

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 455**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04078136 .1**
96 Fecha de presentación: **11.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1600460**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.11.2005**

54 Título: **Utilización de una sustancia activa que se une con la CD28 para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la B-CLL**

30 Prioridad:
11.11.2003 DE 10352900

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.11.2012

73 Titular/es:
THERAMAB LLC (100.0%)
8 STR. 1 NAUCHNY PROEZD
MOSCOW 117246, RU

72 Inventor/es:
HANKE, THOMAS

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 391 455 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

Utilización de una sustancia activa que se une con la CD28 para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la B-CLL

Sector del invento

El invento se refiere a la utilización de una sustancia activa para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la leucemia linfocítica crónica del tipo de células B (B-CLL).

Antecedentes del invento y estado de la técnica

Para la comprensión del invento son importantes en primer lugar los siguientes antecedentes tecnológicos. La activación de las células T en reposo para la proliferación y la diferenciación funcional requiere primeramente la ocupación de dos estructuras superficiales, de los denominados receptores: 1. del receptor de antígenos, que posee una especificidad diferente de una célula a otra, y es necesario para el reconocimiento de antígenos, p.ej. de productos víricos de disociación; así como 2. de la molécula CD28, la cual se une de modo natural a unos ligandos situados sobre la superficie de otras células del sistema inmunitario y que es expresada de igual manera en todas las células T en reposo con la excepción de un subconjunto de las células T de CD8 de seres humanos. Se habla de una estimulación concomitante de la reacción inmunológica específica para antígenos por medio de la CD28. En un cultivo de células se pueden recrear estos procesos mediante la ocupación del receptor de antígenos así como de la molécula CD28 con unos adecuados anticuerpos monoclonales (mAb's). En el sistema clásico de la estimulación concomitante, ni la ocupación del receptor de antígenos ni la de la molécula CD28 a solas dan lugar a la proliferación de células T, pero la ocupación de los dos receptores es no obstante eficaz. Esta observación se realizó en células T de un ser humano, de un ratón y de una rata.

Por el contrario, se conocen también unos mAb's específicos para la CD28, que pueden inducir la proliferación de células T sin ninguna estimulación concomitante. Una tal activación superagonista, es decir independiente de la ocupación del receptor de antígenos, de los linfocitos T en reposo mediante unos mAb's específicos para la CD28, es conocida a partir de la cita bibliográfica de Tacke y colaboradores, Eur. J. Immunol., 1997, 27:239-247. Conforme a ello, se describieron dos tipos de anticuerpos monoclonales específicos para la CD28 con diferentes propiedades funcionales: unos mAb's concomitantemente estimuladores, que estimulan concomitantemente la activación de células T en reposo solamente en el caso de una simultánea ocupación del receptor de antígenos; y unos mAb's superagonistas, que pueden activar la proliferación de linfocitos T de todas las clases *in vitro* y en un animal de ensayo sin ninguna ocupación del receptor de antígenos. A partir de las citas bibliográficas, el documento de patente alemana DE 197 22 888, el documento de solicitud de patente internacional WO 03/048194 A y el documento de solicitud de patente PCT/Alemania 03/00890 se conocen asimismo unos mAb's específicos para la CD28, que activan eficazmente a los linfocitos T tanto *in vitro* como también *in vivo* sin ninguna estimulación de los TCR (receptores de linfocitos T), es decir que actúan de un modo "superagonista". Estos mAb's, y en cualquier caso los que están dirigidos contra la CD28 humana, son designados también como superMAB's.

La leucemia linfática crónica de la serie de células B (la leucemia linfocítica crónica del tipo de células B, B-CLL), con una incidencia de 3/100.000 habitantes, constituye la leucemia más frecuente de la edad adulta (Landis y colaboradores, 1999). La enfermedad se caracteriza por una acumulación progresiva de linfocitos B monoclonales malignos en la sangre, en los nódulos linfáticos, en el hígado y en la médula ósea. Con la progresión de la enfermedad se llega a un aumento del número de linfocitos en la sangre, a un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos, del hígado y del bazo, así como a una anemia y una trombocitopenia (Caligaris-Cappio, 2000; Rozman y Montserrat, 1995). Hoy en día no es posible realizar una terapia curativa de la B-CLL.

Entre las complicaciones principales en el caso de la B-CLL se cuentan ciertas infecciones, de las que son responsables, entre otros, los defectos de células T o respectivamente unos pequeños números de células T, observados en muchos pacientes (Cantwell y colaboradores, 1997; Scrivener y colaboradores, 2003).

Una función restringida se puede encontrar por lo demás también en el caso de las células tumorales propiamente dichas. Así, está restringida masivamente la propiedad de las células B de la B-CLL, de actuar como unas células presentadoras de antígenos (APZ) y por consiguiente de ser reconocidas y eliminadas por las células T específicas para tumores. Esto se debe, entre otras cosas, a que las células B de la B-CLL no expresan, o expresan sólo de un modo insuficiente, a los ligandos naturales de la CD28 CD80 (= B7.1) y CD86 (= B7.2) en su superficie celular. Por consiguiente, las células T potencialmente específicas para tumores sólo reciben una única señal acerca de la interacción entre el receptor de células T y el MHC + un antígeno tumoral, y no reciben la segunda señal concomitantemente estimuladora, que es necesaria para la activación plena. De un modo resumido, esto apunta al hecho de que al sistema inmunitario de pacientes de B-CLL no se le hace posible evidentemente eliminar por sus propios medios a las células tumorales.

Un enfoque para una forma de terapia tiene como meta mejorar la función como APZ's de las células B de la B-CLL y por consiguiente reforzar la respuesta inmunitaria anti-tumoral del paciente. A este fin, diversos grupos de trabajo

intentaron activar deliberadamente a las células B de la B-CLL y por consiguiente inducir la expresión de los ligandos concomitantemente estimuladores. En este caso, mediante una transferencia génica, se consiguió expresar en las células B de la B-CLL, unos ligandos de la CD40 (CD40L) que estimulan a las células B, y hacer posible de esta manera la interacción entre los CD40L y la proteína CD40 que está presente en todas las células B (inclusive las células B de la B-CLL). La señal transmitida por medio de la CD40 al interior de la célula condujo a la expresión deseada de los ligandos concomitantemente estimuladores CD80 y CD86 (Kato y colaboradores, 1998; Wendtner y colaboradores, 2002). Las células de leucemia modificadas de esta manera pudieron actuar por fin realmente de una manera más eficaz como APZ's y fueron eliminadas por fin también - primeramente *in vitro* - por células T autólogas (Kato y colaboradores, 1998). También era eficaz la transferencia génica *in vivo* de los CD40 L: Ésta condujo en los pacientes tanto a una elevación del número de células T como también a una reducción de las células leucémicas (Wierda y colaboradores, 2000). Este enfoque terapéutico no afecta sin embargo a los defectos de células T precedentemente aludidos de la enfermedad de B-CLL.

A continuación se indican los datos bibliográficos de la literatura científica precedentemente aludida.

Caligaris-Cappio, F., Rev Clin Exp Hematol 4, 5-21 (2000). Cantwell, M. y colaboradores, Nat Med 3, 984-989 (1997). Kato, K. y colaboradores, J Clin Invest 101, 1133-1141 (1998). Landis, S. H. y colaboradores, CA Cancer J Clin 49, 8-31 (1999). Rozman, C. y colaboradores, N Engl J Med 333, 1052-1057 (1995). Scrivener, S. y colaboradores, Leuk Lymphoma 44, 383-389 (2003). Wendtner, C. M. y colaboradores, Blood 100, 1655-1661 (2002). Wierda, W. G. y colaboradores, Blood 96, 2917-2924 (2000).

Problema técnico del invento

El invento se basa en el problema técnico de indicar una composición farmacéutica, con la que se pueda tratar la B-CLL, reforzándose simultáneamente de un modo general el sistema inmunitario debilitado de un modo condicionado por la enfermedad, en particular la inmunidad celular mediada por las células T.

Principios del invento y formas de realización preferidas

Para la resolución de este problema técnico, el invento enseña el objeto de la reivindicación 1.

El invento está basado en el reconocimiento de que con el empleo de los mAb's conformes al invento se da por así decir un doble golpe de efecto. Por un lado, son activadas o respectivamente expandidas las células T normales, que han sido reprimidas de un modo condicionado por la enfermedad. De esta manera, a veces unas infecciones con peligro mortal se pueden impedir o debilitar en el transcurso de la enfermedad. Simultáneamente, el sistema inmunitario propio del cuerpo es incitado a eliminar las células B de la B-CLL, que normalmente no son atacadas o tan sólo lo son débilmente por las células T específicas para tumores, lo que se consigue mediante el recurso de que las células B de la B-CLL son activadas para la presentación de un ligando concomitantemente estimulador, que normalmente no es expresado por ellas, con lo que las células T específicas para tumores, propias del cuerpo, que necesitan una tal señal, pueden atacar por fin eficazmente a las células B de la B-CLL.

