

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 292**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.1995 E 06013916 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1759709**

54 Título: **Anticuerpos humanizados contra la molécula de adhesión leucocitaria VLA-4**

30 Prioridad:

25.01.1994 US 186269

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.09.2013

73 Titular/es:

BIOPEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 Cambridge Center
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

BENDIG, MARY M.;
LEGER, OLIVIER J.;
SALDANHA, JOSE;
JONES, TARRAN S. y
YEDNOCK, THEODORE A.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 424 292 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados contra la molécula de adhesión leucocitaria VLA-4.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente a anticuerpos humanizados específicos para la subunidad α -a de la molécula de adhesión leucocitaria VLA-4.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La inflamación es una respuesta de los tejidos vascularizados a la infección o la lesión, y se efectúa mediante lesión de leucocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y su infiltración en los tejidos circundantes. En la inflamación normal, los leucocitos que se infiltran liberan mediadores tóxicos para exterminar a los organismos invasores, fagocitar los desechos y células muertas, y desempeñan un papel en la reparación tisular y a la respuesta inmunitaria. Sin embargo, en la inflamación patológica, los leucocitos infiltrantes son muy reactivos y pueden provocar un daño grave o mortal. Véase, *por ejemplo*, Kickey, *Psychoneuroimmunology II* (Academia Press 1990).

20 La unión de los leucocitos a las células endoteliales se efectúa vía una interacción específica de los ligandos y receptores de la superficie celular, sobre las células endoteliales, y los leucocitos. Véase, generalmente, Springer, *Nature* 346:425-433 (1990). La identidad de los ligandos y receptores varía para diferentes subtipos celulares, localizaciones anatómicas y estímulos inflamatorios. El receptor de superficie celular leucocitario VLA-4 se identificó en primer lugar por Hemler, documento EP 330.506 (1989) (incorporado en su totalidad como referencia a todos los efectos). VLA-4 es un miembro de la familia de β 1 integrinas de receptores de la superficie celular, cada uno de los
25 cuales comprende cadenas α y β . VLA-4 contiene una cadena α 4 y una cadena β 1. VLA-4 se une específicamente a un ligando de células endoteliales denominado VCAM-1. Véase Elices *et al.*, *Cell* 60:577-584 (1990) (incorporado en su totalidad como referencia a todos los efectos). Aunque el VLA-4 se detecto en primer lugar sobre células activadas de la vena umbilical humana, este ligando también se ha detectado en células endoteliales cerebrales. Véase la Solicitud, del mismo solicitante y en trámite junto con la presente, US serie nº 07/871.223 (incorporada en
30 su totalidad como referencia a todos los efectos).

Las moléculas de adhesión, tales como UVLA-4, son dianas potenciales para agentes terapéuticos. El receptor de VLA-4 es una diana particularmente importante debido a su interacción con un ligando que reside en las células endoteliales cerebrales. Las enfermedades y patologías que resultan de la inflamación cerebral tiene secuencias particularmente graves, por ejemplo, una de tales enfermedades, las esclerosis múltiples (MS), tiene una evolución crónica (con o sin exacerbación y remisiones), conduciendo a una discapacidad grave y a la muerte. La enfermedad afecta a una población estimada de 250.000 hasta 350.000 sólo en los estados unidos de América.

40 Los anticuerpos frente al receptor de VLA-4 se han ensayado para determinar su potencial antiinflamatorio tanto en modelos de animales *in vitro* como *in vivo*. Véase USSN 07/871.223 y Yednock *et al.*, *Nature* 356:63-66 (1992) (incorporado en su totalidad como referencia a todos los efectos). Los experimentos *in vitro* demuestran que los anticuerpos anti-VLA-4 bloquean la unión de los linfocitos a células endoteliales cerebrales. Los experimentos animales estudian el efecto de los anticuerpos anti-VLA-4 sobre animales que tienen una patología inducida artificialmente (encefalomiélitis autoinmunitaria experimental), que simula la esclerosis múltiple. Los experimentos
45 muestran que la administración de anticuerpos anti-VLA-4 evitan la inflamación del cerebro y la parálisis subsiguiente en los animales. De forma colectiva estos experimentos identifican anticuerpos anti-VLA-4 como agentes terapéuticos potencialmente útiles para tratar esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos inflamatorios.

50 Un problema significativo con los anticuerpos anti-VLA-4 disponible hasta la fecha es que son todos de origen murino, y por lo tanto tienen la probabilidad de provocar una respuesta anti-ratón humana (HAMA) en el uso clínico. Una respuesta HAMA reduce la eficacia de los anticuerpos de ratón en pacientes, y evita la administración continuada. Un enfoque a este problema es humanizar anticuerpos de ratón, en este enfoque, las regiones que determinan la complementariedad (CDR) y otros ciertos aminoácidos de regiones variables de un ratón donante se
55 injertan en regiones aceptoras variables humanas, y se unen a regiones constantes humanas. Véase, *por ejemplo*, Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1998); Winter, documento US 5.225.539 (1993) (cada uno de los cuales está incorporado en su totalidad como referencia a todos los efectos).

60 Aunque se han producido varios ejemplos de anticuerpos humanizados, la transición de un anticuerpo murino a un anticuerpo humanizado implica un compromiso de consideraciones que compiten entre sí, cuya solución varía con diferentes anticuerpos. Para minimizar la inmunogenecidad, la inmunoglobulina debe retener tanta secuencia aceptora humana como sea posible. Sin embargo, para retener propiedades de unión auténticas, la estructura de la inmunoglobulina debe contener suficientes sustituciones de la secuencia aceptora humana como para asegurar una conformación tridimensional de las regiones de CDR tan parecida como sea posible a aquella y la inmunoglobulina original del donante murino. Como resultado de estas consideraciones que compiten entre sí, muchos anticuerpos
65 humanizados producidos hasta la fecha muestran alguna pérdida de afinidad de unión en comparación con los

anticuerpos murinos correspondientes de los que derivan. Véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Shearman *et al.*, *J. Immunol.* 147:4366-4373 (1991); Kettleborough *et al.*, *Protein Engineering* 4: 773-783 (1991); Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4181-4185 (1991); Tempest *et al.*, *Biotechnology* 9:266-271 (1991).

