

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 312**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05785180 .0**
96 Fecha de presentación: **22.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1810979**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **Anticuerpos IgG4 humanos estabilizados**

30 Prioridad:
22.09.2004 JP 2004275908

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2012

73 Titular/es:
KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.
1-6-1, OHTEMACHI, CHIYODA-KU
TOKYO, JP

72 Inventor/es:
TAKAHASHI, Nobuaki y
YOSHIDA, Hideaki

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 387 312 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 IgG4 humanos estabilizados.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un mutante IgG4 que tiene propiedades físicas mejoradas, que se obtiene introduciendo la mutación en una región constante de IgG4 humana.

10 **Antecedentes de la técnica**

Las inmunoglobulinas son glucoproteínas que existen en el suero y el tejido/fluido corporal de todos los mamíferos. Las inmunoglobulinas tienen una función de reconocimiento de antígenos extraños. Las inmunoglobulinas están implicadas en la defensa biológica mediante la activación de sus funciones efectoras. Las funciones efectoras implican la activación del sistema del complemento, que es inducida por el enlace antígeno-anticuerpo, y los efectos de activación de la fagocitosis celular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la liberación de mediadores, y receptores de Fc (FcR) para la presentación de antígenos que existen en la superficie celular.

Existen 5 clases diferentes de inmunoglobulinas humanas, a saber, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La IgG se puede clasificar en las 4 subclases de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Además, IgA se puede clasificar en los 2 subclases de IgA1 y IgA2. La estructura básica de la inmunoglobulina se compone de 2 cadenas L homólogas (cadenas ligeras) y 2 cadenas H homólogas (cadenas pesadas). La clase y la subclase de inmunoglobulina están determinadas por las cadenas H.

Diferentes inmunoglobulinas se sabe que tienen diferentes funciones. Por ejemplo, el nivel de capacidad de unión al complemento se clasifica en el orden siguiente: IgM> IgG3> IgG1> IgG2. Además, el nivel de afinidad a FcγRI (receptor Fc I) se clasifica en el siguiente orden: IgG3> IgG1> IgG4> IgG2. Además, IgG1, IgG2 e IgG4 pueden unirse a la proteína A.

Los anticuerpos humanos que se han recogido y purificado a partir de sangre se utilizan como agentes farmacéuticos. En los últimos años, muchos anticuerpos monoclonales han sido sometidos a pruebas clínicas. Además, muchos de dichos anticuerpos se han colocado en el mercado. Sin embargo, la mayoría de los anticuerpos monoclonales utilizados como agentes farmacéuticos que se han colocado en el mercado o desarrollado clínicamente proceden de la IgG1. Muy pocos de dichos anticuerpos proceden de la IgG4. Se ha sabido que la IgG4 se caracteriza por tener niveles de activación del complemento más bajos y de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo que IgG1. Por lo tanto, se considera que los productos derivados de IgG4 son apropiados para su utilización como agentes farmacéuticos que tienen dichas características. En la activación de la función efectora de un anticuerpo que se une a un antígeno, una célula que expresa el antígeno se daña por medio de un sistema de complemento u otra célula. En un caso en el que dicho antígeno es un antígeno específico del cáncer o similar, la función de daño celular es muy importante en términos de propiedades medicinales. Sin embargo, en los casos de algunos antígenos, dicha función podría causar efectos desfavorables. Un ejemplo de dicho antígeno es CD40. El gen CD40 desempeña una función importante en el control inmunológico. Los anticuerpos anti-CD40 que inhiben la unión entre un ligando CD40 y CD40 se considera que tienen un alto potencial como agentes farmacéuticos. Sin embargo, la expresión de CD40 se encuentra en varios otros tipos de células, además de inmunocitos. Por lo tanto, si la función efectora de dicho anticuerpo causa daño a una célula que expresa CD40, hay una posibilidad de que podrían producirse graves efectos desfavorables. Por lo tanto, se considera que IgG4 es un anticuerpo preferente contra dichos antígenos mencionados.

Mientras tanto, a fin de producir IgG4 que actúa como agente farmacéutico, deben considerarse ciertos problemas. Dichos problemas implican la existencia de un medio anticuerpo IgG4 que no tiene enlace SS entre sus cadenas H *in vivo*. (Un anticuerpo comprende generalmente 2 cadenas L y 2 cadenas; sin embargo, una mitad de anticuerpo comprende una sola cadena L y una sola cadena H.) Además, es problemática la producción de una mitad de anticuerpo en un caso en el que IgG4 se expresa en células animales tales como CHO para la producción de un agente farmacéutico. Dicha formación de medio anticuerpo es un problema serio que es una causa para asuntos en relación con la producción de agentes farmacéuticos. Sin embargo, se ha publicado que la formación de la mitad de anticuerpo puede inhibirse introduciendo una sustitución de un solo aminoácido en una región constante (véase el documento 1 no de patente). Aalberse *et al.*, *Immunology*, 2002, 105(1):9-19 informan de que la base estructural para la monovalencia funcional de IgG4 se debe en gran medida a un cambio de un solo aminoácido con respecto a la IgG1 humana en la bisagra del núcleo. Además, aunque se sabe que IgG4 tiene un menor nivel de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en comparación con IgG1, IgG4 tiene capacidad de unión de FcR, aunque a un nivel débil. Sin embargo, dicha capacidad de unión de FcR puede atenuarse más introduciendo una mutación en una región de la bisagra de IgG4 para mejorar la IgG4 (véase los documentos de patente 1 a 3).

De acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, se hace posible producir IgG4 casi ideal. Sin embargo, por lo que se refiere a la producción de un agente farmacéutico que comprende IgG4, existen todavía problemas que deben superarse. Dichos problemas implican la inestabilidad de los anticuerpos IgG4 a pH bajo. En general, se

utiliza un procedimiento de purificación por afinidad con la utilización de proteína A para producir anticuerpos como agentes farmacéuticos. En tal caso, un tampón de pH bajo se utiliza a menudo para la elución de anticuerpos que unen cada uno a la proteína A. Además, para eliminar los virus, se desea que los anticuerpos se traten a pH bajo durante un cierto período. Sin embargo, como se muestra en la presente invención, se ha conocido que anticuerpos IgG4 son propensos a formar un conglomerado, ya que tienen una mala estabilidad a pH bajo en comparación con los anticuerpos IgG 1. Se ha publicado que la incorporación de un conglomerado en un agente farmacéutico produce la activación de reacciones de infusión, la activación del complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Por lo tanto, es fácil suponer que dichas reacciones y similares dan lugar a efectos desfavorables. Por consiguiente, es muy importante reducir la cantidad de conglomerados lo menos posible.

[Documento 1 de patente] Patente JP nº 3101690

[Documento 2 de patente] US nº 5.648.260

[Documento 3 de patente] US nº 5.624.821

[Documento 1 no de patente] S. Angal *et al.*, Molecular Immunology, 1993, 30, 105-108

Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en producir un mutante muy estabilizado de anticuerpo IgG4 humano.

Como resultado de estudios exhaustivos, se ha conseguido producir un mutante de IgG4 humana en el que se mantiene la actividad de anticuerpos y las propiedades físicas se mejoran en comparación con la conocida IgG4 humana. Esto ha conducido a la realización de la presente invención. La idea básica de la modificación de la IgG4 humana en la presente invención se describirá a continuación con detalle.

En la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, al menos un dominio CH3 está sustituido por un dominio CH3 de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana. Alternativamente, en la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, al menos los dominios CH2 y CH3 están sustituidos por dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana, respectivamente. Por lo tanto, la estabilidad del anticuerpo puede mejorarse. Además, la arginina (R) en la posición 409 de la IgG4 humana está sustituida por lisina (K), treonina (T), metionina (M), o leucina (L) (por ejemplo, la sustitución de arginina (R) en la posición 409 con lisina (K), en adelante denominada "R409K" en algunos casos) de tal manera que puede mejorarse la estabilidad del anticuerpo. (Cada letra del alfabeto representa un aminoácido correspondiente y cada número es un número según el índice de EU propuesto por Kabat *et al.* (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 quinta edición)).

Además, si es posible sustituir D270, K322, P329 o P331 con A o convertir P331 en S o G, la actividad de CDC puede reducirse.

Asimismo, si es posible sustituir L235 por E y G237 con A, la actividad de ADCC puede reducirse.

Además, la presente invención comprende una proteína de fusión que comprende una parte que contiene al menos un dominio CH3 que existe en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana en la que al menos arginina (R) en la posición 409, que se indica en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituido con lisina (K), treonina (T), metionina (M), o leucina (L). Preferentemente, dicha parte comprende además una región bisagra y un dominio CH2.

Específicamente, la presente invención se describe a continuación.

[1] Un anticuerpo IgG4 humano, en el que la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada de IgG4, que se indican en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidos por prolina y ácido glutámico, respectivamente, y arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituido con lisina, treonina, metionina o leucina.

[2] Anticuerpo según el apartado [1], en el que el anticuerpo tiene regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo producido por el hibridoma 4D11 (nº de registro: FERM BP-7758).

[3] Anticuerpo según el apartado [1], en el que el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada mostrada por la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 2 y una región variable de la cadena ligera mostrada por la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 4.

[4] Anticuerpo según el apartado [1], en el que el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 1 y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 3.

- [5] Anticuerpo según el apartado [1], en el que la cadena pesada de IgG4 humana tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 44, y la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 46.
- 5 [6] Anticuerpo según el apartado [1], en el que la cadena pesada de IgG4 humana es una cadena pesada codificada por la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 43, y la cadena ligera es una cadena ligera codificada por la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 45.
- 10 [7] Anticuerpo según el apartado [1] ó [2], que es un anticuerpo anti-CD40.
- [8] Procedimiento *in vitro* para producir un anticuerpo IgG4 humano, que comprende las etapas siguientes:
- 15 sustitución de serina en la posición 228 y leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada de IgG4, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, por prolina y ácido glutámico, respectivamente, y sustitución de arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que está indicada en el índice EU como en Kabat *et al.*, por lisina, treonina, metionina o leucina.
- 20 [9] Procedimiento *in vitro* para inhibir el conglomerado de anticuerpos de un anticuerpo IgG4 humano, en el que la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada de IgG4, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por prolina y ácido glutámico, respectivamente, y la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que está indicada en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina.
- 25 [10] Procedimiento *in vitro* para producir un anticuerpo IgG4 humano, que comprende las etapas siguientes:
- 30 producción de un vector de expresión que tiene genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;
- introducción del vector de expresión en un hospedador;
- 35 cultivo del hospedador; y
- obtención del anticuerpo del producto de cultivo.
- [11] Procedimiento *in vitro* para producir un anticuerpo IgG4 humano, que comprende las etapas siguientes:
- 40 producción de un vector de expresión que tiene una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 47 y una secuencia de ácido nucleico representada por la SEC ID nº 45;
- introducción del vector de expresión en un hospedador;
- 45 cultivo del hospedador; y
- obtención el anticuerpo del producto de cultivo.
- [12] Composición farmacéutica que comprende, como principio activo, el anticuerpo según cualquiera de los apartados [3] a [7].
- 50 [13] Agente terapéutico para el tratamiento del rechazo del trasplante, enfermedades autoinmunitarias, cáncer, arteriosclerosis, nefritis, enfermedad de Alzheimer, o amiloidosis, que comprende, como principio activo, el anticuerpo según cualquiera de los apartados [2] a [7].
- 55

Específicamente, en la presente memoria se da a conocer:

- [1] Un anticuerpo, en el que por lo menos la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que está indicada en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina, y además varios aminoácidos se eliminan de, se someten a sustitución en, se insertan en o se añaden a dicha región constante de la cadena pesada.
- 60
- [2] Anticuerpo según el apartado [1], en el que la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por prolina y ácido glutámico, respectivamente.
- 65

- 5 [3] Anticuerpo según el apartado [1], en el que el anticuerpo tiene regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo producido por el hibridoma 4D11 (nº de registro: FERM BP-7758), la zona variable de la cadena pesada y la zona variable de la cadena ligera están unidas a la zona constante de la cadena pesada y a la zona constante de la cadena ligera de la IgG4 humana, respectivamente, de manera que se forman una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo y la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por prolina y ácido glutámico, respectivamente.
- 10 [4] Anticuerpo según el apartado [1], en el que una región variable mostrada por la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 2 y una región variable mostrada por la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 4 están unidas a la zona constante de la cadena pesada de la IgG4 humana y a la zona constante de la cadena ligera de la IgG4 humana, respectivamente, de tal manera que se forman una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo y la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por prolina y ácido glutámico, respectivamente.
- 15 [5] Anticuerpo según el apartado [1], en el que una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 1 y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 3 están unidas a la zona constante de la cadena pesada de la IgG4 humana y a la zona constante de la cadena ligera de la IgG4 humana, respectivamente, de tal manera que se forman una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo y la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por prolina y ácido glutámico, respectivamente.
- 20 [6] Anticuerpo según el apartado [1], en el que el anticuerpo tiene una cadena pesada mostrada por la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 44, en la que la serina en la posición 228, la leucina en la posición 235 y la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por prolina, ácido glutámico, y lisina, treonina, metionina o leucina, respectivamente, y la cadena ligera mostrada por la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 46.
- 25 [7] Anticuerpo según el apartado [1], en el que el anticuerpo tiene una cadena pesada codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por la SEC ID nº 43, en la que la serina en la posición 228, la leucina en la posición 235 y la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por prolina, ácido glutámico, y lisina, treonina, metionina o leucina, respectivamente, y la cadena ligera codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por la SEC ID nº 45.
- 30 [8] Anticuerpo según el apartado [1] ó [2], que es un anticuerpo anti-CD40.
- 35 [9] Procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende las etapas de sustitución de arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que está indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, por lisina, treonina, metionina o leucina.
- 40 [10] Procedimiento para inhibir el conglomerado de anticuerpos, en el que la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que está indicada en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina.
- 45 [11] Procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende las etapas siguientes:
- 50 producción de un vector de expresión que tiene genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo según cualquiera de los apartados [1] a [7];
- 55 introducción del vector de expresión en un hospedador;
- cultivo del hospedador; y
- 60 obtención del anticuerpo del producto de cultivo.
- [12] Procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende las etapas siguientes:
- 65 producción de un vector de expresión que tiene una región variable de la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 1 y una región variable de la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 3;

introducción del vector de expresión en un hospedador;

cultivo del hospedador; y

obtención el anticuerpo del producto de cultivo.