Un mAb conforme al invento se puede producir, por ejemplo, inmunizando a un mamífero no humano con la CD28 o con una secuencia parcial de ésta, por ejemplo, con el bucle (en inglés loop) C'-D, siendo extraídas unas células a partir del mamífero no humano y siendo producidas a partir de estas células unas células de hibridoma, y siendo seleccionadas las células de hibridoma obtenidas de esta manera con la condición de que en su material sobrenadante del cultivo estén contenidos unos mAb's, que se unen de un modo superagonista con la CD28. No obstante, también se pueden emplear otros métodos usuales de la obtención de unos correspondientes mAb's, tales como, por ejemplo, la presentación sobre fagos (en inglés "phage display"), o ratones transgénicos con una Ig humana. Unos mAb's adecuados se pueden producir también mediante el recurso de que se seleccionan unos linfocitos B, que se unen de un modo superagonista con la CD28 o respectivamente a su bucle C'-D, y de que se clonan sus genes de inmunoglobulinas expresados. Para ICOS, CTLA-4 y PD1 es válido algo correspondiente.

Un mAb empleado conforme al invento se une con la CD28 o con una secuencia parcial de ésta. La secuencia parcial de la CD28 puede contener por ejemplo unas secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o 2 - 7, o 17, las cuales están situadas por lo menos parcialmente en la región del bucle C'-D de la CD28. Junto a una de las secuencias con un Val situado en el extremo 5' se puede(n) empalmar uno o varios aminoácidos de la secuencia 8 en el orden de sucesión allí definido. No obstante, el bucle se sitúa en la región con la secuencia GNYSQQLQLQVYSKTGF. La unión se puede efectuar, sin embargo, también a otras secuencias parciales de la región del bucle C'-D, para lo que de un modo complementario se remite a la definición de la región del bucle C'-D.

El mAb es obtenible por ejemplo a partir de unas células de hibridoma, tales como las que se han depositado bajo los números de DSM ACC2531 (mAb: 9D7 o respectivamente 9D7G3H11) o DSM ACC2530 (mAb: 5.11A o respectivamente 5.11A1C2H3). El mAb contiene de manera preferida una o varias de las secuencias SEQ ID NO: 9, 11, 13 y/o 15, o una o varias de las secuencias SEQ ID NO: 10, 12, 14 y/o 16, o una o varias de las secuencias 18 y/o 19, o unas secuencias homólogas con éstas.

Un mAb TGN1412 adecuado además dentro del marco del invento y que tiene unas propiedades mejoradas, contiene como región variable de la cadena pesada (VHC) la secuencia de aminoácidos de la Figura 9a, y como región variable de la cadena ligera (VLC) la secuencia de aminoácidos de la Figura 9b. Los péptidos directores (en inglés "leader peptides") indicados en las Figuras 9a y 9b son irrelevantes para la función del mAb, y solamente sirven para facilitar el paso de los anticuerpos a través de la membrana celular. Las variantes del terminal C, indicadas en las Figuras, no conducen a ninguna modificación de la función de los anticuerpos.

El invento es adecuado para un procedimiento destinado al tratamiento en particular de la B-CLL, o bien administrándose a un paciente una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo monoclonal superagonista empleado conforme al invento, adaptado galénicamente para una forma definida y aplicada de presentación, por ejemplo, una inyección i.v. (por vía intravenosa), o extrayéndose de un paciente un líquido corporal (= una suspensión de células), en particular sangre, que contiene linfocitos T y/o células precursoras de éstos, siendo mezclado el líquido corporal, eventualmente después de una etapa de elaboración del procedimiento, con un anticuerpo monoclonal superagonista empleado conforme al invento, o con un compuesto mimético de éste, y siendo el líquido corporal, tratado de esta manera, administrado de nuevo al paciente, por ejemplo, inyectado por vía i.v..

Puede recomendarse que, antes de la realización del tratamiento, se extraiga sangre de una persona enferma de B-CLL, se cultiven *in vitro* unas PBMC (células monocitarias procedentes de sangre periférica) contenidas en ella, se incuba el cultivo con un mAb empleado conforme al invento, y se determine la activación de células T y/o la eliminación o respectivamente la reducción del número de las células B de la B-CLL. En lo que respecta a unos posibles métodos de determinación se remite, a modo de ejemplo, a los Ejemplos de realización, pero por supuesto también son útiles otros métodos de determinación usuales en la especialidad y los agentes utilizados para ellos. Esto se puede realizar con un estuche de ensayo destinado a la comprobación de la eficacia terapéutica de un tratamiento prospectivo de la B-CLL con una composición farmacéutica conforme al invento, que tiene los siguientes componentes: i) unos medios para la cultivación *in vitro* de las PBMC, ii) una formulación que contiene unos mAb's conformes al invento en una dosis fisiológicamente eficaz, iii) unos medios para la determinación del número de las células T, o respectivamente para la activación de éstas y/o unos medios para la determinación del número de las células B de la B-CLL.

La dosis diaria administrada para la indicación de una B-CLL puede estar situada en el intervalo de 0,1 a 50, de manera preferida de 1 a 10, mg/kg de peso corporal.

El invento se refiere finalmente a un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5.

Definiciones:

Como "anticuerpos monoclonales (mAb)" se designan unos anticuerpos que son producidos por linajes de células híbridas (los denominados hibridomas), que han resultado típicamente mediante fusión de una célula B de procedencia animal o humana, productora de anticuerpos, con una adecuada célula tumoral de mieloma.

La secuencia de aminoácidos de la CD28 humana es conocida bajo el número de acceso (en inglés "Accession No.") NM_006139.

El bucle C'-D de la CD28 abarca los aminoácidos 43 hasta 70, en particular 52 hasta 66, de la secuencia precedente de la CD28 (acerca de la numeración véase también la cita de Ostrov, D.A., y colaboradores; Science (2000), 290:816-819). Por el concepto de "bucle C'-D" se deben de entender en lo sucesivo también unas arbitrarias secuencias parciales de éste. El concepto de "la región del bucle C'-D" abarca, adicionalmente al bucle C'-D o, en lugar del bucle C'-D, a unas regiones contiguas espacialmente de la CD28. Éstas son, de acuerdo con la numeración precedentemente mencionada, en particular los aminoácidos 78 (Tyr) hasta 87 (Thr).

Un bucle o respectivamente un sitio de unión dispuesto dentro de éste, es libremente accesible cuando para un partícipe definido en la unión no se presente ningún impedimento para el sitio de unión en el bucle por parte de las secuencias o moléculas que siguen a continuación del bucle.

Por el concepto de "activación y/o expansión de células T" se designa a la multiplicación de la actividad metabólica, al aumento del volumen de las células, a la síntesis de unas moléculas importantes inmunológicamente, tales como un ligando de CD 40, y a la entrada en la división celular (la proliferación) como respuesta a un estímulo externo. Como resultado, después de la activación o respectivamente de la expansión, están presentes más células T que antes.

El concepto de "homología" designa a una identidad entre las secuencias en el plano de las proteínas de por lo menos un 70 %, de manera preferida de por lo menos un 80 %, de manera sumamente preferida de por lo menos un 90 %, uniendo una proteína homóloga o un péptido homólogo a un definido partícipe en la unión que tiene por lo menos la misma afinidad. Unas desviaciones en la secuencia pueden ser supresiones, sustituciones, inserciones y elongaciones.

El concepto de los "mAb's" abarca, junto a las estructuras con la constitución Fab/Fc usual, también unas estructuras que se componen exclusivamente del fragmento Fab. También es posible aprovechar solamente la región variable, siendo unido el fragmento de las cadenas pesadas con el fragmento de la cadena ligera de un modo adecuado, por ejemplo, también mediante unas moléculas de puente sintéticas. El concepto de los "anticuerpos" abarca también unos anticuerpos quiméricos (eventualmente completos) así como humanizados por medios de tecnología genética.

El concepto de "estimulación superagonista de la proliferación de células T específicas para la CD28", significa que no es necesaria ninguna estimulación concomitante, es decir que, junto a una unión de un mAb o de un compuesto mimético con la CD28, no es necesario ningún otro suceso adicional de unión para la estimulación o inhibición de la proliferación.

En lo sucesivo se ilustra más detalladamente el invento solamente con ayuda de unos Ejemplos que representan ciertas formas de realización.

