable de la cadena ligera de rata unido a la región constante lambda humana.

Se seleccionó una variante por pérdida de cadena de YTH12.5LAG1 por la pérdida de la cadena ligera para CD3, que sólo expresaba la cadena pesada para CD3 de rata, y se utilizó con el propósito de transfectarla en la cadena pesada para CD3 aglicosilada totalmente humanizada. Se clonó un fragmento de ADN BamHI- HindIII de 1,4 kb que codificaba el constructo de la cadena pesada para CD3 aglicosilada de IgG1 humanizada en el sitio de clonación múltiple de dos vectores de expresión diferentes, pH β Apr-1 gpt (Gunning et al (1987) PNAS USA 84, 4831 y 85, 7719-7723) y pOXCD52neo (Frewin no publicada), que contenían diferentes marcadores seleccionables.

El vector de expresión pOXCD52neo se produjo utilizando el promotor fuerte del factor de elongación humano 1 de la cadena polipeptídica (EF1), que proporcionaba un alto nivel de la producción de anticuerpo (véase Shigekazu Nagata NAR, Vol. 18, Núm. 17, página 5322. Éste se colocó en un constructo junto con un marcador seleccionable de neomicina. También se incluyó en el vector un ADNc para el antígeno CD52 Campath expresado en la superficie, conducido por el promotor TK (todos estos promotores y marcadores son de dominio público por razón de su disponibilidad). La expresión de CD52 sobre la superficie celular permitió la identificación de transformantes utilizando anticuerpos para CD52.

Después se transfectó YTH 12.5LAG1 por separado con los dos plásmidos mediante electroporación y los transfectantes pesados se seleccionaron con IMDM que contenía 5% de suero bovino fetal, MPA y xantina para pH β Apr-1gpt e IMDM que contenía 5% de suero bovino fetal y 1 mg/ml de G418 para pOXCD52neo, a lo largo de un par de semanas hasta que las colonias vivas crecieron durante el ensayo. Ambas transfecciones produjeron clones positivos cuando se escrutó para determinar la producción de IgG1 humana utilizando ELISA. El anticuerpo para CD3 funcional se sometió a ensayo para determinar la unión a una línea de células T humana Jurkat (ATCC TIB 152 (J. Immunol 133, 123-128 (1984)) y se analizó por medio de FACS (Becton Dickinson), mostrando ambos análisis rendimientos de anticuerpo entre 30 y 50 μ g/ml.

El vector pOXCD52neo permite controlar las células transfectadas que producen anticuerpo con el uso de un marcador de la superficie celular CD52. Solo las células que contienen este marcador secretan anticuerpo de manera que tomando anticuerpos CD52 Campath unidos a FITC se pueden analizar las células transfectadas por medio de FACS para determinar el porcentaje de células productoras de anticuerpo y se puede confirmar el estado clónico. No se detectaron células productoras negativas y los rendimientos de anticuerpo permanecieron en 50 μ g/ml con un crecimiento celular normal.

Una forma quimérica del anticuerpo para CD3 aglicosilado fue producida utilizando el ensamblaje por PCR para unir la región variable de la cadena ligera para CD3 de rata con la región constante lambda humana utilizado cebadores

que introducen sitios para las enzimas de restricción Hind III y EcoRI para permitir la clonación en el vector de expresión de Celltech PEE12 (véase Bebbington et al (1992) *Biotechnology* 10, 169). Las secuencias de los cebadores son los SEC ID No. 29 y 30 de la presente lista de secuencias adjunta.

5 El constructo final se secuenció y se clonó en PEE12 que ya contenía la cadena pesada aglicosilada para CD3 humanizada y éste se transfectó en la línea celular de mieloma NS0 (ECACC Núm. 85110503 Galfre y Milstein (1981) *Enzymology* 73 (B) 3-46) por medio de electroporación. Los clones resultantes fueron escrutados para determinar la producción de anticuerpo utilizando ELISA para la IgG1 humana y la cadena ligera lambda humana y por medio de FACS para la unión a la línea celular Jurkat de clones de células T humanas. El ELISA utilizó anti-IgFc humana de cabra (Sigma 12136) como anticuerpo de captura y anti-IgG humana de oveja Biotinilada (Amersham RPN 1003) o anti-cadena ligera lambda humana de cabra biotinilada (Amersham RPN 1188) como anticuerpo detector. (Véase Routledge et al *Eur. J. Immunol* (1991) 21: 2717-2725).

10 Después de una transfección 16 clones expresaron de 60 µg/ml a 100µg/ml, mucho más que cualquier otra transfección con CD3 aglicosilado reestructurado. Estos transfectantes fueron clonados después mediante clonación por dilución limitante y algunas de ellas mejoraron hasta 120 µg/ml. Esto se mantuvo estable en un cultivo a largo plazo y una producción de anticuerpo a gran escala sin problemas con el crecimiento celular.