5 Basándose en lo anterior, está claro que existe una necesidad de anticuerpos anti-VLA-4 humanizados que demuestren una fuerte afinidad por el receptor de VLA-4, a la vez que muestren poca, o ninguna, respuesta anti-ratón humana. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

10 Sumario de la invención

La invención proporciona inmunoglobulinas humanizadas que se unen específicamente a un VLA-4. Los anticuerpos humanizados comprenden una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. La cadena ligera humanizada comprende tres regiones que determinan la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3), que tienen 15 secuencias de aminoácidos procedentes de las regiones correspondientes que determinan la complementariedad de una cadena ligera inmunoglobulínica 21-6 de ratón, de SEC ID n°: 2 (como se muestra en la Figura 1), y un armazón de región variable procedente de una secuencia de armazón de región variable de cadena ligera kappa humana, excepto en al menos una posición seleccionada de un primer grupo que consiste en las posiciones L45, L49, L58 y L69, en la que la posición del aminoácido está ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición 20 equivalente del armazón de la región variable de cadena ligera inmunoglobulínica 21.6 de ratón. La cadena pesada humanizada comprende tres regiones que determinan la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias de aminoácidos procedentes de las regiones correspondientes que determinan la complementariedad de una cadena pesada inmunoglobulínica 21-6 de ratón, de SEC ID n°: 4 (como se muestra en la Figura 2), y un armazón de región variable procedente de una secuencia de armazón de región variable de cadena pesada humana, excepto en al menos una posición seleccionada de un grupo que consiste en H27, H28, H29, H30, H44, H71, en la que la posición del aminoácido está ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición 25 equivalente del armazón de la región variable de cadena pesada inmunoglobulínica 21-6 de ratón. Las inmunoglobulinas se unen específicamente a VLA-4 con una afinidad que tiene un límite inferior de 10^7 M^{-1} y un límite superior de cinco veces la afinidad de la inmunoglobulina 21-6 de ratón que tiene la cadena ligera de SEC n°: 2 y la cadena pesada de SEC ID n°: 4.

Habitualmente, los armazones de región variable de cadena ligera y de cadena pesada humanizada proceden de las secuencias del armazón de la región variable de RE1 y 21/28'CL, respectivamente. Cuando el armazón de la región variable de cadena ligera humanizada procede de RE1, al menos se reemplazan dos aminoácidos del armazón. Un 35 aminoácido procede del primer grupo de posiciones descritas *más arriba*. Los otros aminoácidos proceden de un tercer grupo que consiste en las posiciones L104, L105 y L107. Esta posición está ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de una cadena ligera kappa procedente de una inmunoglobulina humana distinta de RE1.

40 Algunas inmunoglobulinas humanizadas tienen una secuencia de región variable de cadena ligera madura denominada La o Lb en la Figura 6, o una secuencia de región variable de cadena pesada madura denominada Ha, Hb o Hc en la Figura 7. Las inmunoglobulinas humanizadas preferidas incluyen aquellas que tienen una cadena ligera La y una cadena pesada Ha, Hb o Hc.

45 También se describen fragmentos de unión de las inmunoglobulinas humanizadas contra VLA-4 descritas *más arriba*.

En otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas humanizadas contra VLA-4 descritas *más arriba*.

50 En la presente memoria, se describen ordenadores programados para presentar imágenes tridimensionales del anticuerpo 21.6 de ratón o de las inmunoglobulinas humanizadas descritas *más arriba*.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que usan las mismas. Las composiciones farmacéuticas comprenden una inmunoglobulina humanizada o un fragmento de unión como se describe *más arriba*, y un vehículo farmacéuticamente aceptable; en algunos métodos de tratamiento, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica a un paciente que sufre una enfermedad inflamatoria, tal como esclerosis múltiple.

60 Se describen métodos para detectar antígeno VLA-4 usando las inmunoglobulinas humanizadas y los fragmentos de unión descritos *más arriba*. En estos métodos, se administra un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a un paciente o una muestra de tejido procedente del mismo. Se detectan complejos formados mediante la unión específica entre el anticuerpo o el fragmento y el VLA-4 presente en la muestra.

Breve descripción de las figuras

- 5 Figura 1: secuencias de ADN (SEC ID nº: 1) y de aminoácidos (SEC ID nº: 2) de la región variable de cadena ligera 21.6 de ratón.
- Figura 2: secuencia de ADN (SEC ID nº: 3) y de aminoácido (SEC ID nº: 4) de la región variable de cadena pesada 21.6 de ratón.
- 10 Figura 3: Vectores de expresión de la cadena ligera (A) y pesada (B) usados para producir anticuerpos humanos quiméricos y reconvertidos con cadenas ligeras kappa humanas y cadenas pesadas gama-1 humanas en células de mamíferos.
- Figura 4: Comparación de ELISA de anticuerpo 21.6 quimérico y de ratón que se une a células L que expresan $\alpha 4\beta 1$ integrina humana sobre su superficie.
- 15 Figura 5: Modelo molecular de las regiones variables del anticuerpo 21.6 de ratón. Se marcan los restos de especial interés.
- Figura 6: Comparaciones de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera 21.6 de ratón y humano reconvertido (SEC ID nº: 5). Los restos de aminoácidos que son parte de las secuencias canónicas de Chothia, para las estructuras de bucles de CDR, están marcadas con asterisco. RE1 (SEC ID nº: 6) muestra las FR y CDR de la región V_L de la cadena ligera de RE1 humana. La (SEC ID nº: 7) y Lb (SEC ID nº: 8) son las dos versiones de la región V_L de 21.6 humano reconvertido. Los restos en las FR de La, que difieren de aquellos en la secuencia de RE1, están subrayados. En Lb, sólo se muestran los restos en las regiones de armazón que difieren de aquellos de RE1.
- 20 Figura 7: Comparaciones de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada 21.6 de ratón y humana reconvertida (SEC ID nº: 9). Los restos de aminoácidos que son partes de la secuencia canónica, para las estructuras del bucle de CDR de Chothia, están marcados con un asterisco. 2^oCL (SEC ID nº: 10) muestra las FR y CDR de la región V_H del anticuerpo 21/28^oCL humano. Ha (SEC ID nº: 11), Hb (SEC ID nº: 12), y Hc (SEC ID nº: 13) son las 3 versiones de la región V_H de 21.6 humano reconvertido. Se subrayan los restos en las FR de Ha que difieren de aquellos de la secuencia 21/28^oCL. En Hb y Hc, sólo se muestran los restos en las regiones del armazón que difieren de aquellos de 21/28^oCL.
- 30 Figura 8: construcción a base de PCR de una versión "a" de la región variable de cadena ligera 21.6 humana reconvertida. Las líneas punteadas indican una secuencia de complementariedad de al menos 21 bases entre los cebadores.
- Figura 9: Construcción a base de PCR de una versión "a" de la región variable de cadena pesada 21.6 humana reconvertida.
- 40 Figura 10: Secuencias de ADNc y de aminoácidos (SEC ID nºS: 14 y 15) de la primera versión ("a") de la región variable de cadena ligera 21.6 humana reconvertida.
- Figura 11: Secuencias de ADN y de aminoácidos (SEC ID nºS: 16 y 17) de la primera versión ("a") de la región variable de cadena pesada 21.6 humana reconvertida.
- 45 Figura 12: Comparación de ELISA de anticuerpos 21.6 humanos reconvertidos y quiméricos que se unen a células L que expresan $\alpha 4\beta 1$ integrina humana sobre su superficie.
- 50 Figura 13: Comparación de anticuerpo 21.6 de ratón con un anticuerpo anti-VLA-4 diferente, L25. El panel A compara la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de células monoclónicas U937 a VCA-1 purificado, en presencia y en ausencia de Mn^{2+} . El panel B compara la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de células Jurkat frente a concentraciones creciente de VCAM-1.
- 55 Figura 14: Retraso de la pérdida de peso de animales tratados con anticuerpo 21.6 de ratón o humano.
- Figura 15: Inversión de los síntomas clínicos en animales tratados con anticuerpo 21.6 de ratón o humano.
- 60 Figura 16: Inversión de la pérdida de peso en animales tratados con anticuerpo 21.6 de ratón o humano.