Ejemplo 1: Un superMAB induce la expansión *in vitro* de células T de la B-CLL

En un primer experimento se aislaron unas células mononucleares periféricas (PMBC) a partir de la sangre de un paciente de B-CLL, y se cultivaron en cada caso 2×10^5 células en placas de microtitulación de 96 pocillos a 37°C o bien solamente en un medio o en presencia de un superMAB ($0,5 \mu\text{g/ml}$ en solución). Después de 4 días, se determinó el número total de células en la cámara de recuento de Neubauer. Además, las células se incubaron con anticuerpos monoclonales marcados por fluorescencia con una especificidad para la CD19 (marcadores de células B) y para la CD5 (expresados en células B de la B-CLL y en células T), y se analizaron en un aparato de FACS (acrónimo del inglés "Fluorescence Activated Cell Sorting" = clasificación de células activada por fluorescencia). La Figura 1 muestra un denominado análisis de borrones-puntos de transferencia (en inglés "dot-blot"). Cada borrrón representa una célula analizada y está localizado de una manera correspondiente a la expresión de la CD19 (eje de las x = abscisas) y de la CD5 (eje de las y = ordenadas). R1 marca la población de las células T (CD19-CD5+), y R2 marca la población de las células B de la B-CLL (CD19+CD5+). La Figura 1 muestra que un superMAB está en la situación de inducir una expansión masiva de las células T de la B-CLL. Mientras que en las tandas "ex vivo" y "en un medio" las células T sólo constituyen un 3 % o respectivamente un 8 % de la población total, esta proporción aumentó hasta un 47 % en las células tratadas con un superMAB. El análisis de los números totales de células mostró que en este caso se trata de una multiplicación no sólo relativa sino también absoluta de las células T. Partiendo de 6×10^3 células T/pocillo (ex vivo) o respectivamente de $1,1 \times 10^4$ células T/pocillo (en un medio), la adición del superMAB al cultivo condujo a un aumento de $7,4 \times 10^4$ células T/pocillo. En los cultivos con el superMAB no sólo se pudo evitar una proliferación de las células tumorales, sino también que se pudo alcanzar incluso una reducción del número de estas células en aproximadamente un 50 %.

En otros experimentos se investigó seguidamente si la expansión de las células T, inducida por superMAB, va acompañada también de modificaciones cualitativas y en último término si también puede reforzar a la respuesta inmunitaria en pacientes de B-CLL.

Ejemplo 2: Un superMAB induce la expresión del ligando de la CD40 estimulador de las células B en la superficie de células T de la B-CLL

En experimentos anteriores ya se pudo mostrar que el superMAB está en la situación de inducir la expresión del ligando de CD40 estimulador de las células B. Interesaba entonces, si esto también es posible en el caso de células T de pacientes de B-CLL y por consiguiente si a través de una interacción entre los CD40L y la CD40 pueden ser activadas las células B de la B-CLL (véase más arriba). Tal como se había descrito más arriba, las PBMC's de un paciente de B-CLL se cultivaron en presencia o ausencia del superMAB, y después de un día, se tiñeron con un anticuerpo marcado por fluorescencia con una especificidad para los CD40L. La Figura 2 muestra un denominado histograma, en el que se ha registrado la expresión de los CD40L en las células T (eje de las x: puesto que en el caso de las PBMC's se trata de un cultivo mixto, las células T fueron circunscritas mediante una denominada "puerta electrónica") en función del número de células (eje de las y). En comparación con unas células, que sólo habían sido cultivadas en un medio, las células T procedentes del cultivo tratado con el superMAB muestran una expresión manifiestamente más fuerte de los CD40L. Por consiguiente, se proporcionan fundamentalmente las premisas para que las células T, que expresan ahora los CD40L, puedan interactuar con la CD40 en las células B de la B-CLL, y que por consiguiente puedan inducir la expresión de ligandos concomitantemente estimuladores en estas células.

Ejemplo 3: Un superMAB induce la expresión del ligando concomitantemente estimulador B7.2 en células B de la B-CLL

Unas PBMC's de un paciente de B-CLL fueron cultivadas tal como se ha descrito más arriba, y después de 4 días fueron teñidas con anticuerpos monoclonales marcados por fluorescencia con una especificidad para los B7.1 y B7.2. Los histogramas en la Figura 3 muestran la expresión de estas dos proteínas en las células B de la B-CLL: Mientras que el superMAB inducía sólo moderadamente al B7.1 en estas células (histograma a), él sí que podía aumentar drásticamente la expresión del B7.2 (histograma b). Con el fin de poder demostrar que la inducción del

B7.2 es la consecuencia de la expresión, mostrada en la Figura 2, de los CD40L en células T tratadas con el superMAB, en una tanda adicional se añadió a los cultivos un anticuerpo bloqueador (10 µg/ml) con una especificidad para los CD40L. Como consecuencia de su capacidad para bloquear la interacción entre los CD40L y la CD40, debería impedirse por consiguiente también la inducción del B7.2 en células B de la B-CLL. La expresión drásticamente reducida del B7.2 en las células tratadas de esta manera (histograma d) muestra realmente que la inducción del B7.2 en células B de la B-CLL es impedida por medio del bloqueo de los CD40L. Este resultado aporta por consiguiente la demostración indirecta de que las células T que expresan los CD40L y que han sido activadas por el superMAB, interactúan con la CD40 sobre la superficie de células B de la B-CLL, y que pueden inducir con ello la expresión de proteínas concomitantemente estimuladoras.

Ejemplo 4: Un superMAB mejora la función presentadora de antígenos de células B de la B-CLL (cultivo mixto de linfocitos alogenos)

La pregunta decisiva, acerca de si la expresión de ligandos concomitantemente estimuladores en las células B de la B-CLL va acompañada también por una mejorada función presentadora de antígenos, sólo puede ser explicada mediante ensayos funcionales: En el caso del cultivo mixto de linfocitos, unas células T de una persona (células respondedoras) son cultivadas conjuntamente con unas denominadas células estimuladoras. En el caso de las células estimuladoras se trata de unas células tratadas con mitomicina C de una segunda persona no emparentada con la otra (= donante alogeno), que se desvía en el patrón de expresión de los genes del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) por la primera persona. Las células T reconocen a las proteínas MHC ajenas en común con unos ligandos concomitantemente estimuladores sobre la superficie de las células estimuladoras y son incitadas a la proliferación (debido al tratamiento con mitomicina C, las células estimuladoras ya no se pueden dividir). Después de cuatro días, se mide la proliferación de las células T mediante la incorporación de 3H-timidina (véase la Figura 6). Para la respuesta de esta pregunta se aislaron unas PBMC's de pacientes de B-CLL y se cultivaron en un medio o con un superMAB (véase más arriba). Después de cuatro días, las células B de la B-CLL fueron aisladas a partir de estos cultivos mediante una separación magnética, fueron incubadas con mitomicina C (60 µg/ml) durante 1 h a 37°C, y sirvieron entonces como células estimuladoras en el subsiguiente cultivo mixto de linfocitos: Para esto, 1×10^4 células estimuladoras fueron cultivadas durante cinco días con 4×10^4 células T de un donante alogeno (= células respondedoras), y se midió la proliferación de las células T mediante la incorporación de 3H-timidina durante las últimas 16 h (véase la Figura 6). La Figura 4 muestra que unas células B de la B-CLL no tratadas previamente con un superMAB (tandas en un medio/ex vivo) pueden provocar una proliferación solamente muy débil de las células indicadoras, que se pudo aumentar manifiestamente, es decir por lo menos en un factor de 2, mediante la adición del superMAB (tanda con superMAB). Mediante una adición de anticuerpos monoclonales bloqueadores con una especificidad para los B7.1 y B7.2 (en cada caso 5 µg/ml; tanda con superMAB + anti CD80/86) se pudo reprimir la proliferación hasta llegar casi al nivel de las células tratadas previamente en un medio. Recopilando, estos resultados sugieren sacar la conclusión de que el superMAB mejora la función presentadora de antígenos de las células B de la B-CLL mediante inducción de las proteínas concomitantemente estimuladoras B7.1 y B7.2.

Ejemplo 5: Un superMAB mejora la función presentadora de antígenos de células B de la B-CLL (cultivo mixto de linfocitos autólogos)

El objetivo de la inmunoterapia en el caso de los pacientes de B-CLL consiste, a través del mejoramiento de la función presentadora de antígenos de las células B de la B-CLL, en activar a unas células T autólogas (es decir propias del cuerpo), que son específicas para el tumor, y poner a éstas por consiguiente en la situación de eliminar a las células tumorales (es decir las células B de la B-CLL). Con ayuda del denominado cultivo mixto de linfocitos autólogos se examinó la pregunta de si el superMAB posee propiedades a este respecto. Con este fin se aislaron de nuevo unas PBMC's de un paciente de B-CLL y se cultivaron en el medio o respectivamente en presencia de un superMAB. El análisis por FACS mostró también en este experimento una inducción del B7.1 y sobre todo del B7.2 en las células B de la B-CLL tratadas con un superMAB. Después de tres días, las células B de la B-CLL se aislaron a partir de estos cultivos mediante una separación magnética, se trataron con mitomicina C y se emplearon luego como células estimuladoras presentadoras de antígenos en el subsiguiente cultivo mixto de linfocitos autólogos: 1×10^4 células estimuladoras se cultivaron con 1×10^5 células T autólogas (= células respondedoras) en presencia de la citocina interleucina 2, con el fin de responder a las siguientes preguntas (véase la Figura 7).