15 Las figuras 1 a 4 ilustran la capacidad de estos anticuerpos para unirse a CD3 con la misma capacidad que los anticuerpos anti-CD3 aglicosilados totalmente humanizados de la técnica anterior descritos previamente.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- 5 (A) NOMBRE: BTG INTERNATIONAL PLC
(B) CALLE: 10 FLEET PLACE 10, LIMEBURNER LANE
(C) CIUDAD: LONDRES
(E) PAÍS: REINO UNIDO (GB)
10 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): EC4M 7SB
(A) NOMBRE: HERMAN WALDMANN
(B) CALLE: SCHOOL OF PATOLOGY, SOUTH PARKS ROAD
(C) CIUDAD: OXFORD
(E) PAÍS: REINO UNIDO
15 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): OX1 3RE
(A) NOMBRE: MARK FREWIN
(B) CALLE: SCHOOL OG PATHOLOGY, SOUTH PARKS ROAD
(C) CIUDAD: OXFORD
(E) PAÍS: REINO UNIDO
20 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): OX1 3RE

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTICUERPOS AGLICOSILADOS

25 (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 30

(iv) FORMA LEGIBLE CON EL ORDENADOR:

- (A) TIPO MEDIO: Disco flexible
(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOPORTE LÓGICO: PatentIn Release # 1.0, versión # 1.30 (OEP)

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID No: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 15 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Rattus

45 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 1:

AGC TTT CCA ATG GCC
Ser Phe Pro Met Ala
1 5

15

50 (2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

Ser Phe Pro Met Ala
1 5

60

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 51 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 51

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 3:

ACC	ATT	AGT	ACT	AGT	GGT	GGT	AGA	ACT	TAC	TAT	CGA	GAC	TCC	GTG	AAG	48
Thr	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	
				10				15					20			

GGC																51
Gly																

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 4:

Thr	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys
1				5				10					15		
Gly															

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 5:

TTT	CGG	CAG	TAC	AGT	GGT	GGC	TTT	GAT	TAC							30
Phe	Arg	Gln	Tyr	Ser	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr							
		20					25									

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 6:

Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 39

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 7:

ACA CTC AGC TCT GGT AAC ATA GAA AAC AAC TAT GTG CAC
Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile Glu Asn Asn Tyr Val His
15 20

39

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 8:

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

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 21

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 9:

GAT GAT GAT AAG AGA CCG GAT
Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp
15 20

21

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 10:

Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS

- (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 27

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 11:

CAT TCT TAT GTT AGT AGT TTT AAT GTT
His Ser Tyr Val Ser Ser Phe Asn Val
10 15

27

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 12:

His Ser Tyr Val Ser Ser Phe Asn Val
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 333 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS

- (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 333

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 13:

CAGGCTGTTG TGACTCAGGC NAACTCTGTG TCTACGTCTC TAGGAAGCAC AGTCAAGCTG 60
TCTTGACAC TCAGCTCTGG TAACATAGAA AACAACTATG TGCACTGGTA CCAGCTATAT 120
GAGGGAAGAT CTCCCACCAC TATGATTTAT GATGATGATA AGAGACCGGA TGGTGTCCCT 180
GACAGGTTCT CTGGCTCCAT TGACAGGTCT TCCAACCTCAG CCTTCCTGAC AATCCATAAT 240
GTGGCAATTG AAGATGAAGC TATCTACTTC TGTCATTCTT ATGTTAGTAG TTTTAATGTT 300
TTCGGCGGTG GAACAAAGCT CACTGTCCTT CGA 333

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 111 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Rattus
 10 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 333
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 14:

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

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 15:
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 357 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Rattus
 25 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 357
 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 15:

CAGGTCCAAC	TGCAGGAGTC	TGGGGGCGGT	TTAGTGCAGC	CTGGAAGGTC	CATGAAACTC	60
TCCTGTGCAG	CCTCAGGATT	CACTTTCAGT	AGCTTTCCAA	TGGCCTGGGT	CCGCCAGGCT	120
CCAAAGAAGG	GTCTGGAGTG	GGTCGCAACC	ATTAGTACTA	GTGGTGGTAG	AACTTACTAT	180
CGAGACTCCG	TGAAGGGCCG	ATTCACTATC	TCCAGAGATA	ATGGGAAAAG	CATCCTATAC	240
CTGCAAATGA	ATAGTCTGAG	GTCTGAGGAC	ACGGCCACTT	ATTACTGTTC	AAGATTTCCG	300
CAGTACAGTG	GTGGCTTTGA	TTACTGGGGC	CAAGGGACCA	CGGTCACCGT	CTCCTCA	357

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 119 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 333

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 16:

```

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

```

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 648 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 648