[13] Procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende las etapas siguientes:

producción de un vector de expresión que tiene una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 47 y una secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 45;

introducción del vector de expresión en un hospedador;

cultivo del hospedador; y

obtención el anticuerpo del producto de cultivo.

[14] Composición farmacéutica que comprende, como principio activo, el anticuerpo según cualquiera de los apartados [3] a [7].

[15] Agente terapéutico para el tratamiento del rechazo del trasplante, enfermedades autoinmunitarias, cáncer, arteriosclerosis, nefritis, enfermedad de Alzheimer, o amiloidosis, que comprende, como principio activo, el anticuerpo según cualquiera de los apartados [3] a [7].

Esta descripción incluye parte o la totalidad de los contenidos, como se da a conocer en la descripción de la solicitud de patente japonesa nº 2004-275908, que es un documento prioritario de la presente solicitud.

Efectos de la Invención

El anticuerpo de la presente invención, en el que la arginina (R) en la posición 409 de la IgG4 humana está sustituida por lisina (K), treonina (T), metionina (M), o leucina (L), se caracteriza porque se mantiene la capacidad de unión al antígeno y se inhibe la formación de conglomerados, particularmente la formación de conglomerados a pH bajo. Así, es posible producir de manera estable el anticuerpo de la presente invención como un agente farmacéutico. Además, cuando dicho anticuerpo se administra a un paciente de la prueba, se hace posible evitar fácilmente los efectos desfavorables que se producen por la incorporación de un conglomerado de anticuerpos. De este modo, es posible utilizar con seguridad dichos anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra resultados referidos a la actividad de unión, lo que indica que los cambios en una estructura primaria de la región constante no producen ningún cambio en la capacidad de unión al anticuerpo.

La figura 1B muestra resultados referidos a la actividad de unión, lo que indica que los cambios en una estructura primaria de la región constante no producen ningún cambio en la capacidad de unión al anticuerpo.

La figura 1C muestra resultados referidos a la actividad de unión, lo que indica que los cambios en una estructura primaria de la región constante no producen ningún cambio en la capacidad de unión a anticuerpo.

La figura 2A muestra resultados referidos a la actividad antagonista (ensayo celular de Ramos), lo que indica que los cambios en una estructura primaria de la región constante no producen ningún cambio en la actividad antagonista del anticuerpo anti-CD40.

La figura 2B muestra resultados referidos a la actividad antagonista (ensayo celular de Ramos), lo que indica que los cambios en una estructura primaria de la región constante no producen ningún cambio en la actividad antagonista del anticuerpo anti-CD40.

La figura 2C muestra resultados referidos a la actividad antagonista (ensayo celular de Ramos), lo que indica que los cambios en una estructura primaria de la región constante no producen ningún cambio en la actividad antagonista de anticuerpo anti-CD40.

La figura 2D muestra resultados referidos a la actividad antagonista (ensayo celular de Ramos), lo que indica que los cambios en una estructura primaria de la región constante no producen ningún cambio en la actividad antagonista de anticuerpo anti-CD40.

Mejor modo de poner en práctica la invención

1. Una cadena H comprende dos regiones, que son una región variable implicada en la determinación de la especificidad de unión del antígeno y una región constante implicada en la expresión de las funciones efectoras de un anticuerpo. En una región variable, la estructura de la secuencia de un punto de unión al antígeno varía como resultado de la recombinación génica que tiene lugar en la región y la introducción de la mutación de células somáticas. Dicha variación contribuye a la obtención de una propiedad por la que numerosos antígenos extraños pueden reconocerse.

Además, los anticuerpos son esencialmente moléculas que funcionan para proteger los cuerpos vivos contra el cáncer y las células extrañas de microorganismos y virus, y por lo tanto tienen una función de destrucción y eliminación de dichas células unidas a los mismos. Dicha función se conoce como "función efectora". Dicha función letal se compone de dos actividades diferentes, denominadas citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (en adelante abreviada como ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (en adelante abreviada como CDC). ADCC indica un tipo de citotoxicidad inducida por la activación de los macrófagos, células NK, neutrófilos y similares, que se han unido a la región constante de un anticuerpo mediante FcR que se ha expresado en su superficie. Mientras tanto, CDC indica un tipo de citotoxicidad provocada por la activación de un sistema de complemento, que se produce mediante el enlace antígeno-anticuerpo. Estas actividades se conocen que varían dependiendo de la subclase de anticuerpo (Charles A. Janeway *et al.*, *Immunology*, 1997, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc.).

Si bien la especificidad de unión al antígeno se mantiene, la estabilidad del anticuerpo IgG4 puede mejorarse. Específicamente, dicha mejora puede conseguirse sustituyendo la arginina (R) en la posición 409 de IgG4 por ácido glutámico (E), fenilalanina (F), isoleucina (I), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), valina (V), triptófano (W), tirosina (Y), lisina (K), treonina (T), metionina (M), o leucina (L). Preferentemente, se lleva a cabo la sustitución por lisina (K), treonina (T), metionina (M), o leucina (L). Aún más preferentemente, se lleva a cabo la sustitución por lisina (K).

Además, específicamente, dicha mejora puede conseguirse sustituyendo un dominio CH3 de IgG4 por un dominio CH3 de IgG1 o sustituyendo los dominios CH2 y CH3 de IgG4 por los dominios CH2 y CH3 de IgG1.

La expresión "anticuerpo con estabilidad mejorada" haciendo referencia a la presente invención indica un anticuerpo que es menos probable que forme un conglomerado en condiciones ácidas o de bajo pH. Por ejemplo, en el tratamiento a pH 3,5 durante 10 minutos o 60 minutos, el contenido de conglomerado formado con dicho anticuerpo no es más del 10%, preferentemente no más del 5%, y más preferentemente no más del 1%. El contenido de conglomerado puede medirse por cromatografía de líquidos o similares.

Además, la expresión "anticuerpo con propiedades físicas mejoradas" haciendo referencia a la presente invención indica un anticuerpo estabilizado en el que ADCC y/o CDC se controlan para conseguir los niveles deseados y un anticuerpo estabilizado en el que se controla la capacidad de unión a FcR para conseguir un nivel deseado de los mismos. El control de ADCC y/o CDC y el control de la capacidad de unión a FcR se puede llevar a cabo introduciendo una mutación en un anticuerpo de una manera descrita a continuación.

ADCC y/o CDC pueden atenuarse o potenciarse introduciendo más mutaciones adecuadas en un anticuerpo con estabilidad mejorada.

Por ejemplo, se cree que L235, D265, D270, K322, P331 y P329 desempeñan una función importante en lo que se refiere a la capacidad de activar un complemento de la IgG humana. (Cada letra del alfabeto representa un aminoácido correspondiente y cada número es un número según el índice de EU propuesto por Kabat *et al.* (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 quinta edición), y lo mismo se aplica en adelante). Sustituyendo dicha región por otro aminoácido, puede atenuarse la actividad CDC (Esohe E. Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 2000, 164: 4178-4184; Yuanyuan Xu *et al.* *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 3469-3474; Brekke, O.H. *et al.* *Eur. J. Immunol.* 1994, 24: 2542; Morgan, A., *et al.*, *Immunology* 1995, 86: 319.; Lund, J., *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157: 4963, y Tao, M.H., *et al.*, *J. Exp. Med.* 1993, 178: 661). Específicamente, dicha atenuación puede llevarse a cabo sustituyendo D270, K322, P329 o P331 por A o sustituyendo P331 por S o G.

Además, se cree que Glu233-Ser239, Gly316-Lys338, Lys274-Arg301, Tyr407-Arg416, Asn297, Glu318, Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 y Ala327-Ile332 están involucrados en la unión entre IgG y FcR (Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., y Winter, G. (1988) *Nature* 332, 563-564; Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A., y Schmidt, R. E. (1998) *Ann. Hematol.* 76, 231-248; Gavin, A., Hulett, M., y Hogarth, P. M. (1998) en *The Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity* (van der Winkel, J. G. J., y Hogarth, P. M., editores), págs. 11-35; Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, Países Bajos, Sautes, C. (1997) en *Cell-mediated Effects of Immunoglobulins* (Fridman, W. H., y Sautes, C., editores), págs. 29-66; R. G. Landes Co., Austin, TX, Da'ron, M. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-234; Canfield, S. M., y Morrison, S. L. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 1483-1491; Chappel, M. S., Iseman, D. E., Everett, M., Xu, Y.-Y., Dorrington, K. J., y Klein, M. H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A.* 88, 9036-9040; Wolf, J. M., Partridge, L. J., Jefferis, R., y Burton, D. R.

(1986) *Mol. Immunol.* 23, 319-330, y Wines, B. D., Powell, M. S., Parren, P.W.H.I., Barnes, N., y Hogarth, A.M. (2000) *J. Immunol.* 164, 5313-5318). Al introducir una mutación en dichas regiones, se puede reducir la actividad de ADCC. Específicamente, la capacidad de unión de FcR puede reducirse al sustituir L235 y G237 por E y A, respectivamente.

5 Además, ADCC y/o CDC de un anticuerpo con estabilidad mejorada puede potenciarse introduciendo la mutación descrita anteriormente de manera invertida. Específicamente, al convertir S en la posición 331 de IgG4 en P, la actividad CDC puede mejorarse (Yuanyuan Xu *et al. J. Biol. Chem.* 1994, 269, 3469-3474).

10 Un anticuerpo con estabilidad mejorada en la que la arginina (R) en la posición 409 de IgG4 está sustituida por lisina (K), treonina (T), metionina (M), o leucina (L) no está particularmente limitado. Sin embargo, los ejemplos del mismo incluyen anticuerpos anti-CD40. Más específicamente, sus ejemplos incluyen 4D11, KM281-1-10, y F4-465 descritos en el documento WO 03/88186.

15 Además, se ha descrito la mutación de R409 de IgG4 en K con una frecuencia de 1/45 en los seres humanos, sin embargo, dicha mutación y estabilidad de dicha IgG4 de tales no se describen en el artículo (Molecular characterization of immunoglobulin G4 isoallotype A. Brusco, S. Saviozzi, F. Clinque, M. DeMarchi, C. Boccazzi, G. de Lange, AM van Leeuwen, A. O. Carbonara *European J. Immunogenetics*, 1998, 25, 349-355).

20 2. Definición

Los términos utilizados en la presente memoria se definen de la manera siguiente.

25 El término "CD40" utilizado en la presente memoria indica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos descrita en E. A. Clark *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 4494, 1986, o I. Stamenkovic *et al., EMBO J.* 8: 1403, 1989, y en particular, un polipéptido antigénico expresado en las superficies de los linfocitos B, DC, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales o células tumorales procedente de dichas células.

30 La expresión "anticuerpo anti-CD40" utilizada en la presente memoria indica cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal contra un CD40 expresado en la célula, un CD40 completa o un CD40 parcial. Preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

35 El término "anticuerpo" de la invención indica anticuerpos que proceden de genes (denominados en conjunto genes de anticuerpos) que codifican una región variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena pesada, una región variable de la cadena ligera y una región constante de la cadena ligera, que juntos constituyen una inmunoglobulina. El anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo de cualquier clase de inmunoglobulina y un anticuerpo con cualquier isotipo.

40 Las expresiones "dominio CH1", "región bisagra", "dominio CH2," y "dominio CH3" se utiliza aquí cada indicar una parte de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo, y se basan en el índice EU como en Kabat *et al.* (Kabat *et al., Sequences of proteins of immunological Interest*, 1991 quinta edición). Por definición, los intervalos del dominio CH1 de 118 a 215 según el índice de la EU, la región bisagra comprende desde 216 hasta 237 según el índice de la EU, el dominio CH2 comprende desde 238 hasta 340 según el índice de la EU, y los intervalos del dominio CH3 desde 341 hasta 446 según el índice de la EU.

45 La expresión "anticuerpo humano" con referencia a la presente invención indica un anticuerpo que es un producto de expresión de un gen del anticuerpo procedente de un ser humano. La cadena ligera de un anticuerpo humano comprende κ o λ . La cadena pesada de un anticuerpo humano comprende las 5 clases diferentes de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Además, IgG comprende las 4 subclases de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

50 La expresión "anticuerpo mutante" utilizada en la presente memoria hace referencia a un mutante derivado de un anticuerpo que produce un hibridoma, dicho anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos está sometido a eliminación, sustitución, inserción o adición de al menos un aminoácido. El mutante de anticuerpo de la presente invención puede ser producido de manera adecuada con la utilización de los procedimientos siguientes o similares que son conocidos por los experto en la materia: un procedimiento para aislar un gen del anticuerpo a partir de un hibridoma; información de la secuencia de la región constante del anticuerpo humano y un procedimiento de mutagenia dirigida al sitio en genes.

60 El anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo sometido a eliminación, sustitución, inserción o adición de "varios" aminoácidos. En tal caso, el término "varios" indica específicamente 1 a 10, preferentemente 1 a 8, más preferentemente 1 a 5, y aún más preferentemente 1 ó 2. Además, la eliminación, sustitución, inserción o adición mencionada tiene lugar preferentemente en una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo. Ejemplos específicos de dichos anticuerpos incluyen: (1) un anticuerpo en el que la serina en la posición 228 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituido por prolina; (2) un anticuerpo en el que leucina en la posición 235 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituido por ácido glutámico; y (3) un

anticuerpo en el que la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que se indican en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidos por ácido glutámico y prolina, respectivamente.

5 Además, el anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo híbrido y un anticuerpo humanizado. Dicho anticuerpo híbrido comprende partes de anticuerpos procedentes de dos o más especies (por ejemplo, una región variable de anticuerpo murino y una región constante de anticuerpo humano) (por ejemplo, solicitudes de patente EP nº 120694 y 125023). Un anticuerpo humanizado se produce a partir de la RDC murina, un marco humano región variable, y una región constante humana con utilización de técnicas de injerto de RDC o similares (por ejemplo, Riechmann *et al.*, *Nature* (1988), 332, 323-327).

10 El anticuerpo de la presente invención puede obtenerse incorporando el gen del anticuerpo en un vector de expresión, introduciendo el vector en una célula hospedadora adecuada, recolectando el anticuerpo de las células cultivadas o el sobrenadante y purificando el mismo.

15 Dicho vector utilizado puede ser un fago o un plásmido que puede multiplicarse de manera autónoma en la célula hospedadora o puede integrarse en los cromosomas de la célula hospedadora. Dicho ADN plasmídico puede proceder de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o una levadura. Dicho ADN del fago puede ser un fago λ o similar.