DEFINICIONES

65 Las abreviaturas para los veinte aminoácidos de origen natural siguen el uso convencional (*Immunology – A Synthesis* (2^a ed., E.S. Golub & D.R. Gren, eds., Sinauer Associates, Sunderland, Ma, 1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como

aminoácidos α,α -disustituidos, N-alkil-aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales, también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetilamina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina) similares. Además, los aminoácidos se pueden modificar mediante glicosilación, fosforilación y similar.

En la notación polipeptídica usada aquí, la dirección hacia izquierda es la dirección amino-terminal, y la dirección a la derecha es la dirección carboxi-terminal, según el uso y la convención estándar. De forma similar, excepto que se especifique de otro modo, el extremo izquierdo de las secuencias polinucleotídicas monocatenarias es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias polinucleotídicas bicatenarias se denomina como la dirección 5'. La adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se denomina como la dirección de transcripción; las regiones de secuencias sobre la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que el ARN, y que son 5' con respecto al extremo 5' del transcrito del ARN, se denominan como las "secuencias en dirección 5'"; las regiones de las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN, y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan como "secuencias en dirección 3'".

La expresión "secuencia polinucleotídica" se refiere a un polímero mono- o bicatenario de bases de desoxirribonucleótido o de ribonucleótido leídas desde el extremo 5' hasta el extremo 3'. Incluye los plásmidos autorreplicantes, polímeros infecciosos de ADN o ARN, y ADN o ARN no funcionales.

Las siguientes descripciones se usan para describir las relaciones de secuencias entre 2 o más polinucleótido: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencias", y "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo como un segmento de una secuencia génica o ADNc de longitud completa dada en un listado de secuencias, tal como una secuencia polinucleotídica de las figuras 1 o 2, o puede comprender una secuencia génica o ADN completo. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud, y a menudo al menos 50 nucleótidos de longitud. Puesto que 2 polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y además pueden comprender (2) una secuencia que diverge entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realiza típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos a lo largo de una "ventana de comparación" para identificar y compara regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación", como se usa aquí, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones nucleotídicas contiguas en el que se puede comparar una secuencia polinucleotídica con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos, y en el que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones, (es decir, saltos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias, para alinear una ventana de comparación, se puede realizar mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsh, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:2444 (1988) (cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad como referencia a todos los efectos), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Packages Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que da como resultado el mayor porcentaje de similitud de secuencias a lo largo de la ventana de comparación) generado mediante los diversos métodos. La expresión "identidad de secuencias", significa que dos secuencias polinucleotídicas son idénticas (es decir, en una base de nucleótido a nucleótido) a lo largo de la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comprando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por cien para dar el porcentaje de identidad de secuencias. La expresión "identidad sustancial", como se usa aquí, representa una característica de una secuencia polinucleotídica, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencias, más habitualmente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones nucleotídicas, frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia polinucleotídica que puede incluir supresiones o adiciones que ascienden a un total de 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo la secuencia mostrada en las figuras 1 o 2.

Como se aplica a los polipéptidos, la expresión "identidad de secuencias" significa péptidos que compartan idénticos

aminoácidos en posiciones correspondientes. La expresión "similitud de secuencias" significa péptidos que tienen aminoácidos idénticos o similares (es decir, sustituciones conservativas) en las posiciones correspondientes. La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando esos de saltos por defecto, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencias, preferiblemente 90 por ciento de identidad de secuencias, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencias o más (*por ejemplo*, 99 por ciento de identidad de secuencias). Preferiblemente, las posiciones de los restos que no son idénticos difieren en las sustituciones de aminoácidos conservativas. La expresión "similitud sustancial" significa que dos secuencias peptídicas comparten porcentajes correspondientes de similitud de secuencias.

La expresión "sustancialmente pura" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en un base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos alrededor de 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de alrededor de 80 hasta 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Lo más preferible, la especie objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (la especies contaminantes no se puede detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales), en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Con el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan según lo siguiente: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, met, ala, val, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (restos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen un intercambio de un elemento de una de estas clases por otro.

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera maduras de inmunoglobulinas se denominan Hx y Lxx, respectivamente, en las que x es un número que designa la posición de los aminoácidos según el esquema de Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987) y (1991)) (en lo sucesivo denominado colectivamente como "Kabat *et al.*", incorporado como referencia en su totalidad para todos los fines). Kabat *et al.* enumeran muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subclase, y dan la lista del aminoácido que aparece más habitualmente para cada posición de resto en esa subclase. Kabat *et al.* usa un método para asignar un número al resto para cada aminoácido en una secuencia enumerada, y este método para asignar los números de los restos se ha convertido en un estándar en el campo. El esquema de Kabat *et al.* es extensible a otros anticuerpos no incluidos en el compendio, alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso en Kabat *et al.* El uso del sistema de numeración de Kabat *et al.* identifica fácilmente los aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente de una posición de aminoácido L50 de un anticuerpo de ratón.