¿Las células B de la B-CLL procedentes de la tanda con un superMAB están en la situación de activar a las células T autólogas y estimularlas a la proliferación? Como sistema de ensayo sirvió en este caso la incorporación de 3H-timidina: Resultado: En comparación con las tandas en un medio/ex vivo, mediante el tratamiento previo con un superMAB se pudo aumentar en un factor de 4 la proliferación de las células T autólogas (Figura 5a).

¿Pueden las células T activadas de esta manera producir la citocina interferón gamma? El interferón gamma es producido, entre otras, por unas denominadas células T efectoras. A las células T efectoras pertenecen también los linfocitos T citotóxicos, que están en la situación de eliminar a las células tumorales. La concentración de interferón gamma en el material sobrenadante del cultivo de células se determinó mediante un ELISA (= ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Resultado: Mientras que en las tandas en un medio/ex vivo prácticamente no se

produjo nada de interferón gamma, las células T respondedoras procedentes de la tanda con superMAB pudieron evidentemente ser incitadas a la síntesis esta citocina (Figura 5b).

5 ¿Están las células T activadas en la situación de eliminar a células tumorales autólogas? Para la explicación de esta pregunta, en el día 8 del cultivo mixto de linfocitos se aislaron 3×10^4 células T respondedoras (= las células T efectoras en cuestión) y se cultivaron durante 3 horas con $1,5 \times 10^4$ células B de la B-CLL, recientemente aisladas (las células dianas). Después de esto, se efectuó la incubación con la proteína anexina V y con un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad para la CD19. Por medio de la anexina V, con la que está acoplado un colorante fluorescente, las células apoptóticas (esto es, unas células que han muerto como consecuencia de una muerte celular programada) se pueden analizar por citometría de flujo de paso. Una inducción efectuada mediante el tratamiento con un superMAB de las potentes células T efectoras, que son específicas para el tumor, y una muerte reforzada de las células tumorales, resultante a partir de esto, deberían repercutir, por lo tanto, en un aumento de los tantos por ciento de células positivas en cuanto a la anexina V en el análisis por FACS. Resultado: También en este ensayo la tanda con un superMAB mostró el mejor resultado: En las tandas en un medio/ex vivo se pudo teñir con anexina V aproximadamente un 12 % de las células diana (= células tumorales CD19+), y por el contrario, en la tanda con un superMAB se pudo teñir más de un 25 % (Figura 5c).

Es evidente que mediante el empleo de un superMAB es posible activar a las células T autólogas específicas para un tumor e inducir una eliminación eficaz de las células tumorales. Esto se debe de atribuir presumiblemente a una inducción de proteínas concomitantemente estimuladoras sobre la superficie de las células B de la B-CLL presentadoras de antígenos. El posible mecanismo se representa esquemáticamente en la Figura 8.

Ejemplo 6: Producción de un anticuerpo monoclonal TGN1412 conforme al invento

25 Seguidamente se describe la producción de un anticuerpo monoclonal TGN1412 conforme al invento, que se compone de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera respectivamente, indicadas en las Figuras 9a y 9b.

30 Las moléculas de ADN indicadas en las Figuras 9c y 9d se sintetizaron de un modo usual para un experto en la especialidad. Los ADNc's (cromosomales) obtenidos, que codifican en cada caso las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal tal como se ha indicado, fueron insertados en los plásmidos pLNOH y pLNOK. Acerca del modo de proceder en particular, de los plásmidos y de los sitios de corte, se remite a la cita bibliográfica de Norderhaug y colaboradores, Journal of Immunological Methods, 204:77-87 (1997).

35 Con los respectivos plásmidos se transformaron células E. coli. Las células E. coli transformadas se multiplicaron y los respectivos plásmidos se obtuvieron a partir de éstas a una mayor escala.

40 Con los respectivos plásmidos obtenidos, que contienen la información sobre los ADN para la cadena pesada o ligera completa, se transfectaron concomitantemente de una manera transitoria unas células COS7 y de una manera estable unas células CHO así como unas células NSO. La transfección concomitante se efectuó de un modo usual con lipofectamina (de Invitrogen) o Effectene (de Qiagen) según las respectivas prescripciones del fabricante.

45 Las células transfectadas obtenidas se cultivaron en un medio clásico de cultivo en incubadoras con CO₂ (con 5 % de CO₂) a 37°C en matraces con forma de T y en frascos rodantes. Las células transfectadas establemente, que expresan el anticuerpo intacto, se seleccionaron mediante una selección con G418 y con higromicina B. Los transformantes estables se subclonaron entonces y se cultivaron ulteriormente.

50 Los materiales sobrenadantes del cultivo de células con anticuerpos segregados se analizaron mediante ensayos de actividad, ensayos de unión (el análisis por FACS), la SDS-PAGE y la transferencia de borrón Western (en inglés "western blotting").

55 Para realizar la purificación, los materiales sobrenadantes del cultivo de células se condujeron a través de una columna cargada con la proteína A o la proteína G, con el fin de unirla específicamente con el anticuerpo deseado. Los anticuerpos unidos se eluyeron con un tampón de carácter ácido (glicina 0,1 M, de pH 3,0 - 3,4) y a continuación se neutralizaron con Tris 1 M (de pH 8,0). Los anticuerpos purificados de esta manera se dializaron frente a un tampón de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se concentraron según los requisitos eventualmente mediante una filtración a través de membranas. Los anticuerpos obtenidos se utilizaron entonces para ensayos de proliferación, para ensayos de actividad, para ensayos de unión (análisis por FACS en cuanto a la unión con células positivas con respecto a la CD28), el ELISA, la SDS-PAGE y la transferencia de borrón Western.

60

LISTA DE SECUENCIAS:

<110> TeGenero AG

5 <160> 19

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

10 <211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<400> 1

15 Val Tyr Ser Lys Thr Gly
1 5

<210> 2

20 <211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<400> 2

25 Tyr Ser Lys Thr
1

<210> 3

30 <211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<400> 3

35 Tyr Ser Lys Thr Gly
1 5

<210> 4

40 <211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<400> 4

45 Val Tyr Ser Lys Thr
1 5

<210> 5

50 <211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<400> 5

55 Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
1 5

<210> 6

60 <211> 7
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 391 455 T3

Asp Ile Gln Thr Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Gly Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly His Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<400> 11
 gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60

acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120

10

tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagat acagtggtag tactagctac 180

aatccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240

ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagagattgg 300

ccgcgaccga gctactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> artificial

15

<400> 12

ES 2 391 455 T3

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Trp Pro Arg Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13
 <211> 360
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<400> 13
 caggtccaac tgcagcagtc cggacctgag ctggtgaagc cggggacttc agtgaggatt 60
 tcttgcgagg cttctggcta caccttcaca agctactata tacactgggt gaaacagagg 120
 cctggacagg gacttgagtg gattggatyt atttatcctg gaaatgtcaa tactaactat 180
 aatgagaagt tcaaggacaa ggccacactg attgtagaca catcctccaa cactgcctac 240
 atgcagctca gcagaatgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtac aagatcacac 300
 tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggcgcagggga ccacgggtcac cgtctctca 360

10 <210> 14
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

15

ES 2 391 455 T3

<400> 14

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Ile Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Arg Met Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15

<211> 321

5 <212> ADN

<213> artificial

<400> 15

gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60

atcacttgcc atgccagtca aacatttat gtttggttaa actggtacca gcagaaacca 120

ggaeatattc ctaaactctt gatctataag gttccaacc tgcacacagg cgtcccatca 180

aggttagtg gcagtgatc tggaacaggc ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaactt atccgtacac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaaataaa a 321