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 17:

```

CAGGCTGTTG TGACTCAGGC NAACTCTGTG TCTACGTCTC TAGGAAGCAC ACTCAAGCTG 60
TCTTGACAC TCAGCTCTGG TAACATAGAA AACAACTATG TGCACTGGTA CCAGCTATAT 120
GAGGGAAGAT CTCCCACCAC TATGATTTAT GATGATGATA AGAGACCGGA TGGTGTCCCT 180

```

GACAGGTTCT CTGGCTCCAT TGACAGGTCT TCCAACCTCAG CCTTCCTGAC AATCCATAAT 240
 GTGGCAATTG AAGATGAAGC TATCTACTTC TGTCATTCTT ATGTTAGTAG TTTTAATGTT 300
 TTCGGCGGTG GAACAAAGCT CACTGTCCTT CGACAGCCCA AGGCTGCCCC CTCGGTCACT 360
 CTGTTCCCGC CCTCCTCTGA GGAGCTTCAA GCCAACAAGG CCACACTGGT GTGTCTCATA 420
 AGTGACTTCT ACCCGGGAGC CGTGACAGTG GCCTGGAAAG CAGATAGCAG CCCCCTCAAG 480
 GCGGGAGTGG AGACCACCAC ACCCTCCAAA CAAAGCAACA ACAAGTACGC GGCCAGCAGC 540
 TACCTGAGCC TGACGCCTGA GCAGTGGAAG TCCCACAGAA GCTACAGTTG CCAGGTCACG 600
 CATGAAGGGA GCACCGTGA GAAGACAGTG GCCCCTACAG AATGTTCA 648

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 216 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 333

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 18:

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

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1347 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: el Homo sapiens

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 1347

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 19:

GAGGTCCAAC TGCTGGAGTC TGGGGGCGGT TTAGTGCAGC CTGGAGGGTC CCTGAGACTC 60

TCCTGTGCAG CCTCAGGATT CACTTTCAGT AGCTTTCCAA TGGCCTGGGT CCGCCAGGCT 120

CCAGGGAAGG GTCTGGAGTG GGTCTCAACC ATTAGTACTA GTGGTGGTAG AACTTACTAT 180

CGAGACTCCG TGAAGGGCCG ATTCACTATC TCCAGAGATA ATAGCAAAAA TACCCTATAC 240

CTGCAAATGA ATAGTCTGAG GGCTGAGGAC ACGGCCGTCT ATTACTGTGC AAAATTTCCG 300

CAGTACAGTG GTGGCTTTGA TTACTGGGGC CAAGGGACCC TGGTCACCGT CTCCTCAGCC 360

TCCACCAAGG GCCCATCGGT CTTCCCCCTG GCACCCTCCT CCAAGAGCAC CTCTGGGGGC 420

ACAGCGGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCTGG 480

AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA 540

CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC CCAGACCTAC 600
 ATCTGCAACG TGAATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAAAGT TGAGCCCAA 660
 TCTTGTGACA AAACCTCACAC ATGCCCACCG TGCCCAGCAC CTGAACTCCT GGGGGGACCG 720
 TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG 780
 GTCACATGCG TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC 840
 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTACGCCAGC 900
 ACGTACCGGG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG 960
 TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC CCAGCCCCCA TCGAGAAAC CATCTCCAA 1020
 GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG 1080
 ACCAAGAACC AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCCAG CGACATCGCC 1140
 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC TCCCGTGCTG 1200
 GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG 1260
 CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG 1320
 AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC GGGTAAA 1347

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 20:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 449 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Rattus
- 15 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 333

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 20:

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 384 319 T3

1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Ser Phe
	20	25	30
Pro Met Ala	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val
	35	40	45
Ser Thr Ile	Ser Thr Ser Gly Gly	Arg Thr Tyr Tyr	Arg Asp Ser Val
	50	55	60
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg	Asp Asn Ser Lys	Asn Thr Leu Tyr
	65	70	75
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala	Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr Cys
	85	90	95
Ala Lys Phe	Arg Gln Tyr Ser Gly	Gly Phe Asp Tyr	Trp Gly Gln Gly
	100	105	110
Thr Leu Val	Thr Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly	Pro Ser Val Phe
	115	120	125
Pro Leu Ala	Pro Ser Ser Lys Ser	Thr Ser Gly Gly	Thr Ala Ala Leu
	130	135	140
Gly Cys Leu	Val Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val	Thr Val Ser Trp
	145	150	155
Asn Ser Gly	Ala Leu Thr Ser Gly	Val His Thr Phe	Pro Ala Val Leu
	165	170	175
Gln Ser Ser	Gly Leu Tyr Ser Leu	Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser
	180	185	190
Ser Ser Leu	Gly Thr Gln Thr Tyr	Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro
	195	200	205
Ser Asn Thr	Lys Val Asp Lys Lys	Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys
	210	215	220
Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu Leu	Leu Gly Gly Pro
	225	230	235
Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser
	245	250	255
Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys Val	Val Val Asp Val	Ser His Glu Asp
	260	265	270
Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn
	275	280	285
Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu	Gln Tyr Ala Ser	Thr Tyr Arg Val
	290	295	300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: el Homo sapiens