Descripción detallada

I. Anticuerpos humanizados específicos para VLA-4

En una realización de la invención, se proporcionan inmunoglobulinas (o anticuerpos) humanizadas, tal como se describe anteriormente en el Sumario de la Invención, específicas para la subunidad alfa-4 de VLA-4. Las inmunoglobulinas humanizadas tienen regiones de armazón variables sustancialmente procedente de una inmunoglobulina humanizada (denominada como inmunoglobulina aceptora), y regiones que determinan la complementariedad sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina de ratón, denominada MAb 21.6 mu (denominada como la inmunoglobulina donante). La región o regiones constantes, si están presentes, también proceden sustancialmente de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados muestran una afinidad de unión específica por VLA-4 de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M^{-1} . Habitualmente, el límite superior de la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados por VLA-4 está dentro de un factor de tres o cinco del de MAb 21.6 de mu (alrededor de 10^9 M^{-1}). A menudo, el límite inferior de la afinidad de unión está también dentro de un factor de tres o cinco del de MAb 21.6 de mu.

A. Características generales de las inmunoglobulinas

Se sabe que la unidad estructural del anticuerpo básico comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 hasta 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas mediante una región "J" de alrededor de 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de alrededor de 10 o más aminoácidos. (Véase, generalmente, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y., 1989), Cap. 7 (incorporado en su totalidad como referencia a todos los efectos).

Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forma el sitio de unión del anticuerpo. Las cadenas muestran todas la misma estructura general de regiones de almacén (FR) relativamente conservadas, unidas mediante tres regiones hipervariables, también denominadas regiones que determinan la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean mediante las regiones de almacén, permitiendo la unión a un epítipo específico. Los restos de CDR y FR se desalinean según la definición de secuencia estándar de Kabat *et al.*, *más arriba*. Una definición estructural alternativa ha sido propuesta por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); *Nature* 342:878-883 (1989); y *J. Mol. Biol.* 186:651-663 (1989) (en lo sucesivo denominada colectivamente como "Chothia *et al.*" e incorporados en su totalidad como referencia a todos los efectos). Cuando las posiciones del almacén, según se definen mediante Kabat *et al.*, *más arriba*, que constituyen posiciones de bucle estructural según se define por Chothia *et al.*, *más arriba*, los aminoácidos presentes en el anticuerpo de ratón se incorporan habitualmente en el anticuerpo humanizado.

B. Producción de anticuerpos humanizados

(1) MAb 21.6 de ratón

El material de partida para la producción de anticuerpos humanizados es MAb 21.6 de mu. El aislamiento y las propiedades de este anticuerpo se describen en el documento USSN 07/871.223. De forma resumida, MAb 21.6 de mu es específico para la subunidad alfa-4 de VLA-4, y se ha demostrado que inhibe la unión de linfocitos humanos a cultivos de tejidos de células cerebrales de rata estimuladas con el factor de necrosis tumoral. En el Ejemplo 1 se describe la clonación y secuenciación de ADNc que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo MAb 21.6 de mu, y en las Figuras 1 y 2 se muestran las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos predichas. Estas figuras también ilustran la subdivisión de la secuenciación codificante de aminoácidos en dominios de almacén y que determina la complementariedad. Desde N-terminal hasta C-terminal, tanto las cadenas pesadas como las ligeras comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de los aminoácidos a cada dominio está según la convención de numeración de Kabat *et al.*, *más arriba*.

(2) Selección de anticuerpos humanos para suministrar restos de almacén

La sustitución de las CDR de ratón en un almacén de dominio variable humano es muy probable que dé como resultado la retención de su orientación espacial correcta si el almacén de dominio variable humano adopta una conformación igual o similar a la del almacén variable de ratón a partir del cual se originan las CDR. Esto se logra obteniendo los dominios variables humanos a partir de anticuerpos humanos cuyas secuencias de almacén muestran un grado elevado de identidad de secuencias con los dominios de almacén variable murino a partir de los que derivan las CDR. Las regiones de almacén variable de cadena pesada y ligera pueden derivar de las mismas secuencias de anticuerpos humanos, o de diferentes secuencias. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos de origen natural, o pueden ser las secuencias de consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Kettleborough *et al.*, *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger *et al.*, *Protein Engineering* 6:971 (1993).

Las secuencias de anticuerpos humanos adecuadas se identifican mediante comparaciones con ordenador de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se realiza separadamente para las cadenas pesada y ligera, pero los principios son similares para cada una. Esta comparación revela que la cadena ligera de 21.6 de mu muestra una mayor identidad de secuencias con las cadenas ligeras humanas del subtipo kappa 1, y que la cadena pesada de 21.6 de mu muestra una identidad de secuencias mayor que las cadenas pesadas humanas del subtipo uno, como se define mediante Kabat *et al.*, *más arriba*. De este modo, las regiones de almacén humanas ligeras y pesadas derivan habitualmente de anticuerpos humanos de estos subtipos, o de secuencias consenso de tales subtipos. Las regiones variables humanas de cadenas ligera y pesada preferidas, que muestran una mayor identidad de secuencias con las regiones correspondientes procedentes de MAb 21.6 de mu, proceden de anticuerpos RE1 y 21/28'CL, respectivamente.