20 La célula hospedadora utilizada para la transformación no está particularmente restringida siempre que pueda expresar el gen diana. Los ejemplos de dicha célula hospedadora incluyen bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras, células animales (por ejemplo, células COS y células CHO) y células de insecto.

25 Pueden utilizarse algunos procedimientos conocidos para introducir un gen en un hospedador (por ejemplo, un procedimiento de iones calcio, electroporación, un procedimiento con esferoplastos, un procedimiento de acetato de litio, un procedimiento de fosfato de calcio y lipofección). Ejemplos de un procedimiento para introducir un gen en un animal descrito a continuación incluyen microinyección, un procedimiento para introducir un gen en una célula ES utilizando electroporación o lipofección y el trasplante nuclear.

30 La expresión "producto de cultivo" de la presente invención indica (a) sobrenadante de cultivo, (b) células cultivadas, células bacterianas cultivadas o células destruidas, o (c) secreción de un transformante. Para cultivar un transformante, puede emplearse cultivo estático, cultivo en botella en rodillos, o similares con utilización de un medio adecuado para el hospedador utilizado.

35 Tras el cultivo, si se produce una proteína de interés de anticuerpo en las células bacterianas en otras células, el anticuerpo se recoge al destruir las células bacterianas o las células. Si el anticuerpo de interés se produce en el medio externo de las células bacterianas o de las células, la solución de cultivo se utiliza tal cual o después de separarse de las células bacterianas o de las células por centrifugación u otros medios. Después de esto, se emplea un proceso bioquímico solo u opcionalmente en combinación con cualquier forma de cromatografía utilizada para el aislamiento/purificación de proteínas de tal manera que el anticuerpo de interés puede ser aislado y purificado del producto de cultivo.

40 Además, un animal hospedador que tiene un gen endógeno en el cual se ha incorporado el gen de un anticuerpo de interés, tal como, por ejemplo, uno bovino transgénico, uno de cabra transgénico, uno de oveja transgénica o uno de cerdo transgénico, puede producirse por un técnica para crear un animal transgénico. En tal caso, es posible entonces producir en masa un anticuerpo monoclonal derivado del gen del anticuerpo mediante la utilización de leche que ha sido segregada de dicho animal transgénico (Wright, G., *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9, 830-834). Es posible llevar a cabo el cultivo *in vitro* de un hibridoma, permitiendo que prolifere un hibridoma, manteniendo y conservando el hibridoma, y aplicando un medio nutriente conocido utilizado para la producción de anticuerpos monoclonales o cualquier medio nutriente que se derive y prepare a partir de un medio básico conocido para el sobrenadante de cultivo basado en las propiedades de una especie de células que debe cultivarse, con fines experimentales y de estudio, y varias condiciones para el cultivo y similares.

55 3. Composición farmacéutica

Una composición farmacéutica que contiene una formulación del anticuerpo purificado de la presente invención es también dentro del alcance de la presente invención. Tal composición farmacéutica contiene preferentemente un diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable, además de los anticuerpos, y puede estar en la forma de una mezcla con un anticuerpo diferente o un medicamento diferente tal como un agente antibiótico. Ejemplos de un vehículo adecuado comprenden de manera no limitativa solución salina fisiológica, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, una solución salina fisiológica con glucosa tamponada con fosfato y una solución salina fisiológica tamponada. Alternativamente, el anticuerpo puede estar liofilizado y puede redisolverse cuando sea necesario mediante la adición de una solución acuosa tamponada antes de su utilización como se ha descrito anteriormente. La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral o vía parenteral, tales como por inyección o dosificación intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal.

En el caso anterior, una sola dosis eficaz, que es una combinación del anticuerpo de la presente invención con un diluyente adecuado y un vehículo fisiológicamente aceptable, es de 0,0001 mg a 100 mg por kg de peso corporal, administrada de una vez cada dos días a una vez cada 8 semanas.

5 El anticuerpo anti-CD40 de la presente invención puede utilizarse para terapias destinadas al rechazo del trasplante (provocado tras el trasplante renal, el trasplante de corazón, el trasplante de hígado, el trasplante de páncreas, el trasplante de intestino, xenoinjerto y similares), enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias (por ejemplo, la enfermedad de Chron y la colitis ulcerosa), lupus eritematoso diseminado (LED), púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), esclerosis múltiple, psoriasis y reumatismo), cáncer (por ejemplo, 10 cáncer pulmonar, cáncer de intestino grueso, cáncer de colon, cáncer rectal, el cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, y cáncer gástrico), arteriosclerosis, nefritis, enfermedad de Alzheimer y amiloidosis.

Ejemplo

15 La presente invención se describe a continuación con mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos, aunque el alcance técnico de la presente invención no se limitada a éstos.

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos anti-CD40 y productos de fusión de la región constante de IgG1/IgG4

20 Se produjeron anticuerpos utilizando regiones de la cadena pesada y ligera variables de 4D11 y KM281-1-10 y F4-465, que son anticuerpos anti-CD40 descritos en el documento WO02/088186. Estos 3 anticuerpos se sabe que actúan como antagonistas. 4D11, KM281-1-10 y F4-465 son anticuerpos producidos por los hibridomas 4D11, KM281-1-10 y 465-F4, respectivamente. Los hibridomas 4D11 y KM281-1-10 se han depositado en el Organismo 25 Depositario Internacional de Patentes, el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, en el AIST (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) con los números de registro FERM BP-7758 y FERM BP-7579 el 27 de septiembre de 2001 y 9 de mayo de 2001, respectivamente. Además, F4-465 se ha depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), (10.801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU.) con el nº de registro. PTA-3338 de la ATCC el 24 de abril de 2001.

30 Se presentan a continuación los ADN que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de 4D11 y las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de 4D11.

35 El punto de inicio de la traducción de la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada es un codón ATG que comienza en adenina (A) en la posición 16 del extremo 5' de la SEC ID nº 1.

40 En la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada (SEC ID nº 1) de 4D11, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estaba situado entre citosina (C) en la posición 93 y citosina (C) en la posición 94, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estaba situado entre adenina (A) en la posición 456 y guanina (G) en la posición 457 (mediante la utilización del programa informático (Signal P ver. 2) de predicción de la secuencia génica).

45 En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID nº 2) de 4D11, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estaba situado entre serina (S) en la posición 26 y glutamina (Q) en la posición 27, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estaba situado entre serina (S) en la posición 147 y alanina (A) en la posición 148.

50 Por consiguiente, la región variable de la cadena pesada de 4D11 tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende desde citosina (C) en la posición 94 a la adenina (A) en la posición 456 en la SEC ID nº 1. Además, la región variable de la cadena pesada de 4D11 tiene una secuencia de aminoácidos que va desde la glutamina (Q) en la posición 27 a la serina (S) en la posición 147 en la SEC ID nº 2.

55 El punto de inicio de la traducción de la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera es un codón ATG que empieza en adenina (A) en la posición 59 del extremo 5' de la SEC ID nº 3.

60 En la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera (SEC ID nº 3) de 4D11, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estaba situado entre timina (T) en la posición 124 y guanina (G) en la posición 125, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estaba situado entre adenina (A) en la posición 442 y citosina (C) en la posición 443 (utilizando el programa informático (Signal P ver. 2) de predicción de la secuencia génica).

65 En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID nº 4) de 4D11, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estaba situado entre la cisteína (C) en la posición 22 y alanina (A) en la posición 23, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre la lisina (K) en la posición 128 y arginina (R) en la posición 129.

Por consiguiente, la región variable de la cadena ligera de 4D11 tiene una secuencia de ácido nucleico que va desde guanina (G) en la posición 125 a adenina (A) en la posición 442 de la SEC ID nº 3. Además, la región variable de la cadena ligera de 4D11 tiene una secuencia de aminoácidos que va desde la alanina (A) en la posición 23 a la lisina (K) en la posición 128 de la SEC ID nº 4. La secuencia de la cadena pesada del ácido nucleico (SEC ID nº 1) de 4D11

5

ATATGTCGACGAGTCATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTGGTTC
 TTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAG
 GAGTCGGGCCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCAC
 TGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCA
 GCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCA
 CCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCA
 AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTG
 TATTACTGTACGAGACCTGTAGTACGATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCC
 AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID nº 2) de 4D11

10

MDLMCKKMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLKPSETLSLTCTVSGGSI
 SSPGYGGWIRQPPGKLEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS
 VTAADTAVYYCTRPVVRYFGWFDPPWGQGLTVTVSSAS

La secuencia de la cadena ligera del ácido nucleico (SEC ID nº 3) de 4D11

15

AGATCTTAAGCAAGTGTAACAACCTCAGAGTACGCGGGGAGACCCACTCAGGAC
 ACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGC
 TCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG
 CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGC
 AGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATC
 TATGATGCCTCCAATTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA
 TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGA
 ACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAG
 GTGGAAATCAAACGTACG

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID nº 4) de 4D11

20

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALA
 WYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQF
 NSYPTFGQGTKVEIKRT

Las secuencias de la cadena pesada y ligera del ácido nucleico de un anticuerpo (en adelante se denominará 4D11G4) creadas por sustitución de la región constante de la cadena pesada de 4D11 con IgG4 se presentan a continuación.

25

La secuencia de la cadena pesada del ácido nucleico (SEC ID nº 43) de 4D11G4

ES 2 387 312 T3

ATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTG
GCGGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGG
ACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGCGGCTC
CATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
GGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCG
TCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCC
CTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTGTATTACTGTACGAG
ACCTGTAGTACGATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTG
CTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGT
AGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATG
GTCCCCCATGCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCT
TCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA
CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCC
CGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGT
GGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID nº 44) de 4D11G4

ES 2 387 312 T3

MDLMCKMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLKPSETLSLTCTVSGGSI
SSPGYYGGWIRQPPGKLEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSS
VTAADTAVYYCTRPVVRYFGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

La secuencia de la cadena ligera de ácido nucleico (SEC ID nº 45) de 4D11G4

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCA
GGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT
GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGC
TTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGA
TGCCTCCAATTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTT
ATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
AAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG
AGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC
TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
GCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA
GGGGAGAGTGTTGA

5

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID nº 46) de 4D11G4

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALA
WYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQF
NSYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

10

La secuencia de la cadena pesada del ácido nucleico de 4D11 creada por sustitución de la región constante de la cadena pesada, serina en la posición 228, leucina en la posición 235, y arginina en la posición 409 con IgG4, prolina, ácido glutámico y lisina, respectivamente, se presenta a continuación (dicha secuencia se denominará en lo sucesivo 4D11G4PEK).

15

ES 2 387 312 T3

La secuencia de la cadena pesada del ácido nucleico (SEC ID nº 47) de 4D11G4PEK

ATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTG
GCGGCTCCAGATGGGTCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGG
ACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGCGGCTC
CATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
GGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCG
TCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCC
CTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAG
ACCTGTAGTACGATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGT
CACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTG
CTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCGAACC GG TGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGT
AGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATG
GTCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGACCATCAGTC
TTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCA
ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
CCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTAACC GTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACÁCACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

5

La secuencia de la cadena pesada de aminoácidos (SEC ID nº 48) de 4D11G4PEK

MDLMCKKMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLKPSETLSLTCTVSGGSI
 SSPGYGGWIRQPPGKGLEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSS
 VTAADTAVYYCTRPVVRYFGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
 STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPQAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
 TKTTCNVVHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDITLMI
 SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQ
 VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 EGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

5 Se presentan a continuación los ADN que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de KM281-1-10 y las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de KM281-1-10. El punto de inicio de la traducción de la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada es un codón ATG que empieza en la adenina (A) en la posición 52 del extremo 5' de la SEC ID nº 5. En la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada (SEC ID nº 5) de KM281-1-10, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estuviera situado entre citosina (C) en la posición 108 y citosina (C) a la posición 109, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre la adenina (A) en la posición 468 y la guanina (G) en la posición 469 (utilizando el programa informático de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2)).

15 En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID nº 6) de KM281-1-10, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estuviera situado entre la serina (S) en la posición 19 y la glutamina (Q) en la posición 20, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre la serina (S) en la posición 139 y la alanina (A) en la posición 140.

20 Por consiguiente, la región variable de la cadena pesada (parte madura) de KM281-1-10 tiene una secuencia de ácido nucleico que va desde la citosina (C) en la posición 109 a la adenina (A) en la posición 468 en la SEC ID nº 5. Además, la región variable de la cadena pesada (parte madura) de KM281-1-10 tiene una secuencia de aminoácidos que va desde la glutamina (Q) en la posición 20 a la serina (S) en 139 posición en la SEC ID nº 6.

25 El punto de inicio de la traducción de la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera es un codón ATG que empieza en la adenina (A) en la posición 41 del extremo 5' de la SEC ID nº 7.

30 En la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera (SEC ID nº 7) de KM281-1-10, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estuviera situado entre adenina (A) en la posición 100 y la guanina (G) en la posición 101, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre adenina (A) en la posición 424 y citosina (C) en la posición 425 (utilizando el programa informático de predicción de la secuencia génica (Signal P ver. 2)).

35 En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID nº 8) de KM281-1-10, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estuviera situado entre la glicina (G) en la posición 20 y el ácido glutámico (E) en la posición 21, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre la lisina (K) en la posición 128 y la arginina (R) en la posición 129.

40 Por consiguiente, la región variable de la cadena ligera (parte madura) de KM281-1-10 tiene una secuencia de ácido nucleico que va desde la guanina (G) en la posición 101 a la adenina (A) en la posición 424 de la SEC ID nº 7. Además, la región variable de la cadena ligera (parte madura) de KM281-1-10 tiene una secuencia de aminoácidos que va desde el ácido glutámico (E) en la posición 21 a la lisina (K) en la posición 128 de la SEC ID nº 8.

45 La presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene la parte madura mencionada anteriormente. La presente invención comprende un anticuerpo estabilizado mediante la mutación mencionada anteriormente.

Secuencia de la cadena pesada de ácido nucleico (SEC ID nº 5) de KM281-1-10

CTGAACACAGACCCGTCGACTTTGAGAGTCCTGGACCTCCTGTGCAAGAACAT

GAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCTCTGTC
CCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC
CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTGGTTACTACTGGAGC
TGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTAC
AGTGGGAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTA
GACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAATTCTGTGACCGCTGCGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCCCCCTTGACGGTGACTACAAATGGTT
CCACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG

Secuencia de la cadena pesada de aminoácidos (SEC ID nº 6) de KM281-1-10

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISGYYSWSI
RQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNsvTAADTAVY
YCARAPLHGDIKWFHPWGQGLVTVSSASTK

5

Secuencia de la cadena ligera de ácido nucleico (SEC ID nº 7) de KM281-1-10

TCACAGATCTGAGCTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAACCCAG
CGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTG
TGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCA
GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGG
CCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
CTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAG
TATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATCAAACG
TACG

10

Secuencia de la cadena ligera de aminoácidos (SEC ID nº 8) de KM281-1-10

METPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY
QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS
SPITFGQTRLEIKRT

15 Se presentan a continuación los ADN que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de F4-465 y las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de F4-465, respectivamente.