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: Región
(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 21:

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: el Homo sapiens

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: Región
(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 14

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 22:

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: el Homo sapiens

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: Región
(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 32

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 23:

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: el Homo sapiens

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: Región
(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 11

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 24:

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: Región
(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 22

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 25:

Gln Ala Val Val Thr Gln Ala Asn Ser Val Ser Thr Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15
Thr Val Lys Leu Ser Cys
20

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 26:

Trp Tyr Gln Leu Tyr Glu Gly Arg Ser Pro Thr Thr Met Ile Tyr
1 5 10 15

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 34

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 27:

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser
1 5 10 15

Ala Phe Leu Thr Ile His Asn Val Ala Ile Glu Asp Glu Ala Ile Tyr
20 25 30

Phe Cys

(2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Rattus

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: Región
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 11
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 28:

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg
 1 5 10

5

- (2) INFORMACION PARA EL SEC ID NO: 29:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
 (A) DESCRIPCIÓN: / desc = "sintética"

15

- (iii) HIPOTETICO: Sí
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE / CLAVE: característica_misc
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 36

20

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 29:

GACTACAAGC TTACACAGGA CCTCACCATG CGATGG 36

- (2) INFORMACIÓN PARA EL SEC ID NO: 30:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
 (A) DESCRIPCIÓN: / desc = "sintética"

30

- (iii) HIPOTETICO: Sí
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (ix) CARACTERÍSTICA:
 (A) NOMBRE / CLAVE: característica_misc
 (B) LOCALIZACIÓN: 1 .. 36

35

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 30:

GATGCTGAAT TCTGCAGCTC TAGTCTCCCG TGGTGG 36

40

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo IgG que tiene una afinidad de unión por el complejo antigénico CD3 humano y que tiene una región constante de la cadena pesada aglicosilada de tipo IgG humana y una región constante de la cadena ligera de tipo lambda humana

5 en cuyo anticuerpo la cadena pesada tiene un marco de la región variable junto con CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEC ID No. 2, 4 y 6 ó las respectivas variantes modificadas conservativamente de las mismas y la cadena ligera tiene un marco de la región variable junto con CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEC ID No. 8, 10 y 12 o las respectivas variantes modificadas conservativamente de las mismas

10 caracterizado por que el marco de la región variable de la cadena pesada corresponde en secuencia a la secuencia de tipo humano y el marco de la región variable de la cadena ligera corresponde en secuencia a un marco de la región variable de la cadena ligera de rata o deriva de un marco de rata en el que se realizan una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Gln-1 a Asp-1; Ala-2 a Phe-2; Val-3 a Met-3; Val-4 a Leu-4; Ala-7 a Pro-7; Asn-8 a His-8; Thr-12 a Glu-12; Leu-14 a Pro-14; Ser-16 a Lys-16; Lys-19 a Ile-19; Leu-20 a Ile-20; Leu-39 a Gln-39; Tyr-40 a Arg-40; Glu-41 a Pro-41; Ser-44 a Ala-44; Met-48 a Val-48; Tyr-50 a Phe-50; Phe-75 a Ser-75, His-79 a Ser-79; Asn-80 a Gly-80; Val-81 a Leu-81; Ala-82 a Gln-82; Ile-83 a Thr-83; Ile-88 a Asp-88 y Phe-90 a Tyr-90

15 por medio de lo cual la región variable de la cadena ligera incluye suficientes aminoácidos específicos para la secuencia de tipo rata de manera que las cadenas ligeras y pesadas se asocian más fuertemente que cuando la región variable de cadena ligera es del correspondiente tipo totalmente humano.

20 2. Un anticuerpo como se reivindica en la Reivindicación 1, caracterizado por que se proporciona la aglicosilación por tener una región constante de tipo humano con el motivo de N-glicosilación, Asparragina-X-serina o Asparragina-X-treonina, que tiene el residuo de asparragina sustituido por un aminoácido, distinto de prolina, que no puede estar glicosilado, o uno de los otros residuos del motivo alterado para impedir la glicosilación de la asparragina.

25 3. Un anticuerpo como se reivindica en las Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, caracterizado por que la región variable de la cadena ligera se corresponde enteramente con la secuencia de rata.

4. Un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las regiones marco humanas comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEC ID No. 21, 22, 23 y/o 24.

30 5. Un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las CDR de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 de rata están presentes en un marco del dominio variable humano que tiene la lectura de la secuencia de aminoácidos en la dirección líder a región constante que comprende SEC ID No. 21 / CDR / SEC ID No. 22 / CDR / SEC ID No. 23 / CDR / SEC ID No. 24.