10

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

15

ES 2 391 455 T3

<400> 16

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17

<211> 15

5 <212> PRT

<213> artificial

<400> 17

Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
1 5 10 15

10

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

15

<400> 18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un anticuerpo monoclonal (mAb) superagonista, que es específico para la CD28 expresada en células T, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la leucemia linfocítica crónica del tipo de células B (B-CLL).
- 10 2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, siendo producible el mAb inmunizando a un mamífero no humano con la CD28 o con una secuencia parcial de ésta, extrayéndose células del mamífero no humano y produciéndose células de hibridoma a partir de estas células, y seleccionándose las células de hibridoma así obtenidas con la condición de que en su material sobrenadante del cultivo estén contenidos unos mAb's, que se unen de un modo superagonista con la CD28.
- 15 3. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2,
siendo obtenible el mAb a partir de células de hibridoma, tales como las que se han depositado bajo los números DSM ACC2531 (mAb: 9D7 o respectivamente 9D7G3H11) o DSM ACC2530 (mAb: 5.11A o respectivamente 5.11A1C2H3), o
20 conteniendo el anticuerpo en la cadena pesada una secuencia de aminoácidos para la región variable de acuerdo con la Figura 9a (VHC) y en la cadena ligera una secuencia de aminoácidos para la región variable de acuerdo con la Fig. 9b (VLC), conteniendo las cadenas pesada y ligera de manera opcional adicionalmente las secuencias de aminoácidos indicadas respectivamente en las Figuras 9a y 9b para la región constante de la cadena pesada (CHC) y para la región constante de la cadena ligera (CLC) (en las variantes alternativas allí indicadas),
25 conteniendo la cadena pesada y la cadena ligera de manera opcional adicionalmente las secuencias de aminoácidos indicadas respectivamente en las Figuras 9a y 9b para el péptido director, estando compuestas la cadena pesada y la cadena ligera de manera preferida en cada caso a base de las secuencias de plena longitud representadas en las Figuras 9a y 9b (en las variantes alternativas del terminal de C, tal como se indica en las Figuras 9a y 9b).
- 30 4. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, estando la composición farmacéutica constituida galénicamente para la inyección por vía intravenosa i.v..
- 35 5. Procedimiento para la reducción de células B de la B-CLL y para la expansión de células T en un líquido que contiene células T normales, células B así como células B de la B-CLL, el cual se encuentra fuera del cuerpo.
realizándose que, mediante una interacción de las células T normales, presentes en el líquido, con un mAb superagonista específico para un receptor, que es por naturaleza un estimulador concomitante, en células T, a saber CD28, en reposo, las células T normales son activadas o respectivamente expandidas,
40 realizándose que, mediante una interacción de las células T de la B-CLL, presentes en el líquido, con el mAb superagonista, específico para la CD28, éstas son activadas y eventualmente expandidas para la expresión de un ligando de CD40,
realizándose que las células T de la B-CLL activadas o respectivamente expandidas, portadoras de ligandos de la CD40, inducen la expresión de la CD86 y/o la CD80 en las células B de la B-CLL, que llevan la CD40,
45 realizándose que unas células T autólogas, específicas para un tumor, son activadas o respectivamente expandidas de un modo concomitantemente estimulado por las células B de la B-CLL, que son portadoras de la CD86 y/o la CD80, y
realizándose que las células T específicas para un tumor, activadas, eliminan a las células B de la B-CLL.