(3) Modelo mediante ordenador

La yuxtaposición de regiones CDR murinas con una región de almacén variable humana puede dar como resultado restricciones conformacionales no naturales, las cuales, excepto que se corrijan mediante sustitución de ciertos restos de aminoácidos, conducen a una pérdida de afinidad de unión. La selección de restos de aminoácidos para la sustitución se determina, en parte, mediante modelos de ordenador. Existen ampliamente *hardware* y *software* de ordenador para producir imágenes tridimensionales de moléculas inmunoglobulínicas. En general, los modelos

moleculares se producen partiendo de estructuras resueltas para cadenas inmunoglobulinas o sus dominios. Las cadenas a modelar se comparan, para similitud de secuencias de aminoácidos, con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que muestran la similitud más grande de secuencias se seleccionan como puntos de partida para la construcción del modelo molecular. Por ejemplo, para la cadena ligera de MAb 21.6 de mu, el punto de partida para modelar las regiones de armazón, las regiones CDR1 y CDR2, fue la cadena ligera humana RE1. Para la región CDR3, el punto de partida fue la región CDR3 de la cadena ligera de un anticuerpo humano diferente HyHEL-5. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir que se modelen las diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas o dominios inmunoglobulínicos, y aquellos en la estructura de partida. Las estructuras modificadas se ensamblan entonces en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina mediante minimización de energía y verificando que todos los átomos estén dentro de las distancias apropiadas entre sí, y que las longitudes y ángulos de enlace estén dentro de límites químicamente aceptables. El Ejemplo 4 trata con más detalle las etapas llevadas a cabo para producir un modelo por ordenador tridimensional para las regiones variables del MAb 21.6 de mu, y el modelo se muestra en la Figura 5. Este modelo puede servir, a su vez, como un punto de partida para predecir la estructura tridimensional de un anticuerpo que contiene las regiones que determinan la complementariedad de MAb 21.6 de mu sustituidas en las estructuras de armazón humanas. Se pueden construir modelos adicionales representando la estructura cuando se introducen otras sustituciones de aminoácidos a discutir más abajo.

(4) Sustitución de restos de aminoácidos

Como se ha señalado *más arriba*, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden regiones de armazón variables, sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina humana, y regiones que determinan la complementariedad, sustancialmente de una inmunoglobulina de ratón denominada MAb 21.6 de mu. Habiendo identificado las regiones que determinan la complementariedad de MAb 21.6 de mu, y las inmunoglobulinasceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa es determinar qué restos, si es que los hay, de estos componentes se debe de sustituir para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En general, la sustitución de restos de aminoácidos humanos por los murinos se debe de minimizar, debido a que la introducción de restos murinos aumenta el riesgo de que el anticuerpo provoque una respuesta de HAMA en seres humanos. Los aminoácidos se seleccionan para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de tales influencias posibles se realiza mediante modelos, el examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de los aminoácidos particulares.

Cuando un aminoácido difiere entre una región de armazón variable de MAb 21.6 de mu y una región de armazón variable humana equivalente, el aminoácido del armazón humano se debe de sustituir habitualmente por el aminoácido de ratón equivalente si se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) sea una de forma no covalente directamente al antígeno (*por ejemplo*, los aminoácidos en las posiciones L49, L69 de MAb 21.6 de mu),
- (2) sea adyacente a una región CDR, es parte de una región CDR en la definición alternativa propuesta por Chothia *et al.*, *más arriba*, o de otro modo interactúe con una región CDR (*por ejemplo*, está en alrededor de 3 Å de una región CDR) (*por ejemplo*, aminoácidos en las posiciones L45, L58, H27, H28, H29, H30 y H71 de MAb 21.6 de mu), o
- (3) participe en la interfaz V_L - V_H (*por ejemplo*, aminoácidos en la posición H44 de MAb 21.6 de mu).

Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos del armazón humanos aceptores que no son habituales para una inmunoglobulina humana en esa posición (*por ejemplo*, los aminoácidos en las posiciones L104, L105 y L107 de MAb 21.6 de mu). Estos aminoácidos se pueden sustituir con aminoácidos de la posición equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas. Como alternativa, los aminoácidos de posiciones equivalentes en el MAb 21.6 de ratón se pueden introducir en las regiones de armazón humanas cuando tales aminoácidos sean típicos de la inmunoglobulina humana en las posiciones equivalentes.

En general, es deseable la sustitución de todos o de la mayoría de los aminoácidos que satisfagan los criterios anteriores. Ocasionalmente, sin embargo, existe cierta ambigüedad sobre si un aminoácido particular satisface los criterios anteriores, y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular, y la otra no la tiene. Los anticuerpos humanizados de la presente invención contendrán habitualmente una sustitución de un resto de armazón de cadena ligera humana con un resto de MAb 21.6 de mu correspondiente en al menos 1, 2 o 3, y más habitualmente 4, de las siguientes posiciones: L45, L49, L58 y L69. Los anticuerpos humanizados también contienen habitualmente una sustitución de un resto de cadena pesada humana en al menos 1, 2, 3, 4, o 5, y algunas veces 6, de las siguientes posiciones: H27, H28, H29, H30, H44 y H71. Opcionalmente, también puede estar sustituida la posición H36. En realizaciones preferidas cuando la inmunoglobulina aceptora de cadena ligera humana es RE1, la cadena ligera también contiene sustituciones en al menos 1 o 2, y más habitualmente 3, de las siguientes posiciones: L104, L105 y L107. Estas posiciones están sustituidas con el aminoácido procedente de la posición equivalente de una inmunoglobulina humana que tiene un resto de

aminoácidos más típico. En las Figuras 6 y 7, se muestran aminoácidos apropiados para sustituir.

Habitualmente, las regiones CDR en anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas, y más habitualmente, son idénticas a las regiones CDR correspondientes en el anticuerpo de MAb 21.6 de mu. Ocasionalmente, sin embargo, es deseable cambiar uno de los restos en una región CDR. Por ejemplo, el Ejemplo 5 identifica una similitud de aminoácidos entre CDR3 de MAb 21.6 de mu y el ligando de VCAM-1. Esta observación sugiere que la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados se puede mejorar rediseñando la región CDR3 de cadena pesada para que se parezca aún más a VCAM-1. En consecuencia, se pueden sustituir uno o más aminoácidos del dominio CDR3 con aminoácidos del dominio de unión de VCAM-1. Aunque no es habitualmente deseable, algunas veces es posible realizar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de restos de CDR sin afectar apreciablemente a la afinidad de unión de la inmunoglobulina humanizada resultante.

Excepto para las sustituciones de aminoácidos específicas expuestas anteriormente, las regiones de armazón de inmunoglobulinas humanas son habitualmente sustancialmente idénticas, y más habitualmente idénticas a las regiones de armazón de los anticuerpos humanizados de las que derivan. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región de armazón aportan poca o ninguna contribución directa a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. De este modo, se pueden tolerar muchas sustituciones conservativas individuales de los restos del armazón sin cambio apreciable de la especificidad o de la afinidad de la inmunoglobulina humanizada resultante. Sin embargo, en general, tales sustituciones son indeseables.