35 6. Un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende una región marco del dominio variable de la cadena ligera de la SEC ID No. 14.

7. Un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende una cadena ligera quimérica de rata-humano y una secuencia de aminoácidos de la región constante lambda de la SEC ID No. 18.

40 8. Un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la región constante de la cadena pesada es de un isotipo IgG1.

9. Un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el residuo de asparragina de la posición 297 de la región constante de la cadena pesada es sustituido por un residuo de aminoácido alternativo.

45 10. Un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con la Reivindicación 9, en el que el residuo de asparragina es sustituido por un residuo de alanina.

11. Un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que solo uno de los brazos del mismo tiene afinidad por el antígeno CD3.

12. Un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con la Reivindicación 11, que es monovalente.

50 13. Un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con la Reivindicación 12, en el que la mitad del anticuerpo consiste en una cadena pesada y una cadena ligera completas y la otra mitad consiste en una cadena pesada similar pero troncada que carece del dominio de la región variable y el primer dominio de la región constante.

14. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un diluyente o portador fisiológicamente aceptable.

15. Un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13, para su uso en terapia.

5 16. Un anticuerpo aglicosilado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13, para su uso en la inmunosupresión o el tratamiento del cáncer.

17. Un ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 13.

10 18. Un ácido nucleico recombinante como se reivindica en la Reivindicación 17, caracterizado por que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID No. 13.

19. Un ácido nucleico recombinante como se reivindica en la Reivindicación 17 o 18, caracterizado por que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID No. 17.

20. Un ácido nucleico recombinante como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 19, caracterizado por que codifica un péptido de la secuencia aminoácidos del SEC ID No. 20.

15 21. Un ácido nucleico recombinante como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 20, caracterizado por que codifica una lectura de la secuencia de aminoácidos en la dirección líder a región constante SEC ID No. 25 / CDR / SEC ID No. 26/ CDR / SEC ID No. 27 / CDR / SEC ID No. 28.

22. Un ácido nucleico recombinante como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 21, caracterizado por que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEC ID No. 14.

20 23. Un ácido nucleico recombinante como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 22, caracterizado por que es ADN.

24. Un sistema de expresión de proteínas caracterizado por que comprende un ácido nucleico recombinante como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 23.

25 25. Un sistema como se reivindica en la Reivindicación 24, caracterizado por que comprende un vector que incorpora el ácido nucleico reivindicado en una cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 23.

26. Un sistema como se reivindica en la Reivindicación 24 o 25, caracterizado por que comprende constructos separados de ácido nucleico recombinante que codifican las cadenas pesada y ligera, respectivamente.

27. Un sistema como se reivindica en la Reivindicación 26, donde los constructos codifican cadenas con regiones constantes.

30 28. Una célula procariótica o eucariótica que expresa un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13.

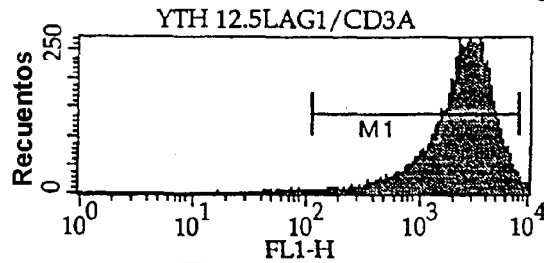
29. Una célula como se reivindica en la Reivindicación 28, caracterizada por que comprende un ácido nucleico como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 23.

35 30. Una célula como se reivindica en la Reivindicación 28 o 29, caracterizada por que es una célula de mamífero inmortalizada.

31. Un procedimiento para producir un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que comprende cultivar una célula como se reivindica en una cualquiera de las Reivindicaciones 28 a 30.

40

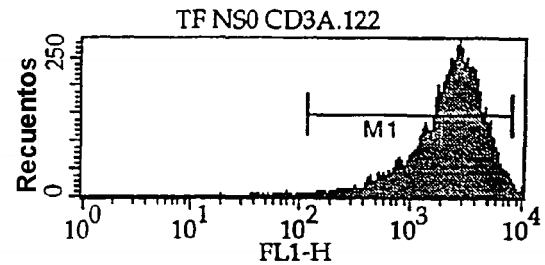
Fig.1.