FIG. 1

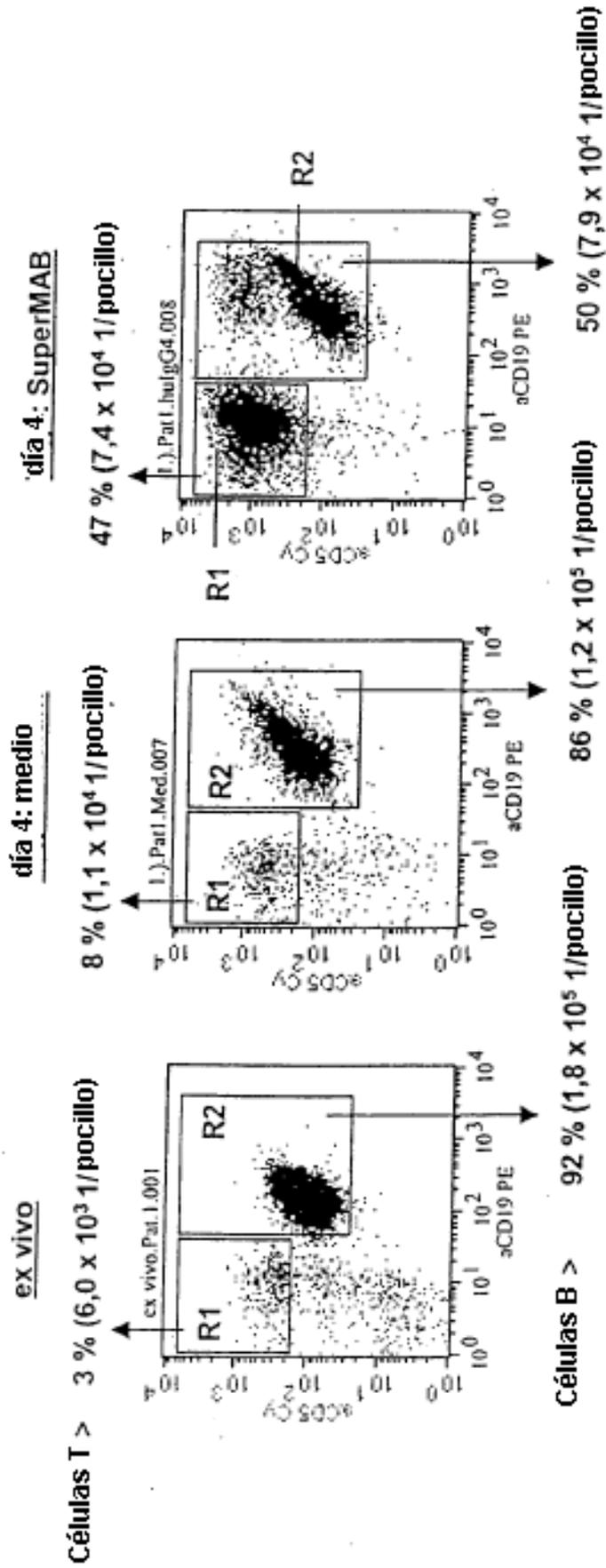


FIG. 2

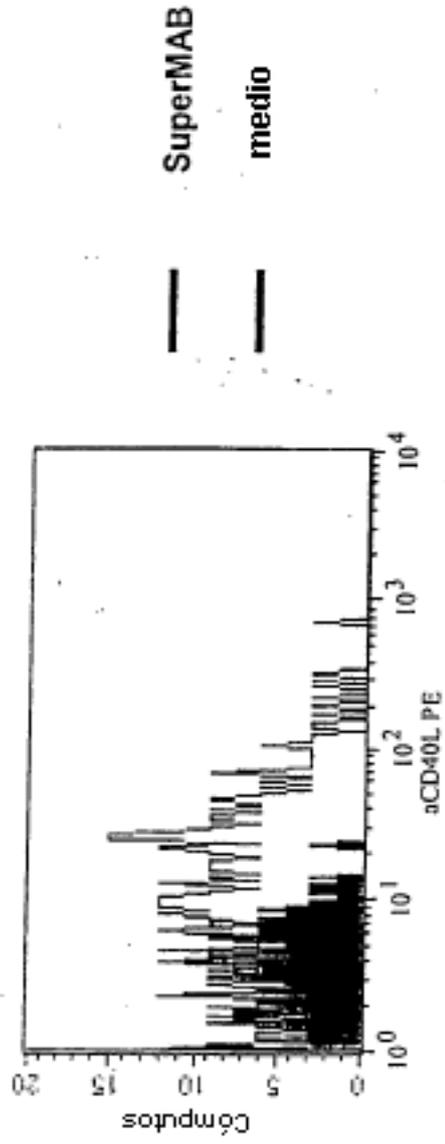


FIG. 3

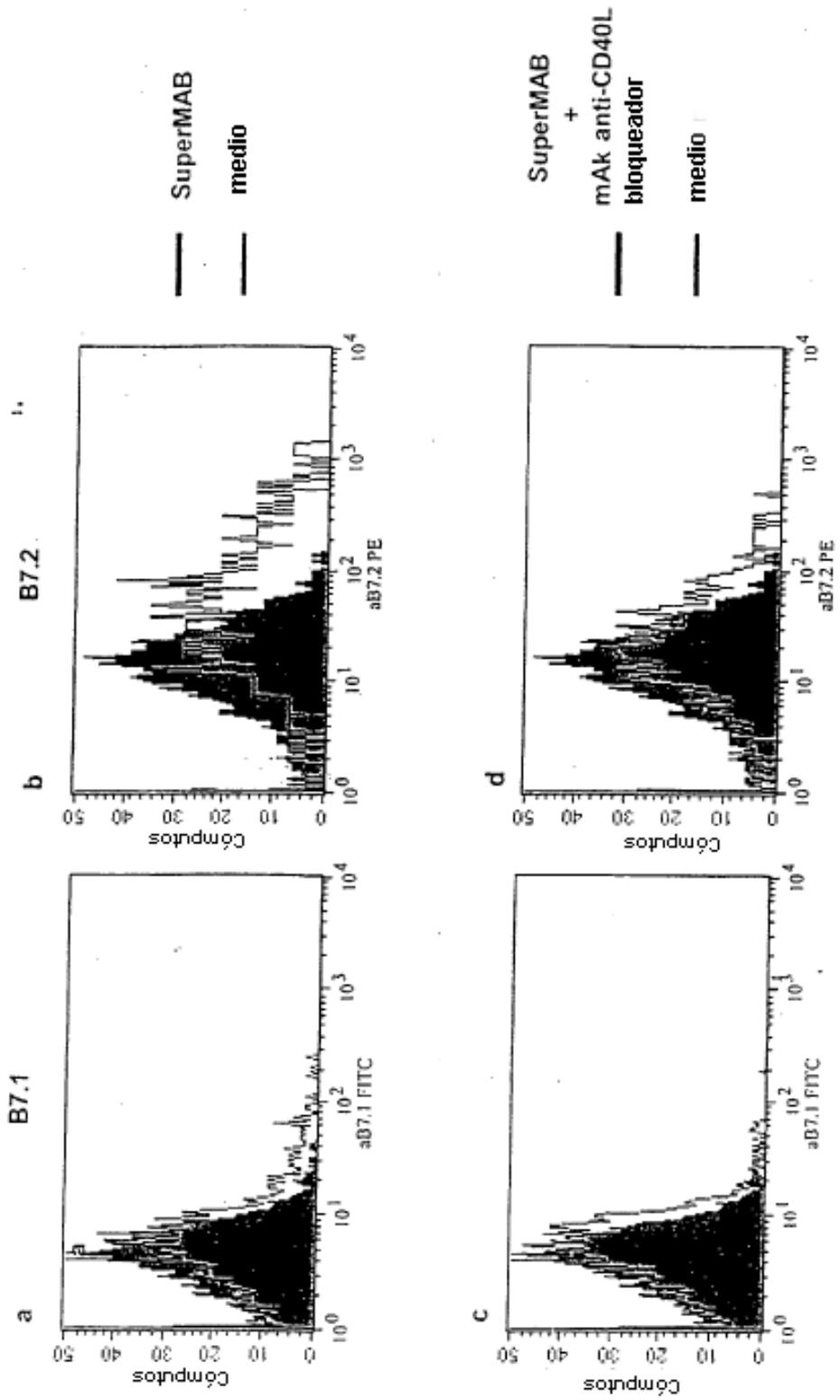
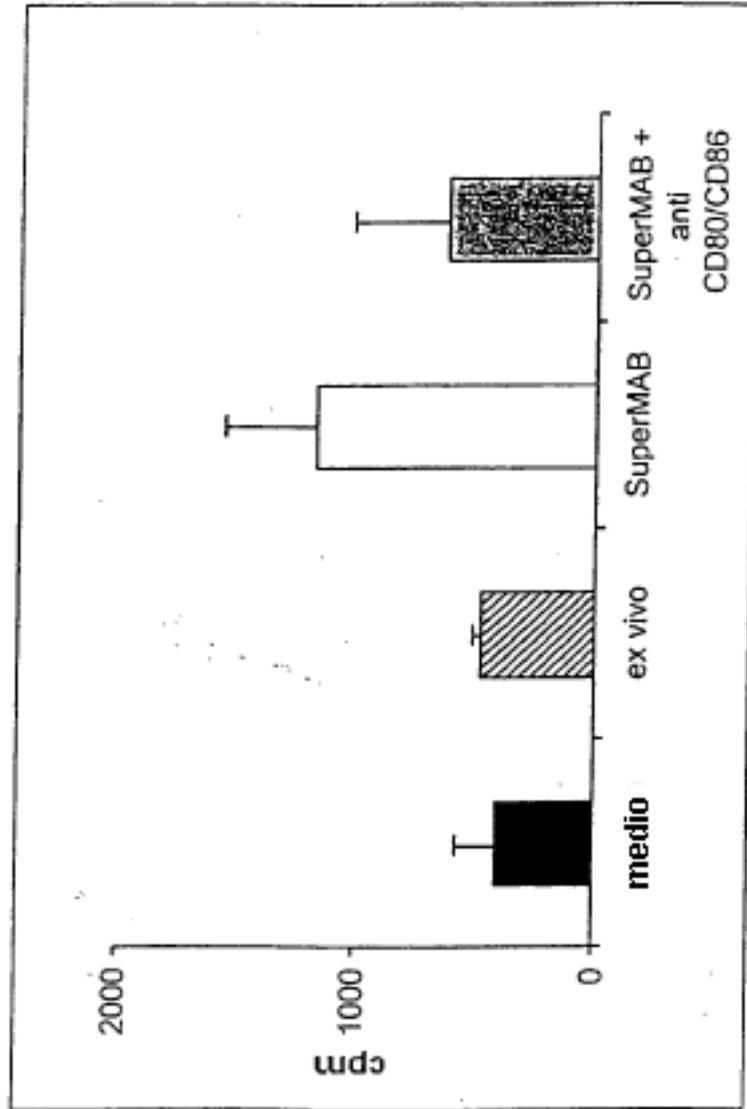


FIG. 4



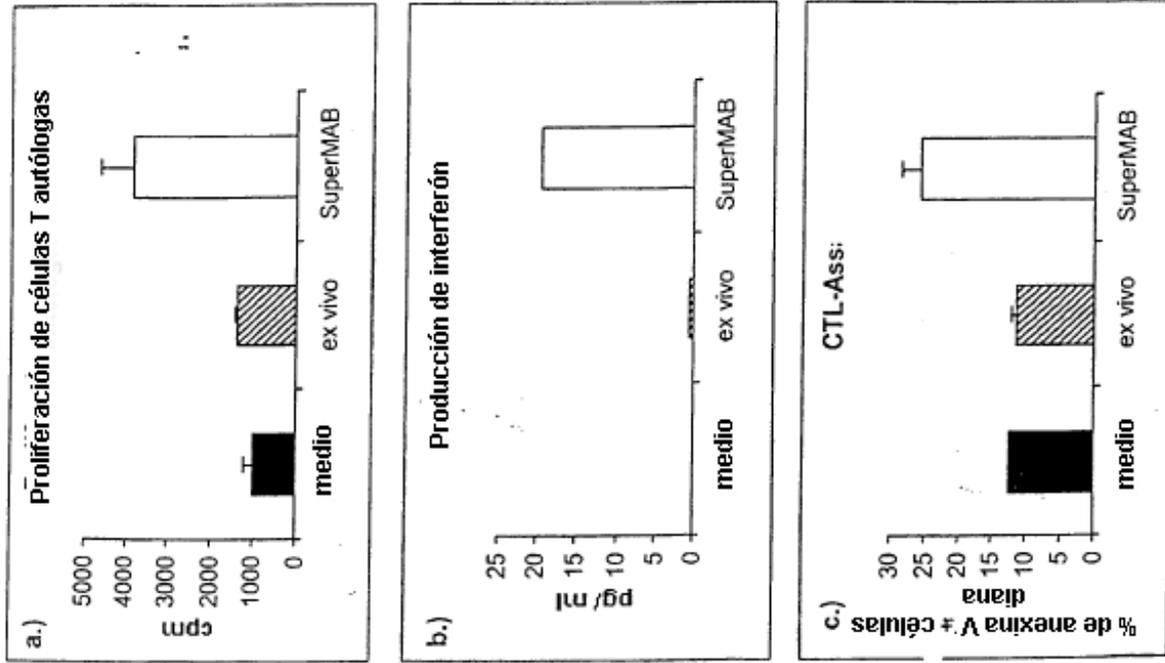
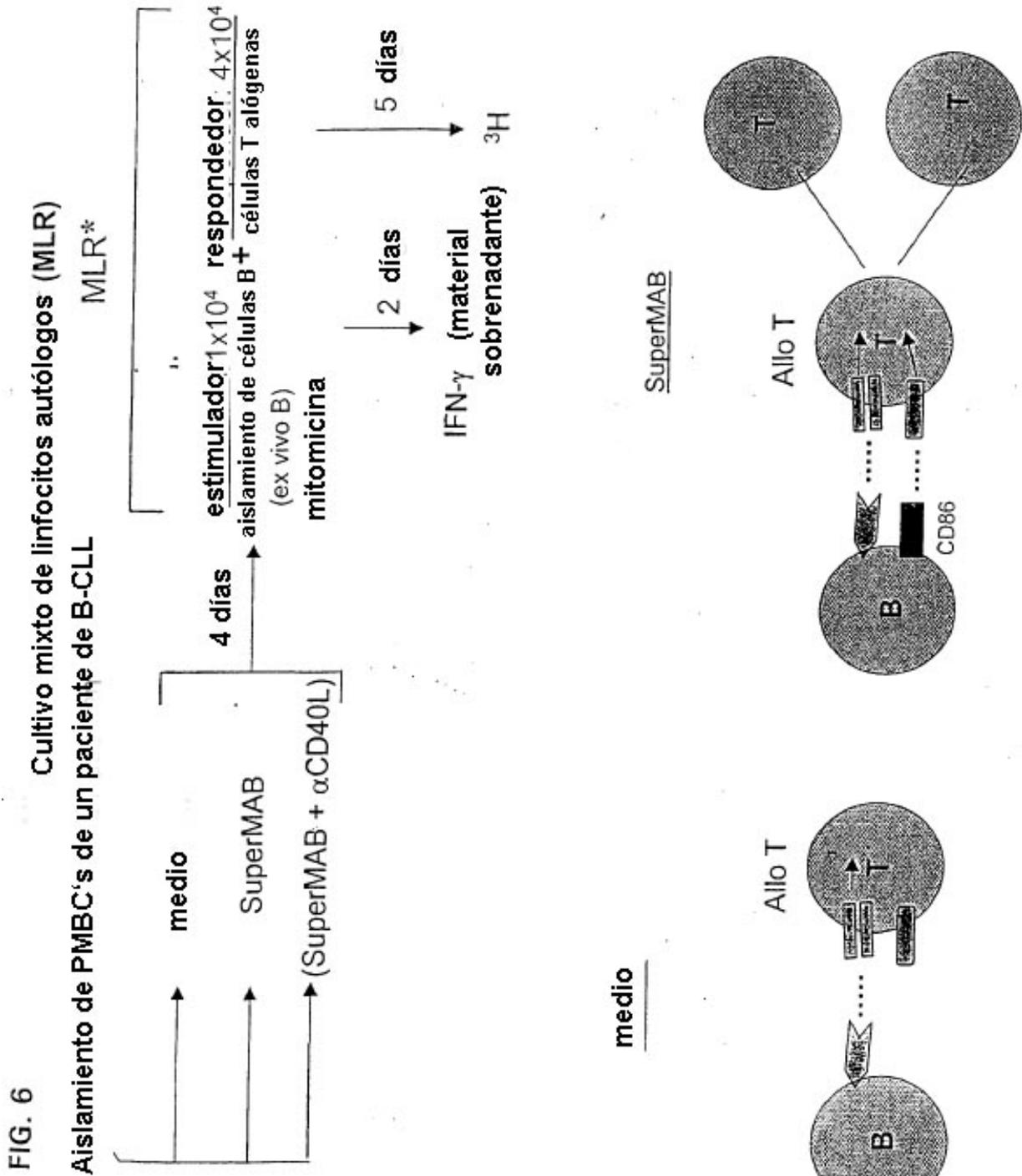