20 El punto de inicio de la traducción de la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada es un codón ATG que empieza en la adenina (A) en la posición 47 del extremo 5' de la SEC ID nº 9.

25 En la secuencia de la cadena pesada de ácido nucleico (SEC ID nº 9) de F4-465, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estuviera situado entre la citosina (C) en la posición 103 y citosina (C) en la posición 104, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre la adenina (A) en la posición 484 y la guanina (G) en la posición 485 (utilizando el programa informático de predicción de la secuencia génica (Signal P ver. 2)) .

En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID nº 10) de F4-465, el límite entre la secuencia señal y

la región variable estaba previsto que estuviera situado entre la serina (S) en la posición 19 y la glutamina (Q) en la posición 20, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre la serina (S) en la posición 146 y la alanina (A) en la posición 147.

5 Por consiguiente, la región variable de la cadena pesada de F4-465 tiene una secuencia de ácido nucleico que va desde la citosina (C) en la posición 104 a la adenina (A) en la posición 484 en la SEC ID nº 9. Además, la región variable de la cadena pesada de F4-465 tiene una secuencia de aminoácidos que va desde la glutamina (Q) en la posición 20 a la serina (S) en la posición 146 en la SEC ID nº 10.

10 El punto de inicio de la traducción de la secuencia de la cadena ligera de ácido nucleico es un codón ATG que empieza en la adenina (A) en la posición 81 del extremo 5' de la SEC ID nº 11.

15 En la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera (SEC ID nº 11) de F4-465, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estuviera situado entre la citosina (C) en la posición 137 y la timina (T) en la posición 138, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre la timina (T) en la posición 458 y la citosina (C) en la posición 459 (utilizando el programa informático de predicción de la secuencia génica (Signal P ver. 2)) .

20 En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID nº 12) de F4-465, el límite entre la secuencia señal y la región variable estaba previsto que estuviera situado entre la alanina (A) en la posición 19 y la serina (S) en la posición 20, y el límite entre la región variable y la región constante estaba previsto que estuviera situado entre la glicina (G) en la posición 126 y la glutamina (Q) en la posición 127.

25 Por consiguiente, la región variable de la cadena ligera de F4-465 tiene una secuencia de ácido nucleico que va desde la timina (T) en la posición 138 a la timina (T) en la posición 458 de la SEC ID nº 11. Además, la región variable de la cadena ligera de F4-465 tiene una secuencia de aminoácidos que va desde la serina (S) en la posición 20 a la glicina (G) en la posición 126 de la SEC ID nº 12.

30 Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada (SEC ID nº 9) de F4-465

CTGAACACAGACCCGTCGACTACGCGGGAGACCACAGCTCCACACCATGGACT
 GGACCTGGAGGATCCTATTCTTGGTGGCAGCAGCAACAGGTGCCCACTCCCAG
 GTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA
 GGTCCCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAGCTATGCTATGAATTGGGTG
 CGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACCAACAC
 TGGGAACCAACGTATGCCAGGGCTTACAGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGGA
 CACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACA
 CTGCCGTGTACTGTGCGAGAGAGGTAGTACCAGTTGCTATGAGGGTAACTC
 ACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
 CAGCTAGCACCAA

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID nº 10) de F4-465

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVLVQSGSELKKPGASVKVPCKASGYTFTSYAMN
 WVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED
 TAVYYCAREVVPVAMRVTHYHYGMDVWGQTTVTVSSAST

35

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera (SEC ID nº 11) de F4-465

CTGGGTACGGTAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCACAGATCTGCCTCA
 5 GGAAGCAGCATCGGAGGTGCCTCAGCCATGGCATGGATCCCTCTCTTCTCGGC
 GTCCTTGTTTACTGCACAGGATCCGTGGCCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACCC
 TCAGTGTCCGTGGCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGTTCTGGAGATAA
 ATTGGGGGATAATTTTACTTGTCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGT
 GCTGGTCATCTTTCAGGATTGGAAGCGGGCGCCCAGGGATCCCTGCGCGATTCTC
 TGGCTCCAAGTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTA
 TGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACATCAGCACTGTGGTATTCTG
 GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTC
 ACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGT
 GTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAG
 ATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAG
 CAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG
 AAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGG
 AGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTTCATGAATTCAGATCCGTTAACGGTTAC
 CAACTACCTAGACTGGATTCTGTGACCAACATA

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEC ID nº 12) de F4-465

5

MAWIPLFLGLVLYCTGSVASYELTQPPSVSVAPGQTASITCSGDKLGDNFTCWYQQ
 KPGQSPVLVIFQDWKRRPGIPARFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDIS
 TVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK
 ADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK
 TVAPTECS

Los presentes inventores digirieron un fragmento de ADN que comprende las cadenas pesada y ligera de 4D11 (con
 10 IgG4) que es un anticuerpo anti-CD40 o 4D11PE (gen del anticuerpo 4D11) que es un mutante del mismo con *Bgl* II
 y *Nhe* I, seguido de purificación. El producto resultante se integró en un vector de N5KG4PE (IDEC
 Pharmaceuticals). N5KG4PE presenta las mutaciones puntuales S228P y L235E en la región constante de IgG4. El
 sobrenadante del cultivo de la misma se transfirió a una columna de Proteína A (Amersham Biosciences) y se eluyó
 15 con un tampón de ácido cítrico 0,1 M (pH 2,7), seguido de neutralización. A continuación, se ajustó el pH a 3,5,
 seguido de incubación a 37°C durante 1 minuto y de nuevo durante 10 minutos. En tal caso, el producto resultante
 contiene aproximadamente 10% del conglomerado. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que no
 se produce sustancialmente conglomerado en el caso de 4D114D11G1 creado por sustitución de la región constante
 de 4D11 con IgG1 (Solicitud de patente nº JP 2003-431408). A fin de especificar la región IgG1 involucrada en la
 20 inhibición de la formación de conglomerados a pH bajo, se produjeron anticuerpos híbridos IgG[1/1/4/4], IgG[4/4/1/1],
 IgG[4/4/1/4] e IgG[4/4/4/1] de la manera descrita a continuación. ([1/1/4/4] indica el dominio CH1 derivado de IgG1,
 la región bisagra derivada de IgG1, el dominio CH2 derivado de IgG4, y el dominio CH3 derivado de IgG4, y el
 mismo significado se aplica en las siguientes descripciones similares).

El IgG[4/4/1/1] se sometió a una reacción con cebadores linkH: gggtacgtctcacattcagtgatcag (SEC ID nº 13) y 24ch4:
 25 AGGGGTCCGGGAGATCATGAGAGTGTCTT (SEC ID nº 14) a 98°C durante 1 segundo, 60°C durante 30
 segundos y 72°C durante 30 segundos durante 15 ciclos utilizando N5KG4PE (IDEC Pharmaceuticals) como
 plantilla. Mientras tanto, IgG[4/4/1/1] se sometió a una reacción con cebadores 24ch3:
 AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCT (SEC ID nº 15) y linkH2: tgatcatcgtagatcacggc (SEC ID nº 16) a
 98°C durante 1 segundo, 60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos durante 15 ciclos utiliza ndo un
 30 vector de expresión de anticuerpos N5KG1-Val Lark (en adelante se abreviará como N5KG1; IDEC
 Pharmaceuticals) como plantilla. Los fragmentos de ADN ampliados se purificaron utilizando kits de purificación por

RCP. Se mezclaron entre sí cantidades iguales de los dos tipos de fragmentos de ADN purificados, seguido de una reacción a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 5 ciclos. A continuación, se añadieron los cebadores linkH y linkH2, seguido de una reacción durante 15 ciclos. El fragmento resultante de ADN ampliado se escindió con *NheI* y *BamHI*. Posteriormente, la región constante de IgG1 de un vector de N5KG1 se sustituyó con el fragmento escindido. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó N5KG4411.

IgG[1/1/4/4] se sometió a una reacción con cebadores linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (SEC ID nº 13) y 24ch4: AGGGGTCCGGGAGATCATGAGAGTGCCTT (SEC ID nº 14) a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 15 ciclos utilizando N5KG1 como plantilla. Mientras tanto, IgG[1/1/4/4] se sometió a una reacción con cebadores 24ch3: AAGGACACTCTCATGATCTCCGGACCCCT (SEC ID nº 15) y linkH2: tgatcacgtagatcacggc (SEC ID nº 16) a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 15 ciclos utilizando N5KG4PE como plantilla. Los fragmentos de ADN ampliados se purificaron utilizando kits de purificación por RCP. Se mezclaron entre sí cantidades iguales de los dos tipos de fragmentos de ADN purificados, seguido de una reacción a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 5 ciclos. A continuación, se añadieron los cebadores linkH y linkH2, seguido de una reacción en las mismas condiciones durante 15 ciclos. El fragmento resultante de ADN ampliado se escindió con *NheI* y *BamHI*. Posteriormente, la región constante de IgG1 de un vector de N5KG1 se sustituyó por el fragmento escindido. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó N5KG1144.

El IgG[4/4/1/4] se sometió a una reacción con cebadores linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (SEC ID nº 13) y CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (SEC ID nº 17) a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 15 ciclos utilizando como plantilla el N5KG4411 producido como se describió anteriormente. Mientras tanto, el IgG[4/4/1/4] se sometió a una reacción con cebadores CH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (SEC ID nº 18) y linkH2: tgatcacgtagatcacggc (SEC ID nº 16) a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 15 ciclos utilizando N5KG4PE como plantilla. Los fragmentos de ADN ampliados se purificaron utilizando kits de purificación por RCP. Se mezclaron entre sí cantidades iguales de los dos tipos de fragmentos de ADN purificados, seguido de una reacción a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 5 ciclos. A continuación, se añadieron los cebadores linkH y linkH2, seguido de una reacción en las mismas condiciones durante 15 ciclos. El fragmento resultante de ADN ampliado se escindió con *NheI* y *BamHI*. Posteriormente, la región constante de IgG1 de un vector de N5KG1 se sustituyó por el fragmento escindido. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó N5KG4414.

El IgG[4/4/4/1] se sometió a una reacción con cebadores linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (SEC ID nº 13) y CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (SEC ID nº 17) a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 15 ciclos utilizando N5KG4PE como plantilla. Mientras tanto, el IgG[4/4/4/1] se sometió a una reacción con cebadores CH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (SEC ID nº 18) y linkH2: tgatcacgtagatcacggc (SEC ID nº 16) a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 15 ciclos utilizando N5KG1 como plantilla. Los fragmentos de ADN ampliados se purificaron utilizando kits de purificación por RCP. Se mezclaron cantidades iguales de los dos tipos de fragmentos de ADN purificados entre sí, seguido de una reacción a 98°C durante 1 segundo, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos durante 5 ciclos. A continuación, se añadieron los cebadores linkH y linkH2, seguido de una reacción en las mismas condiciones durante 15 ciclos. El fragmento resultante de ADN ampliado se escindió con *NheI* y *BamHI*. Posteriormente, la región constante de IgG1 de un vector de N5KG1 se sustituyó por el fragmento escindido. El vector de expresión obtenido de este modo se denominó N5KG4441.

Cada vector de expresión se escindió con *BglI* y *NheI*. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de 4D11 se insertaron en su interior, dando lugar a la terminación de los vectores de expresión.

Ejemplo 2: Expresión y purificación de anticuerpos anti-CD40 híbridos

Los ADN del vector de expresión producidos en el ejemplo 1 se ajustaron con kits EndoFree Plasmid (Qiagen) a fin de ser introducidos en células 293 en suspensión (Invitrogen Life Technology) utilizando un Sistema de Expresión 293 FreeStyle (marca registrada) (Invitrogen Life Technology). Por consiguiente, se obtuvieron sobrenadantes de cultivo que contienen cada uno un anticuerpo diferente como resultado de la expresión temporal. Cada uno de los sobrenadantes de cultivo (aproximadamente 500 µg en cuanto a IgG) se filtró con un filtro de membrana (tamaño de poro: 0,22 micras; Millipore) y se cargaron en una columna de afinidad HiTrap rProtein A FF (volumen de la columna: 1 ml; Amersham Biosciences) utilizada para purificación de anticuerpos, seguido de un lavado con PBS (-). Cada producto resultante se eluyó con un tampón de ácido cítrico 20 mM (pH 3,4) y se recogió en un tubo que contenía un tampón fosfato 200 mM (pH 7,0). El contenido total de cada muestra después de la purificación de anticuerpos fue de 0% a 0,7%.

Ejemplo 3: Medición de los contenidos de conglomerado en soluciones de anticuerpos

Se analizaron los contenidos de conglomerado en las soluciones de anticuerpos utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Shimadzu Corporation), una columna TSK-G3000 SW (Tosoh Corporation), y fosfato de sodio 20 mM y NaCl 500 mM (pH 7,0) como disolventes. Se identificaron picos de monómeros de proteínas de anticuerpos y los de los conglomerados que comprenden un gran número de dichos monómeros comparando las posiciones de elución de las soluciones de anticuerpo y la posición de elución de un marcador de peso molecular (Cat. n°40403701; Oriental Yeast Co., Ltd.) utiliza dos para HPLC de filtración en gel. Se midieron los contenidos de conglomerado basándose en las áreas de los picos correspondientes.

Ejemplo 4: Evaluación de estabildades de anticuerpos anti-CD40 híbridos

Un tampón (60 µl, pH 2,7) que comprende citrato sódico 200 mM y NaCl 50 mM se añadió a 300 µl de cada solución de anticuerpo purificado en la forma descrita en el ejemplo 2 de tal manera que el pH se ajustó a 3,5, seguido de incubación a 37°C durante 10 minutos o 60 minutos. Cada solución (150 µl) sometida al tratamiento de reducción de pH se neutralizó añadiendo 37,5 µl de un tampón de fosfato de sodio 500 mM (pH 8,0). Se midieron los contenidos de conglomerados de las soluciones de anticuerpos sometidas al tratamiento de reducción del pH de la manera descrita en el ejemplo 3.