(5) Producción de regiones variables

Habiendo seleccionado conceptualmente los componentes de la CDR y del armazón de las inmunoglobulinas humanizadas, existe una variedad de métodos para producir tales inmunoglobulinas. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codificará cada secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina. Las secuencias de ácidos nucleicos deseadas se pueden producir mediante síntesis de ADN en fase sólida *de novo*, o mediante mutagénesis por PCR de una variante preparada anteriormente del polinucleótido deseado. La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un método preferido para preparar variantes de sustitución, de eliminación y de inserción de ADN polipeptídico diana. Véase Adelman *et al.*, DNA 2:183 (1983). De forma resumida, el ADN polipeptídico diana se altera hibridando un oligonucleótido, que codifica la mutación deseada, a un molde de ADN monocatenario. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa del molde que incorpora el cebador oligonucleotídico, y codifica la alteración seleccionada en el ADN polipeptídico diana.

(6) Selección de región constante

Los segmentos variables de anticuerpos humanizados producidos como se describe *más arriba* se enlazan típicamente a al menos una porción de una región constante inmunoglobulínica (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Se pueden aislar secuencias de ADN de región constante humanas según procedimientos bien conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferiblemente a partir de células B inmortalizadas (véase Kabat *et al.*, *más arriba*, y el documento WO 87/02671) (cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad para todos los fines). De forma normal, el anticuerpo contendrá tanto regiones constantes de cadena pesada como de cadena ligera. La región constante de cadena pesada incluye habitualmente regiones CH1, visagra, CH2, CH3 y CH4.

Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cuando se desea que el anticuerpo humanizado muestre actividad citotóxica, el dominio constante es habitualmente un dominio constante que se fija al complemento, y la clase es típicamente IgG₁. Cuando tal actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG₂. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo.

(7) Sistemas de expresión

Los ácidos nucleicos que codifican regiones variables de cadena ligera y pesada humanizadas, opcionalmente enlazadas a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligeras y pesadas se pueden clonar en los mismos vectores de expresión, o en diferentes. Los segmentos de ADN que codifican cadenas inmunoglobulínicas se enlazan operablemente a secuencias de control en el vector o vectores de expresión, que aseguren la expresión de los polipéptidos inmunoglobulínicos. Tales secuencias de control incluyen una secuencia señal, un promotor, un potenciador, y una secuencia de terminación de la transcripción. Los vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huéspedes, ya sea como episomas o como una parte integrante del ADN cromosómico del huésped. Habitualmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, *por ejemplo*, tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, *por ejemplo*, patente U.S. 4.704.362).

E. coli es un huésped procarionta particularmente útil para clonar los polinucleótidos de la presente invención. Otros

huéspedes microbianos, adecuados para uso, incluyen bacilos, tal como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariontes, también se pueden obtener vectores de expresión que contendrán típicamente secuencias de control de la expresión compatibles con la célula del huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor para el fago lambda. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

También se pueden usar otros microbios, tales como levaduras, para la expresión. Un huésped preferido es *Saccharomyces*, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo 3-fosfogliceratoquinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee.

Además de los microorganismos, también se pueden usar cultivos de células de tejidos de mamíferos para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (véase Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987)). Se prefieren realmente células eucariotas, debido a que se han desarrollado en la técnica un número de estirpes celulares huéspedes adecuadas capaces de segregar inmunoglobulinas intactas, e incluyen las estirpes celulares de CHO, diversas estirpes celulares de Cos, células HeLa, preferiblemente estirpes celulares de mielomas, o células B transformadas o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49-68 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes inmunoglobulínicos, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican las cadenas pesada y ligera, y las secuencias de control de la expresión) se pueden transferir a la célula huésped mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, habitualmente se utiliza la transfección con cloruro de calcio para células procariontes, mientras que se puede usar el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación para otros huéspedes celulares. (Véase, *generalmente*, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989) (incorporado en su totalidad como referencia a todos los efectos). Cuando las cadenas pesada y ligera se clonan en sistemas de expresión separados, los vectores se cotransfectan para obtener la expresión y el ensamblaje de inmunoglobulinas intactas.

Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, las cadenas ligera y pesada individuales, u otras formas inmunoglobulínicas de la presente invención, se pueden purificar según procedimientos estándares de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel, y similares (véase, *generalmente*, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., 1982)). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras, de al menos alrededor de 90 a 95% de homogeneidad, y se prefieren más todavía las de 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

C. Fragmentos de anticuerpos humanizados

En otra realización de la invención, se proporcionan fragmentos de anticuerpos humanizados. Típicamente, estos fragmentos muestran una unión específica al antígeno de VLA-4, con una afinidad de al menos 10^7 M⁻¹, y más típicamente 10^8 o 10^9 M⁻¹. Los fragmentos de anticuerpos humanizados incluyen cadenas pesadas individuales, cadenas ligeras Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv. Los fragmentos se producen mediante técnicas de ADN recombinantes, o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

II. Ácidos nucleicos

Los anticuerpos humanizados, y sus fragmentos, se producen habitualmente mediante la expresión de ácidos nucleicos. Todos los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo, descrito en esta Solicitud, se incluyen expresamente en la invención.

III. Ordenadores

Se describen ordenadores programados para presentar imágenes tridimensionales de anticuerpos en un monitor. Por ejemplo, es adecuado el puesto de trabajo Silicon Graphics IRIS 4D, que funciona con el sistema operativo UNIX, y que usa el paquete de modelado molecular QUANTA (Polygen Corp. USA). Los ordenadores son útiles para visualizar modelos de variantes de anticuerpos humanizados. En general, los anticuerpos de la invención ya proporcionan una afinidad de unión satisfactoria. Sin embargo, es probable que los anticuerpos con una afinidad de unión incluso más fuerte se podrían identificar mediante una variación adicional de ciertos restos de aminoácidos. La imagen tridimensional también identificará muchos aminoácidos no críticos, lo que podría ser el objeto de

sustituciones conservativas sin afectar de forma apreciable la afinidad de unión del anticuerpo. Colectivamente, incluso las sustituciones conservativas pueden tener un efecto significativo sobre las propiedades de una inmunoglobulina. Sin embargo, es probable que muchas sustituciones conservativas individuales no alterarán significativamente las propiedades de las inmunoglobulinas.