FIG. 5



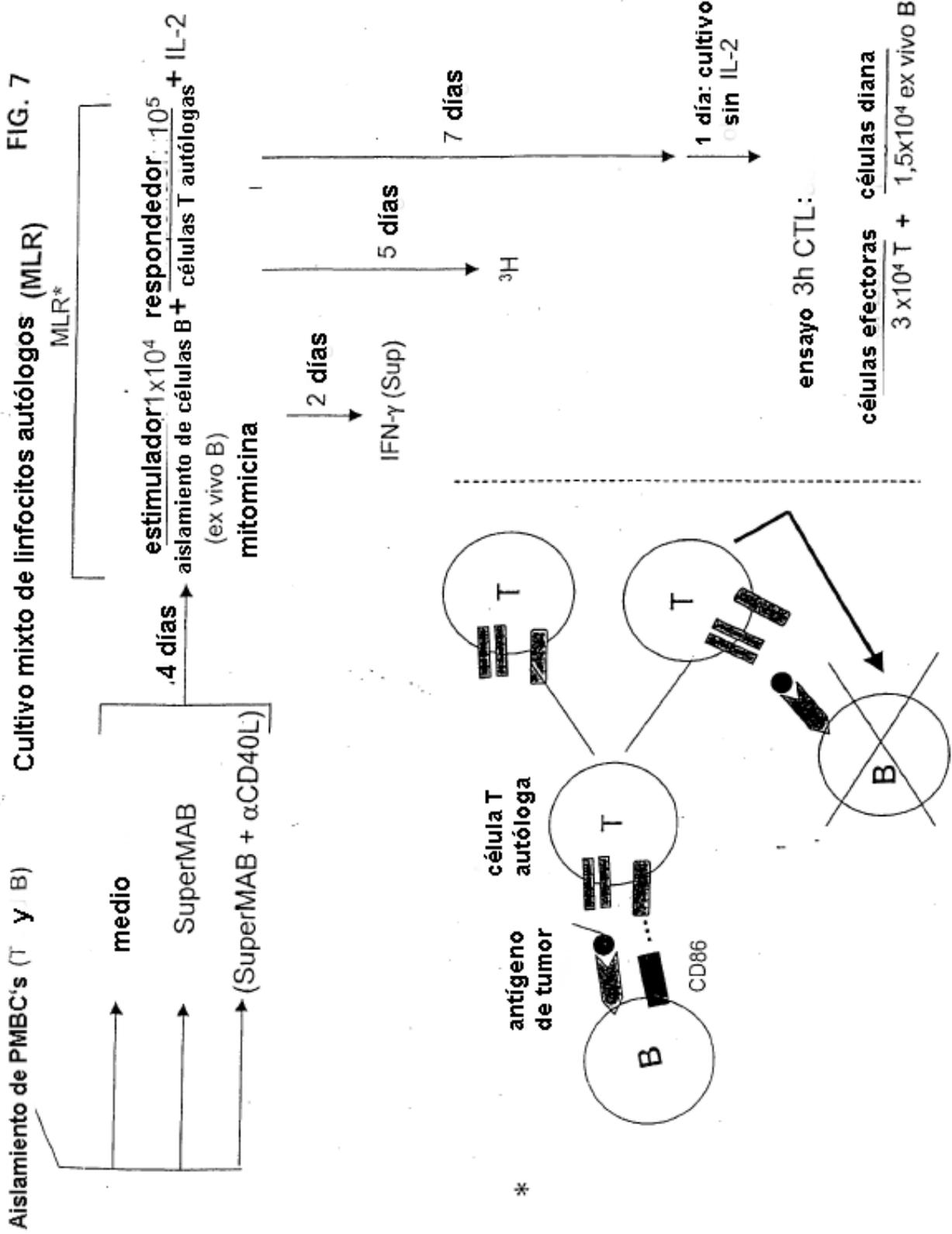
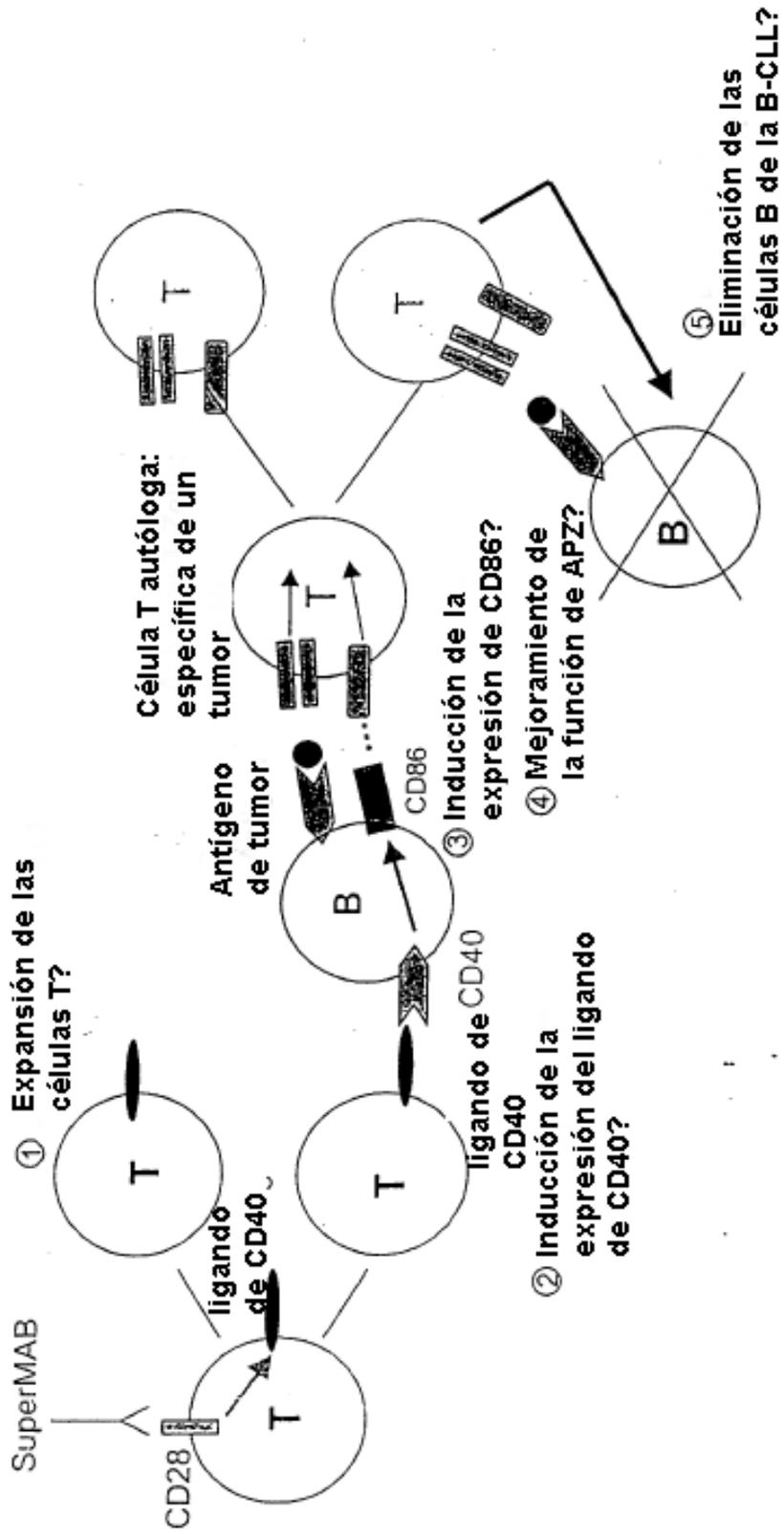
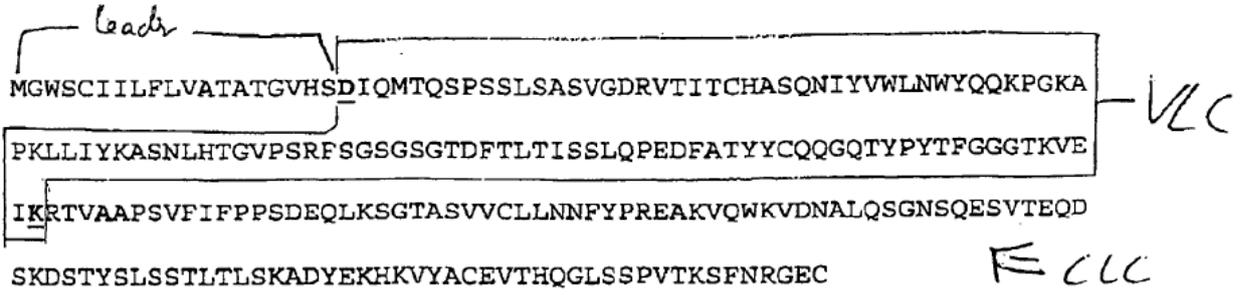