Como resultado, se puso de manifiesto que, cuando por lo menos un dominio CH3 procede de IgG1 (IgG[4/4/1/1] o IgG[4/4/4/1]), el anticuerpo tiene una estabilidad a pH bajo, que es comparable a la obtenida cuando la estabilidad de la región constante completa es IgG1 (tabla 1). La Tabla 1 muestra las estabildades de anticuerpos híbridos IgG4/IgG1 a bajo pH.

[Tabla 1]

Anticuerpo purificado	Conglomerado (%)	
	10 minutos *	60 minutos *
4D11-G1	0,0	0,0
4D 11-G4PE	10,9	13,3
4D11-G [1/1/4/4]	11,0	14,4
4D11-G [4/4/1/1]	0,0	0,0
4D11-G [4/4/1/4]	7,5	10,4
4D11-G [4/4/4/1]	1,0	0,8

* Tiempo de incubación a pH bajo

Ejemplo 5: Producción de mutantes (anticuerpos mutantes) con mutaciones en la región constante del anticuerpo anti-CD40 y evaluación de la inhibición de formación de conglomerados

A fin de reducir aún más las regiones que contribuyen a la inhibición de la formación de conglomerados, 6 restos de aminoácidos (en las posiciones 355, 356, 358, 409, 419 y 445 indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*) con las diferencias que implican IgG1 e IgG4 se centraron en en el dominio CH3. Uno de los restos de aminoácidos de IgG4 se sustituyó por el resto de aminoácido correspondiente de IgG1 de tal manera que se produjeron los mutantes (Q355R (creado por sustitución de un resto Gln en la posición 355 por Arg), E356D, M358L, R409K, E419Q, y L445P (creado de la misma manera que Q355R)). Los mutantes se produjeron utilizando los siguientes: Q355R: CCTGCCCCCA TCCGGGAGG AGATGACCAA G (SEC ID n° 19), E356D: CCATCCCA GGACGAGATG ACCAAGAAC (SEC ID n° 20), M358L: ATCCCAGGAG GAGCTGACCA AGAACCAG (SEC ID n° 21), R409K: CTTCTTCTC TACAGCAAGC TAACCGTGGA CAAG (SEC ID n° 22), E419Q: GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ATGTCTTCTC (SEC ID n° 23) y L445P: CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGAGGATC C (SEC ID n° 24). Se prepararon diferentes tipos de ADN mutantes que codifican cada uno de los mutantes con sustitución de aminoácidos en una región constante por el procedimiento de mutagenia dirigida utilizando un GeneEditor (marca registrada) *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (Promega) y una plantilla de ADN del vector de expresión anticuerpo anti-CD40 (descrito en los documentos WO 02/088186 y WO 05/063981 (Solicitud de patente JP 2003-431408) que se había producido insertando un fragmento de ADN que comprende las cadenas pesada y ligera del gen del anticuerpo anti-CD40 en un vector N5KG4PE (IDEC Pharmaceuticals). Se sintetizaron cadenas mutágenas hibridando oligonucleótidos mutágenos de interés y un oligonucleótido de selección proporcionado en el kit anterior con los ADN de plantilla. Posteriormente, se seleccionaron mutantes basándose en el hecho de que los mutantes proliferan solos en presencia de una mezcla para selección de antibióticos GeneEditor (marca registrada). Más específicamente, se incubaron plantillas de los DNA bicatenarios en condiciones alcalinas (NaOH 0,2 M y EDTA 0,2 mM (concentración final)) a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de neutralización con adición de acetato amónico 2M (pH 4,6) de tal manera que el volumen de acetato de amonio se convirtió en 1/10 del de la solución resultante. La solución resultante se recuperó por precipitación con etanol. A los ADN de plantilla recuperados desnaturalizados en medio alcalino, se añadieron los oligonucleótidos mutágenos de interés (las secuencias de oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5' se muestran en la tabla 1), un oligonucleótido de

selección (Top Select Oligo fosforilado en el extremo5') utilizado en relación con la nueva evolución de la resistencia a los antibióticos y un tampón de hibridación incluido en el kit. El producto resultante se incubó a 75°C durante 5 minutos y se enfrió lentamente hasta 37°C durante la hibridación. Para la síntesis y la ligadura de las cadenas mutantes, se añadieron tampón 10X de síntesis, T4 ADN polimerasa, y T4 ADN ligasa que se proporcionan en el kit, seguido de una reacción a 37°C durante 90 minutos. Se prepararon los ADN plasmídico utilizando *Escherichia coli* transformada que se había transformado en células BMH 71-18 mutS competentes y se cultivaron en presencia de una mezcla para selección de antibióticos GeneEditor (marca registrada). Además, utilizando dichos ADN, se transformaron células JM109 competentes. Los productos resultantes se sembraron en una placa LB que contenía una mezcla para selección de antibióticos GeneEditor (marca registrada). Se cultivaron los transformantes que se habían generado en la placa, seguido de la purificación de los ADN plasmídicos. A continuación, se analizaron las secuencias de nucleótidos del ADN. Por lo tanto, se obtuvieron los vectores de expresión (N5KG4PE-4D11-Q355R, NSKG4PE-4D11-E356D, N5KG4PE-4D11-M358L, N5KG4PE-4D11-R409K, N5KG4PE-4D11-E419Q y N5KG4PE-4D11-L445P) de los mutantes de anticuerpo anti-CD40 en cada uno de los cuales se ha introducido una mutación deseada de aminoácidos. Los anticuerpos obtenidos se expresaron y purificaron según el ejemplo 2. A continuación, las estabildades a bajo pH se midieron según el ejemplo 3.

Como resultado, entre los 6 mutantes anteriores que se habían producido, R409K solo (en el que Arg en la posición 409 se ha sustituido por Lys) se encontró que se había inhibido en lo que se refiere a la producción de aglomerados a pH bajo (tablas 2 y 3). La Tabla 2 muestra las estabildades a bajo pH en los casos en los que los aminoácidos de IgG1 se introdujeron por separado en el dominio CH3 de IgG4. La tabla 3 demuestra que las estabildades a pH bajo de mutantes R409K son comparables con la estabildad de la IgG1.

[Tabla 2]

Anticuerpo purificado	Conglomerado (%)	
	10 minutos *	60 minutos *
4D11-G4PE[Q355R]	9,0	12,2
4D11-G4PE[E356D]	9,9	12,6
4D11-G4PE[M358L]	8,5	11,5
4D11-G4PE[R409K]	0,7	0,5
4D11-G4PE[E419Q]	9,1	13,9
4D11-G4PE[L445P]	10,6	11,8
* Tiempo de incubación a pH bajo		

25

[Tabla 3]

Anticuerpo purificado	Conglomerado (%)	
	10 minutos *	60 minutos *
4D11-G1	0,0	0,0
4D11-G4PE	5,2	7,0
4D11-G[4/4/4/1]	3,9	5,4
4D11-G[4/4/1/4]	0,4	0,2
4D11-G4PE[R409K]	0,0	0,0
* Tiempo de incubación a pH bajo		

Ejemplo 6: Verificación de la inhibición de la formación de conglomerados a pH bajo en los casos de anticuerpos anti-CD40 tales como KM281-1-10 y F4-465

Se llevó a cabo el examen sobre la posibilidad de inhibición de la formación de conglomerados en condiciones de pH bajo en los casos en los que los anticuerpos F4-465 y KM281-1-10, que, como 4D11, son anticuerpos anti-CD40 tienen regiones constantes de IgG4 con mutaciones de R409K. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de N5KG4PE-4D11-R409K se digirieron con *Bgl*II y *Nhe*I para escindirise. Las regiones escindidas se sustituyeron por las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de KM281-1-10 o las de F4-465. Los anticuerpos obtenidos se expresaron y se purificaron según el ejemplo 2. A continuación, se midieron las estabildades a bajo pH según el ejemplo 3.

Como resultado, incluso en los casos de F4-465 y KM281-1-10, cada uno de los cuales tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable que difiere de la de 4D11, se confirmó un efecto similar de sustitución de aminoácidos de R409K (tabla 4) . La tabla 4 demuestra que otros anticuerpos además de 4D11 han mejorado la estabildad a pH bajo como resultado de la mutación de R409K.

[Tabla 4]

Anticuerpo purificado	Aglomerado	
	10 minutos *	60 minutos *
F4-465-G1	0,0	0,0
F4-465-G4PE	7,4	10,4
F4-465-G4PE[R409K]	0,0	0,0
KM281-1-10-G1	0,0	0,0
KM281-1-10-G4PE	9,0	12,5
KM281-1-10-G4PE [R409K]	0,0	0,0
* Tiempo de incubación a pH bajo		

Ejemplo 7: Actividad de unión del anticuerpo anti-CD40 a células Ramos

5 A fin de examinar si los anticuerpos híbridos producidos en el ejemplo 2 y los anticuerpos mutantes obtenidos en el ejemplo 5 ejercen actividades de unión a niveles que son comparables al nivel del anticuerpo original, se midió la actividad de unión con respecto a las células Ramos [ATCC] que son expresadas por CD40.

10 Se puso en suspensión una estirpe celular Ramos en un tampón de tinción (TC) de PBS que contenía 0,1% de NaN₃ y 2% de FCS a una concentración de 2×10^6 /ml. La suspensión celular (100 l/pocillo) se distribuyó en los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo redondo (fabricada por Becton, Dickinson and Company). Se añadió a la misma cada sobrenadante del cultivo de hibridoma (50 µl), seguido de incubación a una temperatura inferior a la de congelación durante 30 minutos. Un anticuerpo IgG1 humano contra albúmina de suero humano como referencia negativa se ajustó a una concentración de 2 mg/ml en un medio de cultivo de hibridoma. Se añadió el medio (50 µl) a la placa, seguido de incubación a una temperatura por debajo de cero durante 15 minutos. Después de lavar la placa con SB, se añadieron a la placa 50 µl de un anticuerpo anti-humano marcado con fluorescencia con R-PE diluido 250 veces (Southern Biotechnology Associates, Inc.), seguido de incubación a una temperatura inferior a la de congelación durante 15 minutos. Después de lavar dos veces con SB, la placa se puso en suspensión en 300 a 500 µl de un tampón FACS, y se midió la intensidad de la fluorescencia de cada célula usando FACS (FACSort, FACScan, fabricado por Becton, Dickinson and Company).

En los casos de los anticuerpos híbridos y los anticuerpos mutantes, no se observaron cambios en los resultados en cuanto a la actividad de unión (figs. 1A, 1B y 1C).

Ejemplo 8: Inhibición de la expresión de CD95 por anticuerpo anti-CD40 antagonista en células Ramos

Los 4D11, F4-465, y KM281-1-10 son conocidos como anticuerpos antagonistas. Se examinaron las influencias de los cambios estructurales en la región constante sobre las actividades antagonistas de dichos anticuerpos. Cuando un ligando CD40 se añade a las células Ramos, se observa un aumento del nivel de expresión de CD95. Se evaluó la actividad antagonista del anticuerpo basándose en un índice que indica la posibilidad de inhibición del aumento en la expresión de CD95 cuando el anticuerpo se añade en dicho caso.

Se sembraron $1,0 \times 10^6$ células/ml de una suspensión de células Ramos en una placa de 96 pocillos a razón de 50 µl/pocillo. El sobrenadante del cultivo o el anticuerpo purificado se ajustó a 2 µg/ml en un medio, y el medio se añadió a la placa de 96 pocillos a razón de 100 µl/pocillo. Se añadieron 4 µg/ml de un ligando CD40 soluble (Alexis Corporation) y 4 µg/ml de un anticuerpo anti-FLAG (M2, Sigma) a otro medio, y el medio se añadió a la placa de 96 pocillos a razón de 50 µl/pocillo. Después del cultivo durante la noche, se recogieron las células y se utilizó un anticuerpo anti-CD95 marcado con R-PE (Pharmingen NJ) para las células. El análisis se llevó a cabo utilizando FACS.

Los resultados demostraron que los cambios estructurales en la región constante no había causado cambios en las actividades antagonistas de los anticuerpos (figs. 2A, 2B, 2C y 2D).

Ejemplo 9: Producción de un mutante IgG4PE con sustitución de 1 resto de aminoácido en la posición 409 en la región constante CH3

Desde que se puso de manifiesto que la producción de un aglomerado de anticuerpos IgG4 a pH bajo se inhibe sustituyendo el aminoácido mediante el cual un resto Arg en la posición 409 en el dominio CH3 se sustituye por Lys, se produjeron cada uno de los anticuerpos IgG4 que había tenido sustituido el aminoácido en dicha posición por uno diferente de los 18 restos de aminoácidos siguientes (4D11-G4PE [R409A], 4D11-G4PE [R409D], 4D11-G4PE [R409E], 4D11-G4PE [R409F], 4D11-G4PE [R409G], 4D11-G4PE [R409H], 4D11-G4PE [R409I], 4D11-G4PE [R409L], 4D11-G4PE [R409M], 4D11-G4PE [R409N], 4D11-G4PE [R409P], 4D11-G4PE [R409Q], 4D11-G4PE [R409S], 4D11-G4PE [R409T], 4D11-G4PE [R409V], 4D11-G4PE [R409W], 4D11-G4PE [R409Y] y 4D11-G4PE [R409C]), seguido de un examen de la estabilidad bajo a pH. Un vector de expresión de cada mutante se produjo por mutagenia dirigida utilizando un sistema de mutagenia dirigida *in vitro* (Promega) GeneEditor (marca registrada),

como se describe en el ejemplo 5. Se utilizó como plantilla ADN de un vector de expresión del anticuerpo anti-CD40 (descrito en el documento WO 02/088186 y la solicitud de patente JP 2003-431408) para la mutagenia dirigida. Además, los 18 oligonucleótidos presentados a continuación se utilizaron como oligonucleótidos para la mutagenia (todos los ADN sintéticos siguientes estaban fosforilados en el extremo 5'; cada base subrayada indica una posición en la que se introdujo una mutación de aminoácidos):

5

Producción de R409A: CTTCTTCCTCTACAGCGCGTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 25);
 producción de R409D: CTTCTTCCTCTACAGCGACCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 26);
 producción de R409E: CTTCTTCCTCTACAGCGAGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 27);
 10 producción de R409F: CTTCTTCCTCTACAGCTTCCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 28);
 producción de R409G: CTTCTTCCTCTACAGCGGGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 29);
 producción de R409H: CTTCTTCCTCTACAGCCACCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 30);
 producción de R409I: CTTCTTCCTCTACAGCATCCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 31),
 producción de R409L: CTTCTTCCTCTACAGCCTGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 32);
 15 producción de R409M: CTTCTTCCTCTACAGCATGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 33);
 producción de R409N: CTTCTTCCTCTACAGCAACCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 34);
 producción de R409P: CTTCTTCCTCTACAGCCCGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 35);
 producción de R409Q: CTTCTTCCTCTACAGCCAGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 36);
 producción de R409S: CTTCTTCCTCTACAGCAGCCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 37);
 20 producción de R409T: CTTCTTCCTCTACAGCACGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 38);
 producción de R409V: CTTCTTCCTCTACAGCTGGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 39);
 producción de R409W: CTTCTTCCTCTACAGCTGGCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 40);
 producción de R409Y: CTTCTTCCTCTACAGCTACCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 41), y
 producción de R409C: CTTCTTCCTCTACAGCTGCCTAACCGTGGACAAG (SEC ID nº 42).