Archivo: YTH 12.5LAG1/CD3A

Marcador Izquierda, Derecha % Selecc. Mediana

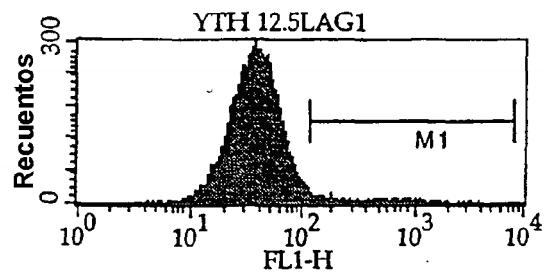
All	1, 9647	100,00	2458,24
M1	111, 7774	98,60	2458,24



Archivo: TF NS0 CD3A.122

Marcador Izquierda, Derecha % Selecc. Mediana

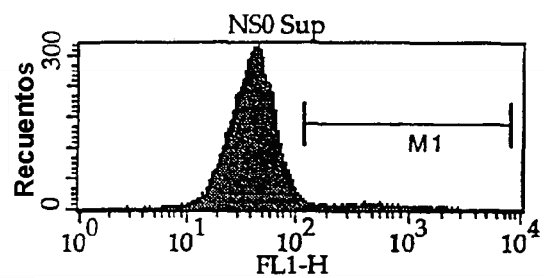
All	1, 9647	100,00	2287,57
M1	111, 7774	98,78	2287,57



Archivo: YTH 12.5LAG1

Marcador Izquierda, Derecha % Selecc. Mediana

All	1, 9647	100,00	37,86
M1	111, 7774	4,66	259,46



Archivo: NS0 Sup

Marcador Izquierda, Derecha % Selecc. Mediana

All	1, 9647	100,00	39,24
M1	111, 7774	3,68	378,55

YTH 12.5LAG1/CD3A.27 = cadena ligera anti-CD3 humano de rata + cadena pesada para CD3A humanizada

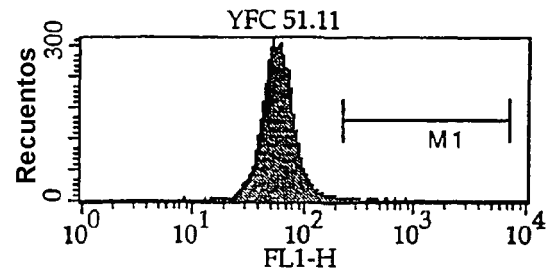
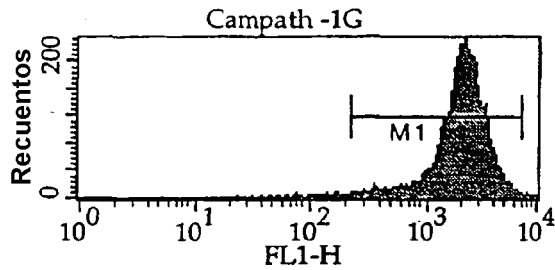
TF NS0 CD3A.122 = **CD3A humanizado**

YTH 12.5LAG1 = cadena ligera anti-CD3 humano solamente

NS0 = **línea de transfección para CD3 humanizado**

Fig.2.

TF 12.5L/CD3A.27



Archivo: Campath - 1G

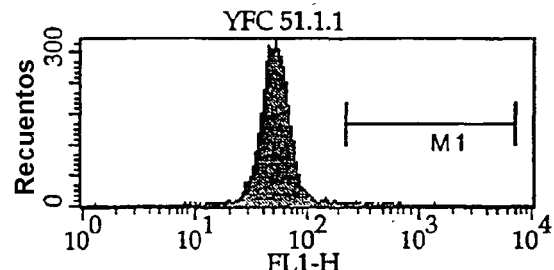
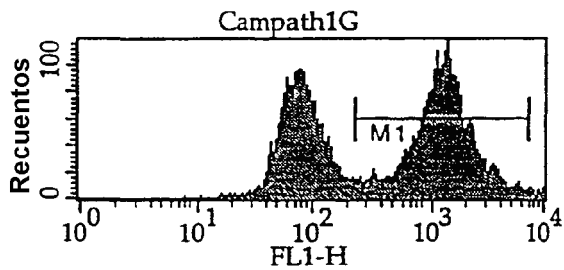
Archivo: YFC 51.11

Marcador	Izquierda	Derecha	% Selecc.	Mediana
All	1,9647	100,00		1980,96
M1	221,6978	98,56		1980,96

Marcador	Izquierda	Derecha	% Selecc.	Mediana
All	1,9647	100,00		56,23
M1	221,6978	0,56		299,61

Recuentos

TF 12.5L/CD3A.34



Archivo: Campath 1G

Archivo: YFC 51.1.1

Marcador	Izquierda	Derecha	% Selecc.	Mediana
All	1,9647	100,00		673,17
M1	221,6978	58,70		1197,09

Marcador	Izquierda	Derecha	% Selecc.	Mediana
All	1,9647	100,00		50,48
M1	221,6978	0,73		339,82

Campath-1G = IgG2b anti-CD52 humano de rata

YFC 51.1.1 = Control isotipo IgG2b anti-CD18 humano de rata

Fig.3.