FIG. 8





Péptido director

MGWSCIIILFLVATATGVHS

5

Fig. 9b

Secuencia de ADN de la cadena pesada de TGN1412 inclusive intrones, UTRs y el péptido director

```

1 ggtaccgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag
61 ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggctctgg acatatatat gggtgacaat
121 gacatccact ttgcctttct ctccacagg gtgcattccc aggtgcagct ggtgcagct
181 ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca gtgaaggctc cctgcaaggc ttctggatac
241 acctcacca gctactatat aactgggtg cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg
301 attggatgta tttatcctgg aaatgtcaat actaactata atgagaagt caaggacagg
361 gccaccctga ccgtagacac gtccatcagc acagcctaca tggagctgag caggctgaga
421 tctgacgaca cggcctgtga tttctgtaca agatcaoaot acggcctcga ctggaacttc
481 gatgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctctcag gtgagtogta cgctagcaag
541 ctttctgggg caggccgggc ctgaecttgg ctggggggcag ggagggggct aagggtgacgc
601 aggtggcgcc agccagggtg acaccaatg cccatgagcc oagacactgg accctgcatg
661 gaccatcgcg gatagacaag aaccgagggg cctctgcgcc ctggggccag ctctgtccca
721 caccgcggtc acatggcacc acctctcttg cagcttccac caagggccca tccgtcttcc
781 ccctggcgcc ctgctccagg agcaectccg agagcacagc cgccctgggc tgctgggtca
841 aggactactt ccccgaaacc gtgaoggtgt cgtggaactc aggcgccttg accagcggcg
901 tgcacacctt cccggctgtc ctacagctct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga
961 ccgtgcctc cagcagcttg ggcaggaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca
1021 gcaacaccaa ggtggacaag agagttgggt agaggccagc acagggaggg aggggtgtctg
1081 ctggaagcca ggctoagoc tctgctctgg acgcaccccg gctgtgcagc cccagcccag
1141 ggcagcaagg catgccccat ctgtctctc acccggaggc ctctgaccac cccactcatg
1201 ctcagggaga gggctctctg gatttttcca ccaggtccg ggoagccaca ggttgatgc
1261 ccctaccca ggccctgccc atacaggggc aggtgctgcg ctcagacctg ccaagagcca
1321 tatccgggag gaccctgccc ctgacctaa cccaccccaa aggccaaact ctocactccc
1381 tcagctcaga caocttctct cctocagat ctgagtaact cccaatctt tetctgcaga
1441 gtccaaatat ggtcccccat gccatcatg cccaggtaag ccaaccagg cctcgccctc
1501 cagctcaagg cgggacagg gtccatagat agcctgcatc caggacagg cccagccgg
1561 gtgctgacgc atccacctc atctcttct cagcacctga gttctctggg ggaccatcag
1621 tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccggacc cctgagggtca
1681 cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag acccggagg ccagttcaac tggtagctgg
1741 atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agcccgggga ggagcagttc aacagcacgt
1801 accgtgtggt cagcgtctct accgtctctg accaggactg gctgaacggc aaggagtaca
1861 agtgaagggt ctccaacaaa ggcctccgt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca
1921 aagggtgggac ccacgggggtg cgagggccac atggacagag gtcagctcgg cccacctct
1981 gccctgggag tgaccgctgt gccaacctct gtccctacag ggcagccccg agagccacag
2041 gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggctag cctgacctgc
2101 ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
2161 gagaacaaot acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt ctctctctac
2221 agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg
2281 atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa
2341 tgagtgccag ggccggcaag ccccgcctcc ccgggctctc ggggtcgcgc gaggatgctt
2401 ggcagctacc ccgtctacat acttcccagg caccagcat ggaaataaag caccaccac
2461 tgcootgggc coctgtgaga otgtgatggt tctttccacg ggtcaggccg agtctgaggc
2521 ctgagtgaca tgagggaggc agagoggatc o

```

Pos. 21 atg: 1^{er} codón director Pos. 157 tcc: último codón director (director con intrón!)

5 Pos. 150 cag: 1^{er} codón de VHR Pos. 517 tca: último codón de VHR

Pos. 2338 aaa: último codón constante de IgG4

Pos. 2341 tga: interrupción

10

Fig. 9c

Secuencia de ADN de la cadena ligera de TGN1412 inclusive intrones, UTRs y el péptido director

```

1 ggtaccgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag
61 ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggctctgg acatatatat gggtgacaat
121 gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtgcattccg acatccagat gaccagctct
181 ccatectccc tgtctgcacg tgtaggagac agagtcacca tcacttgcca tggcagtcaa
241 aacatttatg tttggttaaa ctggatcag cagaaaccag ggaaagcccc taagtcctg
301 atctataagg cttccaacct gcacacaggg gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct
361 gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaaootg aagatthtgc aacttactac
421 tgtcaacagg gtcaaaacta tccgtacacg ttoggcggag ggaccaagggt ggagatcaaa
481 cgtgagtcgt acgctagcaa gcttgatate gaattctaaa ctctgagggg gtcggatgac
541 gtggcoatto tttgectaaa gcattgagtt tactgcaagg tcagaaaagc atgcaaagoc
601 ctcagaatgg ctgcaaagag otccaacaaa acaatttaga aotthatta ggaatagggg
661 gaagctagga agaaactcaa aacatcaaga ttttaaac gcttcttggg ctctctgcta
721 taattatctg ggataagcat gctgttttct gtctgtccct aacatgccct gtgattatcc
781 gcaaacaaca cacccaaggg cagaactttg ttacttaaac accatctctg ttgcttcttt
841 cctcaggaac tgtggctgoa ccactctgtt tcatcttccc gcoatctgat gagcagttga
901 aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcocaga gaggccaaag
961 tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc
1021 aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact
1081 acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcaaccatca gggcctgagc tgcgccgta
1141 caaagagctt caacagggga gagtgttaga gggagaagtg cccccacctg ctctctagtt
1201 ccagcctgac cccctcccat cctttggcct ctgacccttt ttcacagggg gacctacccc
1261 tattgaggtc ctccagctca tctttcacct cccccccctc ctctctcttg gctttaatta
1321 tgctaattgt ggaggagaat gaataaataa agtgaatctt tgcacctgtg gtttctctct
1381 ttctctattt aataattatt atctgttgtt ttaccaacta ctcaatttct ctataaggg
1441 actaaatatg tagtcatoot aaggcgcata aocatttata aaaatcctcc ttcattctat
1501 tttaccctat catcctctgc aagacagctc tccctcaaac ccacaagcct tctgtctca
1561 cagteccctg ggccatggta ggagagactt gcttctctgt tttccctcc tcagcaagcc
1621 ctcatagtcc tttttaaggg tgacaggtct taoagtcata tatcctttga ttcaattccc
1681 tgagaatcaa ccaaagcaaa ttctctgcagc ccgggggatc c

```

Pos. 21 atg: 1^{er} codón director Pos. 157 tcc: último codón director (director con intrón!)

5 Pos. 160 gac: 1^{er} codón de VLR Pos. 517 tca: último codón de VLR

Pos. 1164 tgt : último codón constante de kappa

Pos. 1167 tag: interrupción

10

Fig. 9d

15 **Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de TGN1412 inclusive los péptidos directores**