25

El análisis de la secuencia de nucleótidos del ADN se llevó a cabo a fin de seleccionar los ADN plasmídicos experimentales de los vectores que expresan anticuerpos mutantes obtenidos por mutagenia dirigida y para confirmar todas las secuencias de los nucleótidos totales de las regiones de codificación de anticuerpos. Por lo tanto, los 18 tipos de vector de expresión de los mutantes en cada uno de los cuales se había introducido la mutación deseada de aminoácidos.

30

Ejemplo 10: Evaluación de la inhibición de la formación de conglomerados en los casos de mutantes con una mutación del resto de aminoácido en la posición 409 de un anticuerpo anti-CD40 4D11 G4PE

Respecto a los 20 tipos de anticuerpos, incluyendo 18 tipos de mutantes con una mutación del resto de aminoácido en posición 409, 4D11-G4PE y 4D11-G4PE [R409K], un ADN vector de expresión de cada anticuerpo se transfeció en un cultivo celular para la proteína de expresión según el ejemplo 2. A continuación, se purificó una proteína de anticuerpo de cada sobrenadante de cultivo. Los anticuerpos purificados se sometieron a medición de la estabilidad a pH bajo (37°C) según el ejemplo 3. La tabla 5 muestra los contenidos de los conglomerados que se generaron cuando las muestras de anticuerpos se trataron a un pH bajo durante 60 minutos. Como se muestra en la tabla 5, ningún anticuerpo sometido a la sustitución de aminoácidos experimentó inhibición de la formación de conglomerados a un nivel comparable a los casos de 4D11-G4PE [R409K]. Sin embargo, en los casos de 4D11-G4PE[R409M], 4D11-G4PE[R409T] y 4D11-G4PE[R409L], los contenidos de aglomerados no fueron más de 5%. Por lo tanto, además del caso en que se sustituye un resto de Arg en la posición 409 en el anticuerpo IgG4 por Lys, se confirmó que la estabilidad a pH bajo se puede obtener en los casos en que está sustituido dicho resto de aminoácido con Met, Thr o Leu.

45

[Tabla 5]

Anticuerpo purificado	Conglomerado (%)
4D11-G4PE	12,0
4D11-G4PE[R409K]	0,8
4D11-G4PE[R409A]	13,7
4D11-G4PE[R409D]	10,6
4D11-G4PE[R409E]	5,6
4D11-G4PE[R409F]	7,9
4D11-G4PE[R409G]	15,0
4D11-G4PE[R409H]	11,4
4D11-G4PE[R409I]	9,5
4D11-G4PE[R409L]	4,1
4D11-G4PE[R409M]	2,9
4D11-G4PE[R409N]	7,1
4D11-G4PE[R409P]	16,0
4D11-G4PE[R409Q]	6,6
4D11-G4PE[R409S]	9,8

Anticuerpo purificado	Conglomerado (%)
4D11-G4PE[R409T]	3,0
4D11-G4PE[R409V]	5,4
4D11-G4PE[R409W]	6,8
4D11-G4PE[R409Y]	7,7
4D11-G4PE[R409C]	10,4

Listado de secuencias

5 <110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA
 <120> Anticuerpos IgG4 humanos estabilizados
 <130> PH-2582-PCT

10 <140>
 <141>
 <150> JP 2004/275908
 <151> 2004-09-22

15 <160> 48
 <170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
 <211> 462
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 1
 atatgtcgac gagtcatgga tctcatgtgc aagaaaatga agcacctgtg gttcttcctc 60
 ctgctggtgg cggctcccag atgggtcctg tcccagctgc agctgcagga gtcgggccca 120
 ggactactga agccttcgga gaccctgtcc ctcacctgca ctgtctctgg cggctccatc 180
 agcagtcctg gttactacgg gggctggatc cgccagcccc caggaagg gctggagtgg 240
 attgggagta tctataaaag tgggagcacc taccacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc 300
 accatatccg tagacacgtc caagaaccag ttctccctga agctgagctc tgtgaccgcc 360
 gcagacacgg ctgtgtatta ctgtacgaga cctgtagtac gatattttgg gtggttcgac 420
 ccctggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcctcagcta gc 462

30 <210> 2
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 387 312 T3

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu
 20 25 30

Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 35 40 45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp
 50 55 60