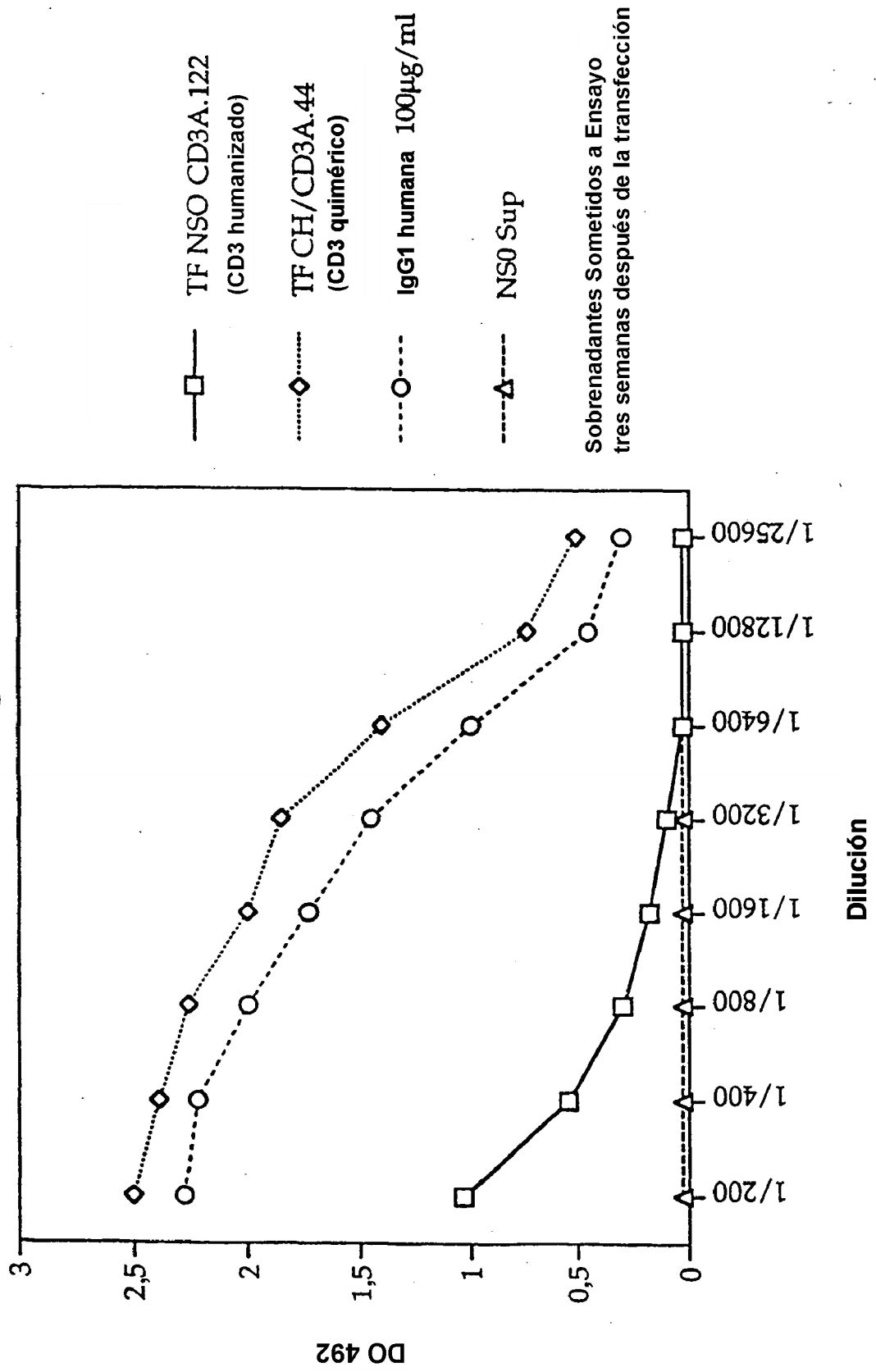
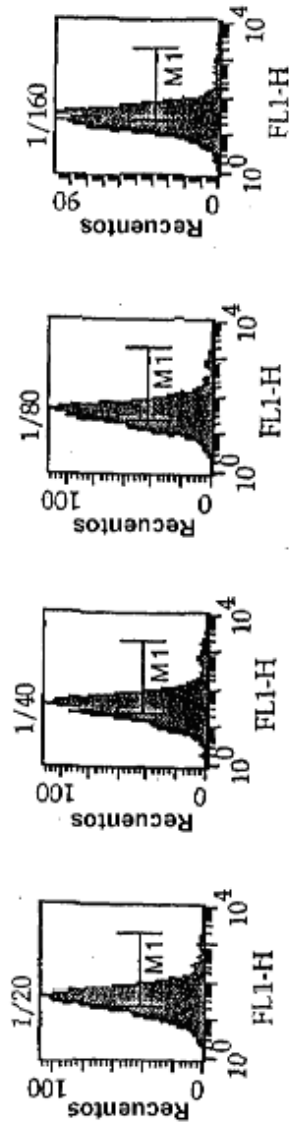


Fig.4.