5

IV. Ensayo de anticuerpos humanizados

Los anticuerpos humanizados de la invención se ensayan mediante una variedad de ensayos. Estos incluyen un ensayo de unión simple, para detectar la existencia o fortaleza de la unión de un anticuerpo a células que tienen el receptor de VLA. Los anticuerpos también se ensayan para determinar su capacidad para bloquear la interacción de células que tienen el receptor de VLA-4 con células endoteliales que expresan un ligando de VCAM-1. Las células endoteliales se pueden hacer crecer y estimular en cultivo, o pueden ser un componente de secciones de tejidos cerebrales de origen natural. Véase Yednock *et al.*, *más arriba*, y el documento USSN 07/871.223. Los anticuerpos humanizados también se ensayan para determinar su capacidad para prevenir o reducir la inflamación y la parálisis subsiguiente en animales de laboratorio que tienen encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). La EAE se induce mediante inyección, en un animal de laboratorio, de células T CD4⁺ específicas para la proteína básica mielínica, o inmunizando directamente a los animales con la proteína básica mielínica. Esta proteína está localizada en el sistema nervioso central, y las células T reactivas inician la destrucción de las cubiertas que contienen esta proteína, de manera que simulan la respuesta autoinmunitaria en la esclerosis múltiple. Véase Yednock *et al.*, *más arriba*, y el documento USSN 07/871.223 en trámite con el presente.

10

15

20

V. Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas a usar para el tratamiento profiláctico o terapéutico, que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, un anticuerpo 21.6 humanizado o un fragmento de unión del mismo de la invención, y una variedad de otros componentes. La forma preferida depende del modo de administración pretendido, y de la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, que se definen como vehículos usados habitualmente para formular composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona de modo que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, y disolución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunógenos, y similares.

25

30

VI. Métodos de diagnóstico

Los anticuerpos humanizados, y sus fragmentos de unión, son útiles para detectar la presencia de células que tienen el receptor de VLA-4. La presencia de tales células en el cerebro es un diagnóstico de una respuesta inflamatoria, y puede señalar la necesidad del comienzo de un método terapéutico explicado más abajo. El diagnóstico se puede lograr retirando una muestra celular de un paciente. La cantidad de antígeno de VLA-4 expresado, en células individuales de la muestra, se determina entonces, *por ejemplo*, mediante tinción inmunohistoquímica de células fijadas, o mediante transferencia Western de un extracto celular con un anticuerpo MAb 21.6 humanizado, o un fragmento de unión del mismo.

40

El diagnóstico también se puede lograr mediante la administración in vivo de MAb 21.6 humanizado marcado radioactivamente (o un fragmento de unión), y la detección se puede lograr mediante formación de imágenes in vivo. La concentración de MAb 21.6 humanizado, administrado, debería de ser suficiente de manera que la unión a las células que tienen el antígeno diana sea detectable, en comparación con la señal del fondo. El reactivo de diagnóstico se puede marcar radioactivamente con un radioisótopo para la formación de imágenes mediante cámara, o con un isótopo paramagnético para la formación de imágenes mediante resonancia magnética o resonancia de espín electrónico.

45

50

Un cambio (típicamente un incremento) en el nivel de proteína de VLA-4, en una muestra celular, o una imagen, de un individuo, que está fuera del intervalo de los niveles normales clínicamente establecidos, puede indicar la presencia de una reacción de respuesta inflamatoria indeseable en el individuo del que se obtuvo la muestra, y/o indicar una predisposición del individuo a desarrollar (o a que evolucione hasta) tal reacción. La proteína de VLA-4 también se puede emplear como un marcador de diferenciación para identificar y tipar células de ciertas líneas y orígenes de desarrollo. Tal detección específica de tipos celulares se puede usar para el diagnóstico histopatológico de respuestas inmunitarias indeseadas.

55

60

VII. Métodos de tratamiento

Se describen métodos de tratamiento que explotan la capacidad de MAb 21.6 humanizado para bloquear las interacciones α 4-dependientes del receptor de VLA-4. La interacción α 4-dependiente del receptor de VLA-4 con el ligando de VCAM-1, en células endoteliales, es un suceso temprano en muchas respuestas inflamatorias, particularmente aquellas del sistema nervioso central. Las enfermedades y patologías indeseadas que resultan de la

65

inflamación del sistema nervioso central incluyen enfermedades agudas, tales como apoplejía y otros traumas cerebrales, y enfermedades crónicas, tales como esclerosis múltiple, meningitis y encefalitis. La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmunitaria neurológica progresiva que afecta a alrededor de 250.000 a 350.000 personas en los Estados Unidos de América. Se piensa que la esclerosis múltiple es el resultado de una reacción autoinmunitaria específica en la que ciertos leucocitos atacan e inician la destrucción de mielina, la cubierta aislante que cubre a las fibras nerviosas. En un modelo de animal para la esclerosis múltiple, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra alfa-4-beta-1 integrina bloquean la adhesión de leucocitos al endotelio, y de este modo previenen la inflamación del sistema nervioso central y la parálisis subsiguiente en los animales.

Los anticuerpos MAb 21.6 humanizados de la presente invención ofrecen varias ventajas con respecto a los anticuerpos de ratón que ya han demostrado ser eficaces en modelos de animales:

- 1) el sistema inmunitario humano no debe de reconocer como extraña a la región constante o armazón del anticuerpo humanizado, y por lo tanto la respuesta de anticuerpo contra tal anticuerpo inyectado debe ser menor que contra un anticuerpo de ratón totalmente extraño o contra un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.
- 2) Debido a que la porción efectora del anticuerpo humanizado es humana, puede interactuar mejor con otras partes del sistema inmunitario humano.
- 3) Se ha informado que los anticuerpos de ratón inyectados tienen una vida media en la circulación humana mucho más corta que la vida media de los anticuerpos humanos normales (Shaw *et al.*, *J. Immunol.* 138:4534-4538 (1987)). Los anticuerpos humanizados inyectados tienen una vida media esencialmente equivalente a los anticuerpos humanos de origen natural, permitiendo dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Las composiciones farmacéuticas expuestas *más arriba* se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de la esclerosis múltiple y de otros trastornos inflamatorios, particularmente aquellos del sistema nervioso central. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que se sospecha que, o que ya sufre, una enfermedad tal como esclerosis múltiple, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una dosis terapéutica o farmacéuticamente eficaz.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un paciente susceptible o de otro modo con riesgo de padecer una enfermedad particular, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, o retrasar el comienzo de la enfermedad. Tal cantidad se define como una dosis profilácticamente eficaz. En pacientes con esclerosis múltiple en revisión, el riesgo se puede evaluar mediante formación de imágenes por RMN, o, en algunos casos, mediante indicaciones presintomáticas observadas por el paciente.