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr
 65 70 75 80

Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
 85 90 95

Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser
 100 105 110

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val
 115 120 125

Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser
 145

<210> 3
 <211> 448

ES 2 387 312 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
agatcttaag caagtgtaac aactcagagt acgcggggag acccactcag gacacagcat 60
ggacatgagg gtccccgctc agctcctggg gcttctgctg ctctggctcc caggtgccag 120
atgtgccatc cagttgacct agtctccatc ctccctgtct gcatctgtag gagacagagt 180
caccatcact tgccgggcaa gtcagggcat tagcagtgtt ttagcctggt atcagcagaa 240
accagggaaa gtccttaagc tcctgatcta tgatgcctcc aatttgaaa gtgggggtccc 300
atcaaggttc agcggcagtg gatctgggac agatttcaact ctcaccatca gcagcctgca 360
gcctgaagat ttgcaactt attactgtca acagtttaat agttaccgga cgttcggcca 420
agggaccaag gtggaaatca aacgtacg                                     448
```

5

<210> 4
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 4

ES 2 387 312 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

Arg Thr

130

- 5 <210> 5
- <211> 481
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

ES 2 387 312 T3

<400> 5

ctgaacacag acccgtcgac ttgagagtc ctggacctcc tgtgcaagaa catgaaacat 60
ctgtggttct tccttctcct ggtggcagct cccagatggg tcctgtccca ggtgcagctg 120
caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct tcggagaccc tgteccctcac ctgcactgtc 180
tctggtggct ccatcagtgg ttactactgg agctggatcc ggcagccccc agggaaggga 240
ctggagtgga ttgggtatat ctattacagt gggagcacca actacaatcc ctccctcaag 300
agtcgagtca ccatatcagt agacacgtcc aagaaccagt tctccctgaa gctgaattct 360
gtgaccgctg cggacacggc cgtgtattac tgtgcgagag cccccttgca cggtgactac 420
aatggttcc acccctgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 480
g 481

<210> 6

5

<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

10

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

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro

65 70 75 80

ES 2 387 312 T3

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu His Gly Asp Tyr Lys Trp Phe His Pro
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

<210> 7
<211> 430
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7

tcacagatct gagctgctca gttaggaccc agaggggaacc atggaaaccc cagcgcagct 60
tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga gaaattgtgt tgacgcagtc 120
tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc ctctcctgca gggccagtca 180
gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa cctggccagg ctcccaggct 240
cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca gacaggttca gtggcagtgg 300
gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag cctgaagatt ttgcagtgta 360
ttactgtcag cagtatggta gctcaccgat caccttcggc caagggacac gactggagat 420
caaacgtacg 430

10 <210> 8
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 8

ES 2 387 312 T3

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr
130

- <210> 9
- 5 <211> 495
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 9

ES 2 387 312 T3

ctgaacacag acccgtcgac tacgcgggag accacagctc cacaccatgg actggacctg 60
gaggatccta ttcttggtgg cagcagcaac aggtgcccac tcccaggtgc agctggtgca 120
atctgggtct gaggttgaaga agcctggggc ctcaagtgaag gtcccctgca aggcttctgg 180
atacaccttc actagctatg ctatgaattg ggtgcgacag gccctggac aagggttga 240
gtggatggga tggatcaaca ccaacactgg gaacccaacg tatgcccagg gcttcacagg 300
acggtttgtc ttctccttgg acacctctgt cagcacggca tatctgcaga tcagcagcct 360
aaaggctgag gacactgccg tgtattactg tgcgagagag gtagtaccag ttgctatgag 420
ggtaactcac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 480
ctcagctagc accaa 495

<210> 10
<211> 149
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

ES 2 387 312 T3

115

120

125

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

130

135

140

Ser Ser Ala Ser Thr

145

<210> 11
 <211> 830
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

ctgggtacgg taaccgtcag atgcctgga gacgccatca cagatctgcc tcaggaagca 60
 gcatcggagg tgcctcagcc atggcatgga tccctctctt cctcggcgtc cttgtttact 120
 gcacaggatc cgtggcctcc tatgagctga ctcageccacc ctcagtgtcc gtggccccag 180
 gacagacagc cagcatcacc tgttctggag ataaattggg ggataatddd acttgctggt 240
 atcagcagaa gccaggccag tcccctgtgc tggatcatctt tcaggattgg aagcggcgcc 300
 cagggatccc tgcgcgattc tctggctcca agtctgggaa cacagccact ctgaccatca 360
 gcgggaccca ggctatggat gaggtgact attactgtca ggcgtgggac atcagcactg 420
 tggatattcg cggagggacc aagctgaccg tcctaggtca gcccaaggct gcccctcgg 480
 tcaactctgtt cccgccctcc tctgaggagc ttcaagccaa caaggccaca ctgggtgtgc 540
 tcataagtga cttctacccg ggagccgtga cagtggcctg gaaggcagat agcagccccg 600
 tcaaggcggg agtggagacc accacaccct ccaaacaaag caacaacaag tacgcggcca 660
 gcagctacct gagcctgacg cctgagcagt ggaagtccca cagaagctac agctgccagg 720
 tcacgcatga agggagcacc gtggagaaga cagtggcccc tacagaatgt tcatgaattc 780
 agatccgtta acggttacca actacctaga ctggattcgt gaccaacata 830

10

<210> 12
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 12

ES 2 387 312 T3

Met Ala Trp Ile Pro Leu Phe Leu Gly Val Leu Val Tyr Cys Thr Gly
 1 5 10 15

Ser Val Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala
 20 25 30

Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp
 35 40 45

Asn Phe Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu
 50 55 60

Val Ile Phe Gln Asp Trp Lys Arg Arg Pro Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr
 85 90 95

Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ile Ser
 100 105 110

Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115 120 125

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 130 135 140

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

ES 2 387 312 T3

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 165 170 175

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 180 185 190

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 195 200 205

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 210 215 220

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230

5 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 13
 gggtagctcc tcacattcag tgcacag 27

15 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 14
 aggggtccgg gagatcatga gagtgcctt 30

25 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 15
 aaggacactc tcatgatctc ccggaccctt 30

35

ES 2 387 312 T3

<210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 16
 10 tgatcatacg tagatatcac ggc 23
 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 20 <400> 17
 ggtgtacacc tgtggctctc ggggctgccc 30
 <210> 18
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 30 <400> 18
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 30
 <210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 40 <400> 19
 cctgccccca tcccgagg agatgaccaa g 31
 45 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 20
 55 ccatcccagg acgagatgac caagaac 27
 <210> 21
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 21
 65 atcccaggag gagctgacca agaaccag 28

<210> 22
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 22
 10 cttcttcctc tacagcaagc taaccgtgga caag 34
 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 20 <400> 23
 gagcaggtgg cagcagggga atgtctctc 30
 <210> 24
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 30 <400> 24
 cctctcctg tctccggga aatgaggatc c 31
 <210> 25
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 25
 cttcttcctc tacagcgcgc taaccgtgga caag 34
 45 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 26
 55 cttcttcctc tacagcgacc taaccgtgga caag 34
 <210> 27
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 27
 65 cttcttcctc tacagcgagc taaccgtgga caag 34

<210> 28
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 28
 10 cttctcctc tacagctcc taaccgtgga caag 34
 <210> 29
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 20 <400> 29
 cttctcctc tacagcgggc taaccgtgga caag 34
 <210> 30
 <211> 34
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 30 <400> 30
 cttctcctc tacagccacc taaccgtgga caag 34
 <210> 31
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 31
 cttctcctc tacagcatcc taaccgtgga caag 34
 45 <210> 32
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 32
 55 cttctcctc tacagcctgc taaccgtgga caag 34
 <210> 33
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 33
 65 cttctcctc tacagcatgc taaccgtgga caag 34

<210> 34
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 34
 10 cttcttctc tacagcaacc taaccgtgga caag 34
 <210> 35
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 20 <400> 35
 cttcttctc tacagcccgc taaccgtgga caag 34
 <210> 36
 <211> 34
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 30 <400> 36
 cttcttctc tacagccagc taaccgtgga caag 34
 <210> 37
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 37
 cttcttctc tacagcagcc taaccgtgga caag 34
 45 <210> 38
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 38
 55 cttcttctc tacagcacgc taaccgtgga caag 34
 <210> 39
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 39
 65 cttcttctc tacagcgtgc taaccgtgga caag 34

ES 2 387 312 T3

<210> 40
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 <400> 40
 10 cttcttcctc tacagctggc taaccgtgga caag 34
 <210> 41
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 20 <400> 41
 cttcttcctc tacagctacc taaccgtgga caag 34
 <210> 42
 <211> 34
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sintético
 30 <400> 42
 cttcttcctc tacagctgcc taaccgtgga caag 34
 <210> 43
 <211> 1425
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 atggatctca tgtgcaagaa aatgaagcac ctgtggttct tcctcctgct ggtggcggct 60
 cccagatggg tcctgtccca gctgcagctg caggagtcgg gcccaggact actgaagcct 120
 tcggagacct tgtccctcac ctgcactgtc tctggcggct ccatcagcag tcctggttac 180
 tacgggggct ggatccgcca gccccaggg aaggggctgg agtggattgg gagtatctat 240
 aaaagtggga gcacctacca caaccgctcc ctcaagagtc gagtccacct atccgtagac 300