TF NSO CD3A.122
(100µg/ml)

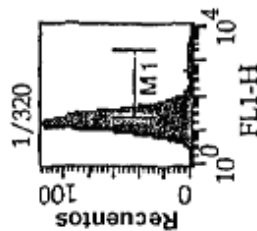


% Selecc.	Mediana
100,00	32,78
70,22	42,17

% Selecc.	Mediana
100,00	33,98
70,75	43,71

% Selecc.	Mediana
100,00	32,78
71,31	42,17

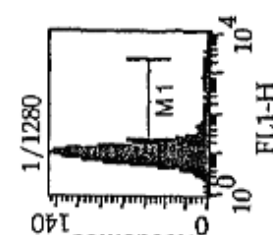
% Selecc.	Mediana
100,00	25,48
56,30	37,86



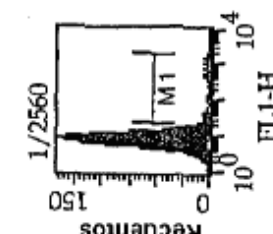
% Selecc.	Mediana
100,00	17,15
32,86	31,62



% Selecc.	Mediana
100,00	13,82
19,14	29,43

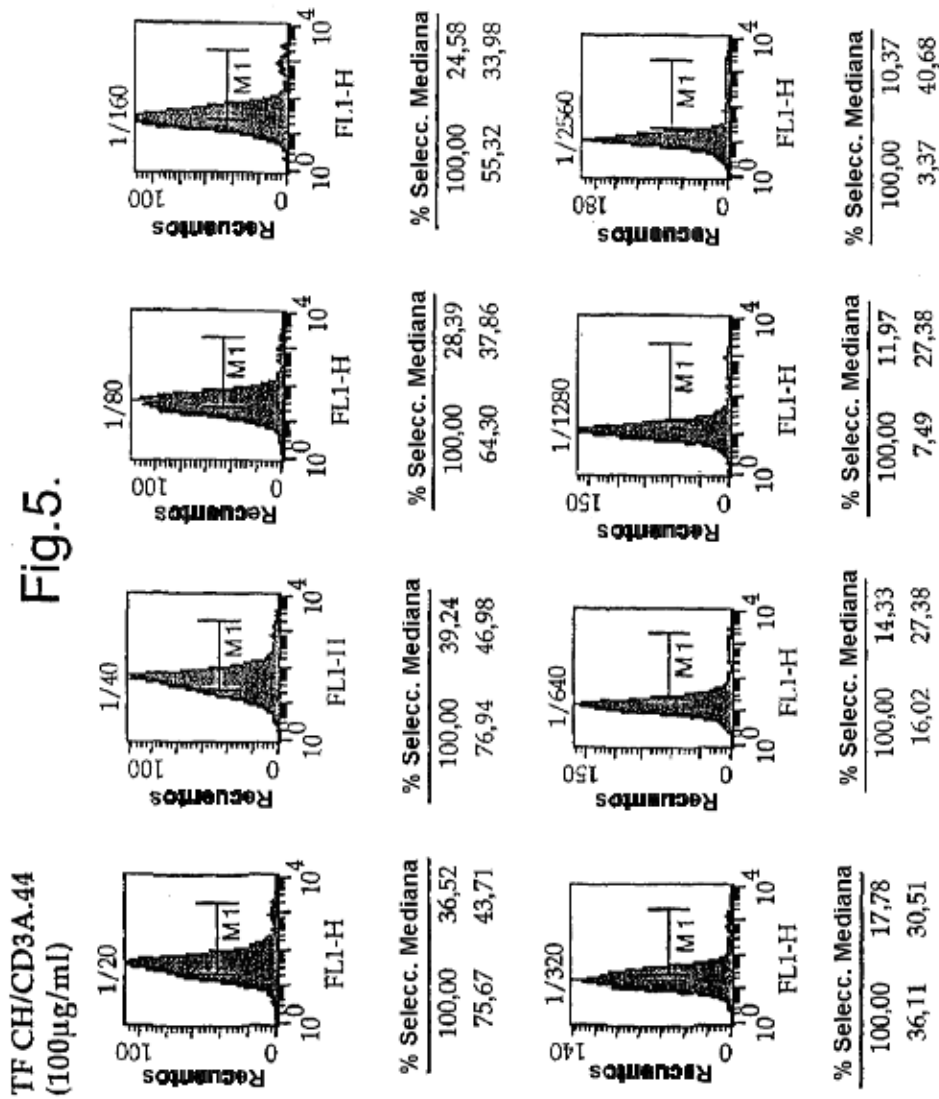


% Selecc.	Mediana
100,00	10,00
5,37	31,62



% Selecc.	Mediana
100,00	8,06
2,13	46,98

TF NSO CD3A.122 = CD3 humanizado



TF CH/CD3A.44 = cadena pesada para CD3A humanizada con CD3 VL +
Cadena ligera Lambda humana