 acgtccaaga accagttctc cctgaagctg agctctgtga ccgccgcaga cacggctgtg 360
 tattactgta cgagacctgt agtacgatat tttgggtggt tcgaccctg gggccaggga 420
 accctggta ccgctcctc agctagcacc aagggcccat ccgtcttccc cctggegccc 480
 tgctccagga gcacctccga gagcacagcc gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 540
 cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc 600
 ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac tcctcagca gcgtggtgac cgtgcctccc 660
 40

ES 2 387 312 T3

agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc aacgtagatc acaagcccag caacaccaag 720
 gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt ccccatgcc catcatgccc agcacctgag 780
 ttctgtgggg gaccatcagt ctctctgttc cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc 840
 tcccgacc ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc 900
 cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 960
 gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctctca ccgtctgca ccaggactgg 1020
 ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1080
 aaaacctct ccaaagccaa agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca 1140
 tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggettctac 1200
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1260
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaggct aaccgtggac 1320
 aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1380
 aaccactaca cacagaagag cctctccctg tctctgggta aatga 1425

<210> 44
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 44

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu
 20 25 30

Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 35 40 45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp
 50 55 60

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr
 65 70 75 80

ES 2 387 312 T3

Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
 85 90 95

Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser
 100 105 110

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val
 115 120 125

Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 210 215 220

ES 2 387 312 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420 425 430

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
465 470

- <210> 45
- <211> 708
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <400> 45

ES 2 387 312 T3

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgccca tccagttgac ccagttctcca tctctcctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
 aaaccaggga aagctcctaa gctcctgatac tatgatgcct ccaatttggg aagtggggtc 240
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
 cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagtta atagttacc gacgttcggc 360
 caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaate gggtaactcc 540
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga 708

<210> 46
 <211> 235
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 46

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

ES 2 387 312 T3

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

5 <210> 47
<211> 1425

ES 2 387 312 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 47

atggatctca tgtgcaagaa aatgaagcac ctgtggttct tctcctgct ggtggcggct 60
 cccagatggg tectgtecca gctgcagctg caggagtcgg gcccaggact actgaagcct 120
 tcggagacct tgtccctcac ctgcactgtc tctggcggct ccatcagcag tcttggttac 180
 tacgggggct ggatccgcca gccccaggg aaggggctgg agtggattgg gagtatctat 240
 aaaagtggga gcacctacca caaccctcc ctcaagagtc gagtcacat atccgtagac 300
 acgtccaaga accagttctc cctgaagctg agctctgtga ccgccgcaga cacggctgtg 360

5

tattactgta cgagacctgt agtacgatat ttgggtggt tcgaccctg gggccaggga 420
 accctggtca ccgtctctc agctagcacc aaggggcat ccgtctccc cctggcggcc 480
 tgctccagga gcacctcga gagcacagcc gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc 540
 cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc 600
 ccggctgtcc tacagtctc aggactctac tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc 660
 agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc aacgtagatc acaagcccag caacaccaag 720
 gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt ccccatgcc caccatgcc agcacctgag 780
 ttcgaggggg gaccatcagt ctctctgttc cccccaaac ccaaggacac tctcatgac 840
 tcccggacct ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc 900
 cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 960
 gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtctca ccgtcctgca ccaggactgg 1020
 ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1080
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca 1140
 tcccaggagg agatgaccaa gaaccagtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac 1200
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1260
 acgctcccg tgetggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct aaccgtggac 1320
 aagagcaggt ggcaggagg gaatgtctc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1380
 aaccactaca cacagaagag cctctccctg tctctgggta aatga 1425

<210> 48
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 48

ES 2 387 312 T3

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu
20 25 30

Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
35 40 45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp
50 55 60

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr
65 70 75 80

Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
85 90 95

Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser
100 105 110

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val
115 120 125

ES 2 387 312 T3

Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 210 215 220

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 225 230 235 240

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

ES 2 387 312 T3

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430

ES 2 387 312 T3

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
465 470

REIVINDICACIONES

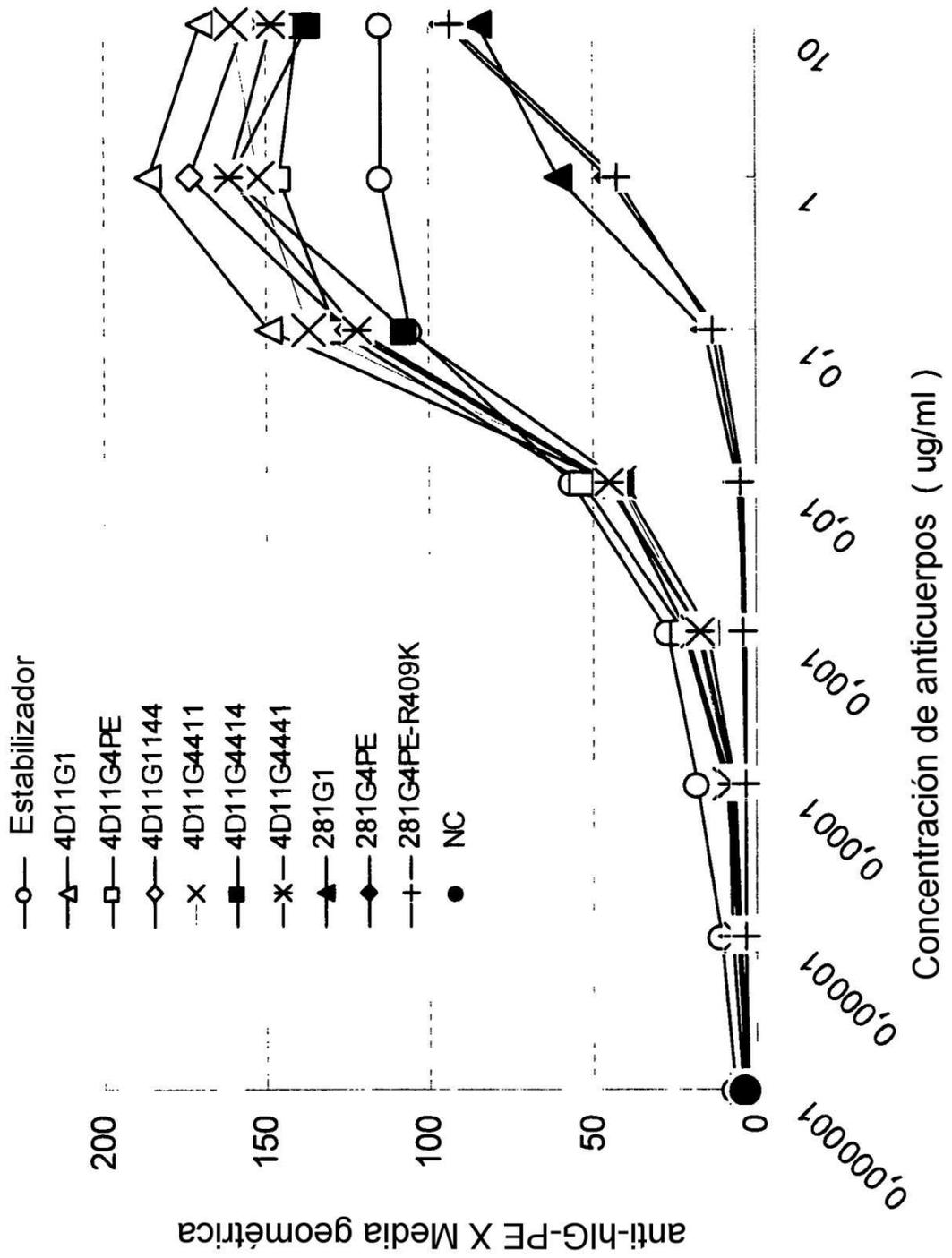
- 5 1. Anticuerpo IgG4 humano, en el que la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada de IgG4, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por prolina y ácido glutámico, respectivamente, y la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que está indicada en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo tiene las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo producido por el hibridoma 4D11, nº de registro: FERM BP-7758.
- 15 3. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada mostrada por la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 2 y una región variable de la cadena ligera mostrada por la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 4.
- 20 4. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 1 y una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 3.
- 25 5. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada de IgG4 humana tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 44, y la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 46.
- 30 6. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la cadena pesada de IgG4 humana es una cadena pesada codificada por la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 43, y la cadena ligera es una cadena ligera codificada por la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera representada por la SEC ID nº 45.
- 35 7. Anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2, que es un anticuerpo anti-CD40.
- 40 8. Procedimiento *in vitro* para producir un anticuerpo IgG4 humano, que comprende las etapas siguientes:
sustituir la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada de IgG4, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, por prolina y ácido glutámico, respectivamente, y
sustituir la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que está indicada en el índice EU como en Kabat *et al.*, por lisina, treonina, metionina o leucina.
- 45 9. Procedimiento *in vitro* para inhibir el agregado de anticuerpos de un anticuerpo de IgG4 humano, en el que la serina en la posición 228 y la leucina en la posición 235 en la región constante de la cadena pesada de IgG4, que están indicadas en el índice EU como en Kabat *et al.*, están sustituidas por la prolina y el ácido glutámico, respectivamente, y la arginina en la posición 409 en una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que está indicada en el índice EU como en Kabat *et al.*, está sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina.
- 50 10. Procedimiento *in vitro* para producir un anticuerpo IgG4 humano, que comprende las etapas siguientes:
producir un vector de expresión que tiene genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;
introducir el vector de expresión en un hospedador;
55 cultivar el hospedador; y
obtener el anticuerpo del producto de cultivo.
- 60 11. Procedimiento *in vitro* para producir un anticuerpo IgG4 humano, que comprende las etapas siguientes:
producir un vector de expresión que tiene una secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada representada por la SEC ID nº 47 y una secuencia de ácido nucleico de cadena ligera representada por la SEC ID nº 45;
introducir el vector de expresión en un hospedador;
65 cultivar el hospedador; y

obtener el anticuerpo del producto de cultivo.

5 12. Composición farmacéutica que comprende, como principio activo, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7.

10 13. Agente terapéutico para el tratamiento del rechazo al trasplante, enfermedades autoinmunitarias, cáncer, arteriosclerosis, nefritis, enfermedad de Alzheimer, o amiloidosis, que comprende, como principio activo, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

Fig. 1A



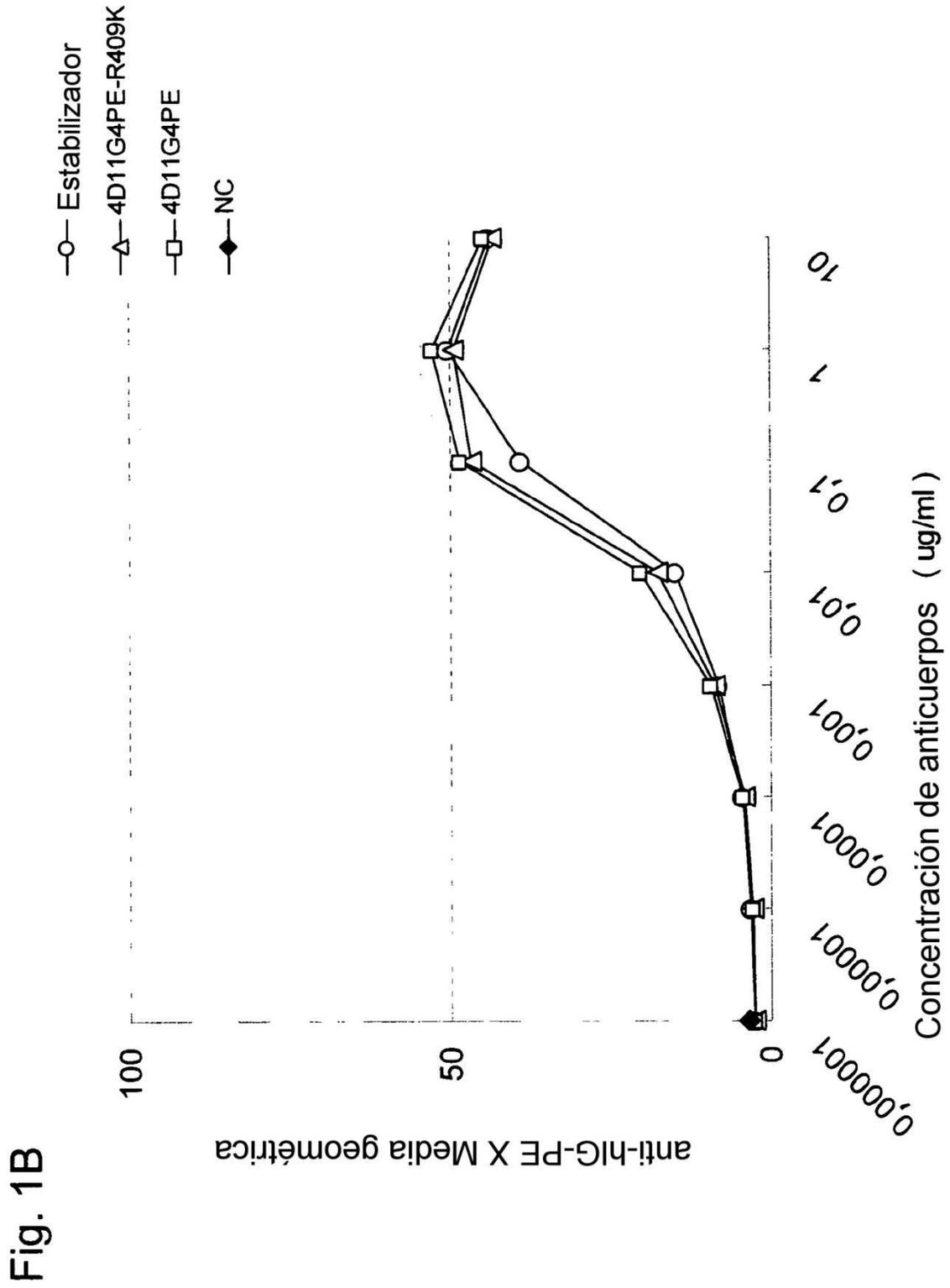


Fig. 1C

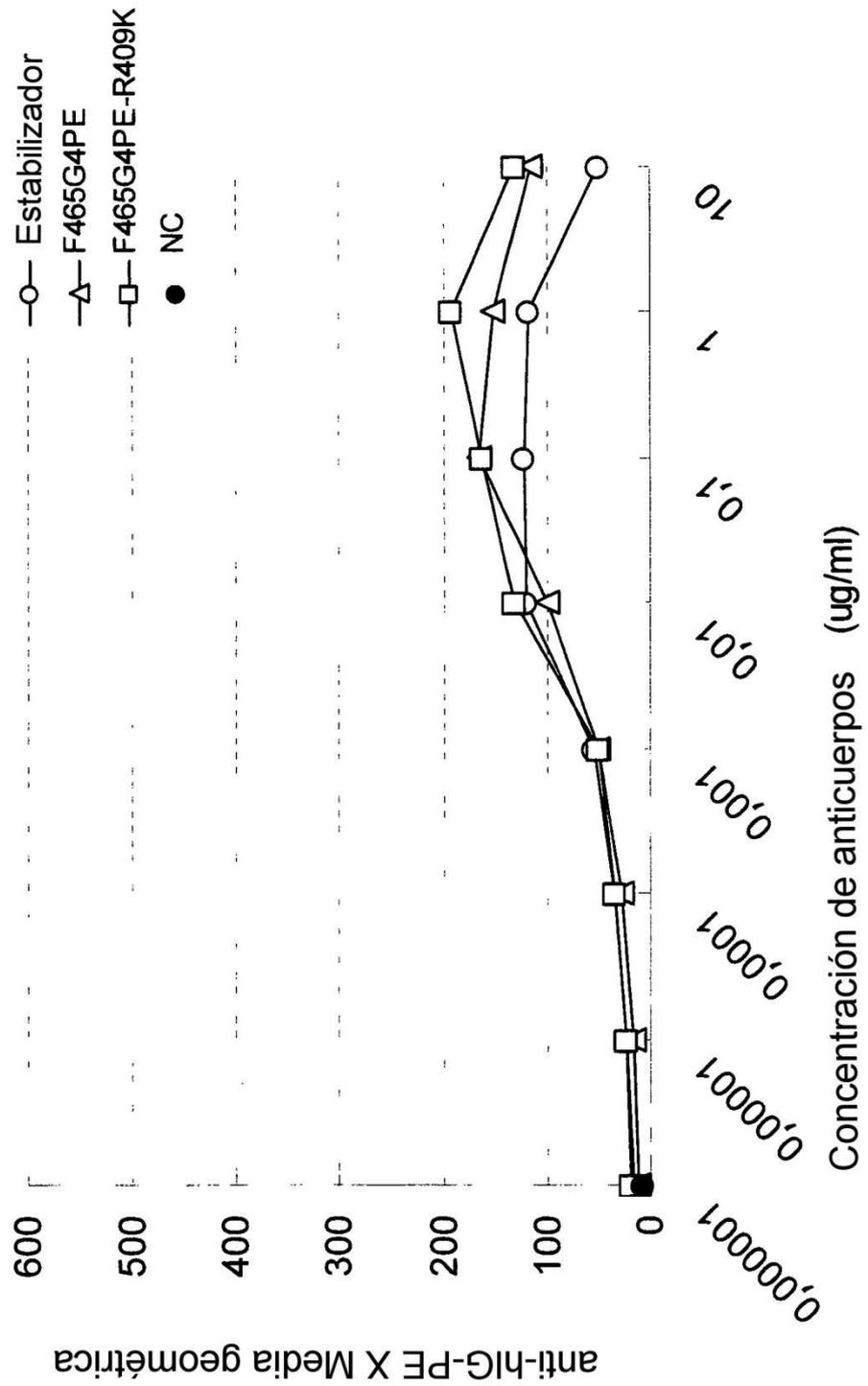


Fig. 2A

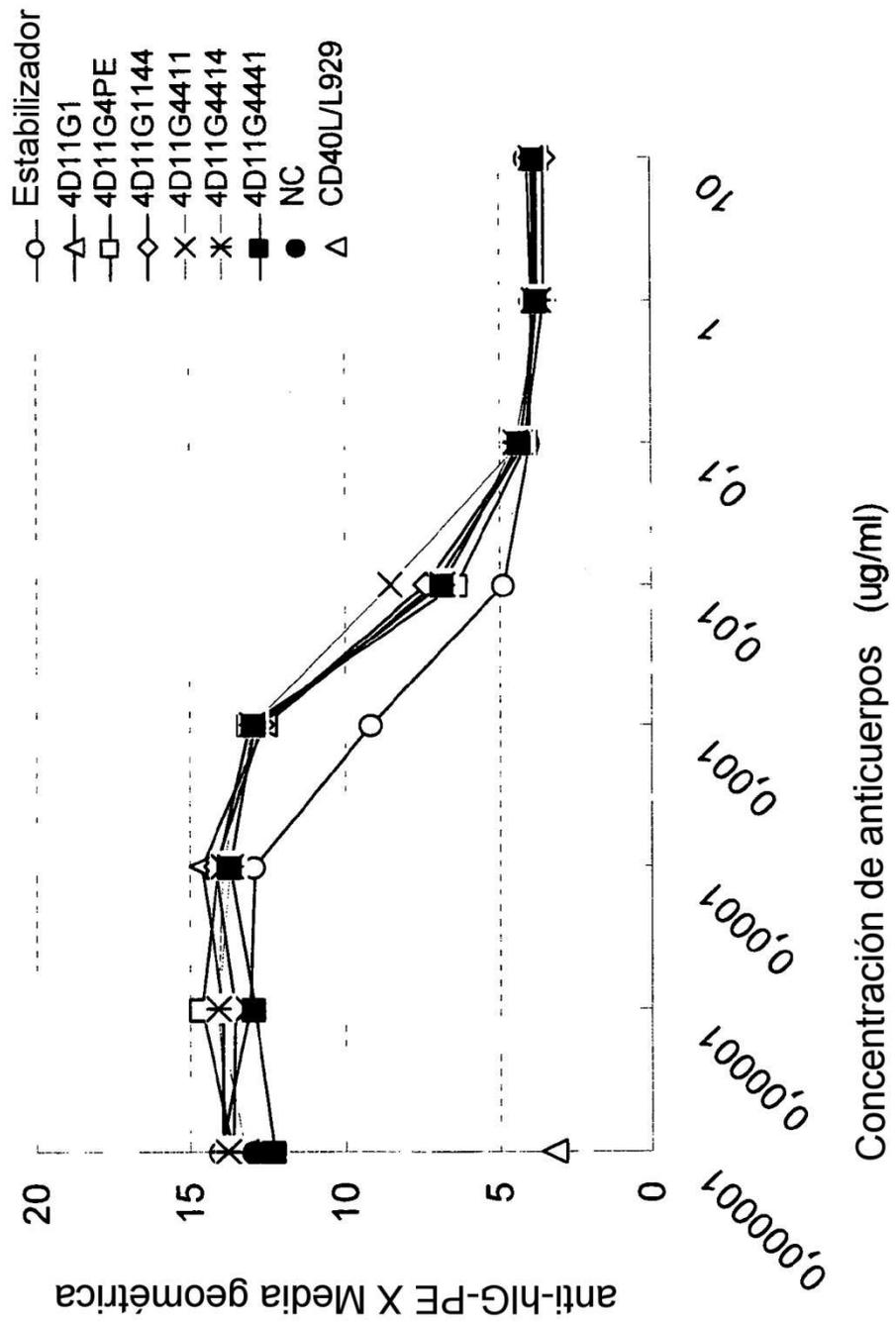


Fig. 2B

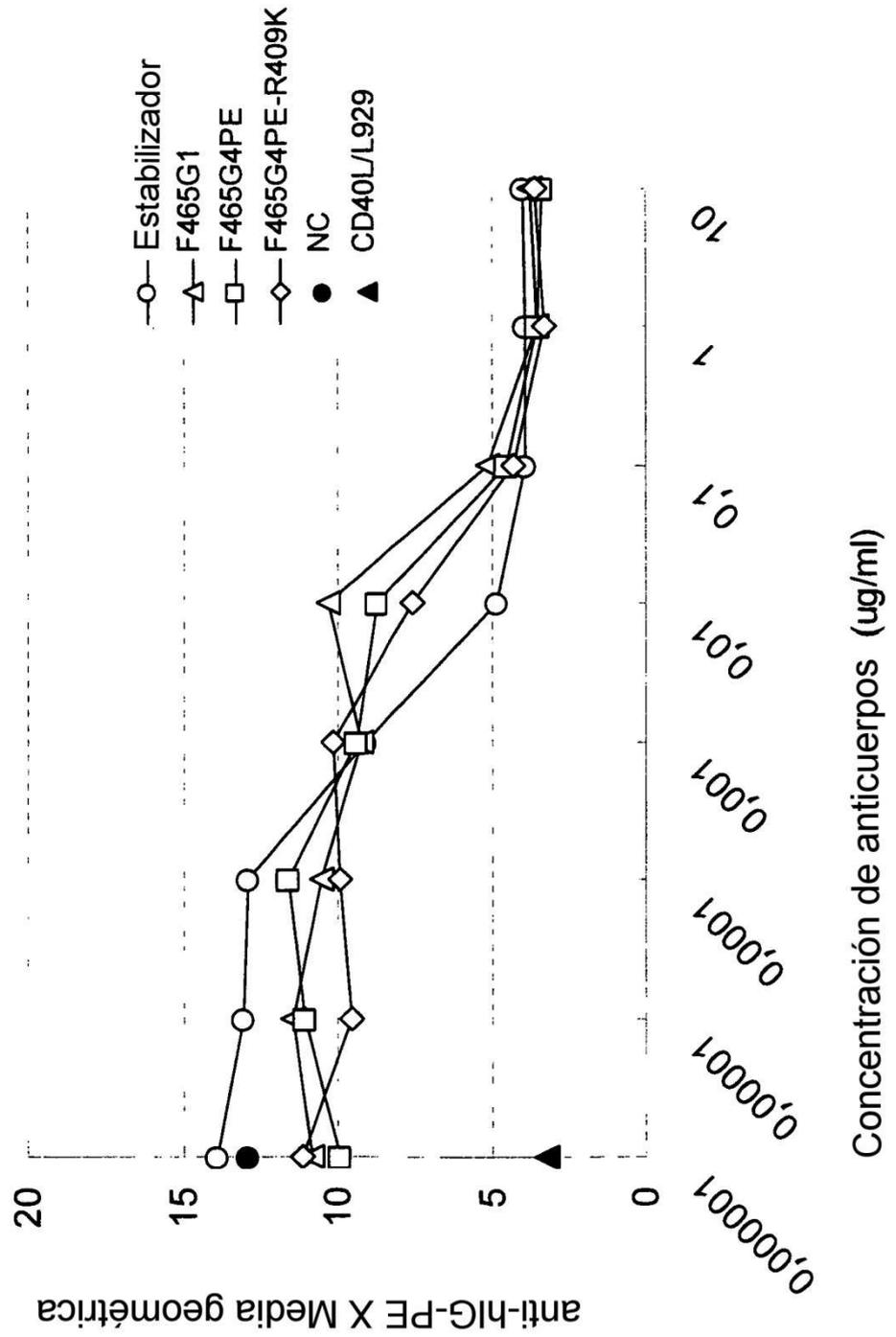


Fig. 2C

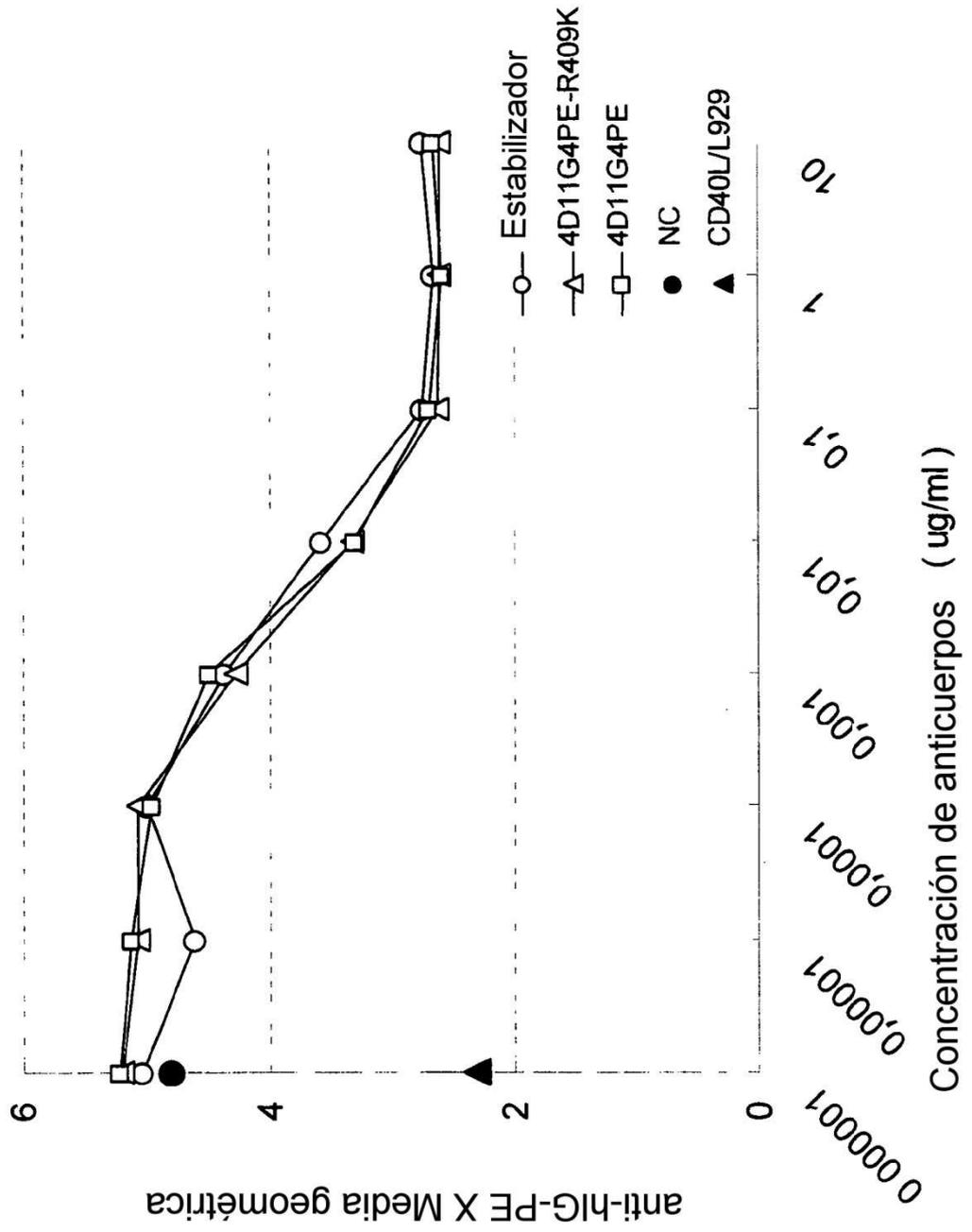


Fig. 2D