Las composiciones farmacéuticas se administrarán mediante administración parenteral, tópica, intravenosa, oral o subcutánea, local intramuscular, tal como mediante aerosol o transdérmicamente, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación unitaria, dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral incluyen polvos, comprimidos, pastillas, cápsulas, y tabletas.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las patologías descritas anteriormente, variarán dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, y de otros medicamentos administrados. De este modo, las dosis del tratamiento tendrán que ser valoradas para optimizar la seguridad y la eficacia. Estas composiciones se pueden administrar a mamíferos para uso veterinario, y para uso clínico en seres humanos, de manera similar a otros agentes terapéuticos, es decir, en un vehículo fisiológicamente aceptable. En general, la dosis de administración oscilará desde alrededor de 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente 0,01 a 0,5 mg/kg del peso corporal del huésped.

VIII. Otros usos

Los anticuerpos humanizados también son útiles para la purificación mediante afinidad del receptor de VLA-4. Los anticuerpos se inmovilizan en un soporte sólido, y se hace pasar sobre el soporte una disolución de proteínas dispersas. VLA-4 se une al soporte, y de ese modo se separa de las otras proteínas. La VLA-4 purificada, o sus fragmentos, obtenida mediante este método, se puede usar como una vacuna o como un inmunógeno para producir otros anticuerpos. Los anticuerpos humanizados de la invención también son útiles para generar anticuerpos idiotípicos, por ejemplo, mediante inmunización de un animal con un anticuerpo humanizado. Se selecciona un anticuerpo anti-idiotipo cuya unión al anticuerpo humano se inhibe mediante VLA-4 o sus fragmentos. Debido a que tanto el anticuerpo anti-idiotípico como la VLA-4 o sus fragmentos se unen a la inmunoglobulina humanizada, el anticuerpo anti-idiotípico puede representar la "imagen interna" de un epítipo, y de este modo puede sustituir al

ligando del receptor de VLA-4, es decir, VCAM-1.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Clonación y secuenciación de las regiones variables de 21.6 de ratón

El anticuerpo 21.6 anti-VLA de ratón se ha descrito en la Solicitud USSN 07/871.223, en trámite junto con la presente. El ARN total se aisló a partir de células de hibridoma que producen anticuerpo 21.6 de ratón. El ADNc de primera cadena se sintetizó usando un kit (Pharmacia Biosystems Limited). Las regiones variables de cadena pesada y ligera se obtuvieron usando cebadores de PCR diseñados para hibridarse a secuencias que flanquean y que son externas a las secuencias que codifican las regiones variables, permitiendo de ese modo la clonación de todas las secuencias codificantes para las regiones variables del anticuerpo 21.6 de ratón. Se diseñaron cebadores de PCR de sentido, que se hibridan a los extremos 5' de las secuencias líder de la cadena ligera kappa de ratón y de las secuencias líder de la cadena pesada de ratón, basándose en bases de datos de 42 secuencias líder de cadena ligera kappa de ratón y de 55 secuencias líder de cadena pesada de ratón (Jones & Bendig, *Bio/Technology* 9:88-89 (1991) (incorporado aquí como referencia en su totalidad para todos los fines)). Estos cebadores se usaron conjuntamente con cebadores de PCR antisentido que se hibridan a los extremos 3' de las regiones constantes de ratón (kappa o gamma).

Las regiones V_L kappa de 21.6 de ratón se amplificaron mediante PCR en 50 μ l de reacción, que contiene típicamente 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 200 μ M de dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$, 1 unidad de AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) ADN polimerasa, 1 μ l de molde de ADNc, 0,25 μ M de cebador de MKV y 0,25 μ M de cebador de PCR antisentido de cadena ligera kappa de ratón (Figura 1). Las regiones de V_H de 21.6 de ratón se amplificaron mediante PCR como se describe anteriormente, excepto que se usaron el cebador de MHVH y un cebador de PCR antisentido específico para la región constante de cadena pesada de IgG1 de ratón (Figura 2). Cada reacción de PCR se cicló, después de una fusión inicial a 94°C durante 5 minutos, a 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 2 minutos, a lo largo de 25 ciclos. La terminación del último ciclo fue seguida por una extensión final a 72°C durante 10 minutos. La rampa de tiempo entre la hibridación del cebador y las etapas de extensión fue de 2,5 minutos. Después de la amplificación mediante PCR, se analizaron alícuotas de 10 μ l de cada reacción en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio.

Los productos de PCR se clonaron usando el "TA Cloning System" (Invitrogen Corporation). Los vectores que contienen insertos del tamaño correcto se secuenciaron usando ADN plasmídico bicatenario y Sequenase (United States Biochemical Corporation). Para evitar cualquier error que se pudiera haber introducido durante las etapas de amplificación mediante PCR, se secuenciaron, para cada región variable, al menos dos fragmentos de ADN amplificados mediante PCR y clonados, independientemente.

Las secuencias de los productos de PCR se compararon con otras regiones variables de cadena ligera y pesada de ratón (véanse las Tablas 1 y 2). Esta comparación indicó que los productos de PCR a partir de los cebadores de MKV2 y MKV4 representan regiones variables kappa de 21.6 de ratón auténticas, y aquellos procedentes de los cebadores de MHV1 y MHV2 representan regiones de V_H de ratón auténticas, y se concluyó que las secuencias de estos productos son aquellas de las regiones variables del anticuerpo 21.6 de ratón. Las secuencias de ADN y de aminoácidos del ADNc que codifican las regiones V_L y V_H de 21.6 de ratón se muestran en las Figuras 1 y 2.

45 Tabla 1

Comparación de la región variable de cadena ligera de 21.6 de ratón con otras regiones variables de cadena ligera.

V_L de 21.6 de ratón frente a:	Porcentaje de similitud ¹	Porcentaje de identidad
Secuencia de consenso para subgrupo 5 ² de V_L kappa de ratón	84,0	72,6
Secuencia de consenso para subgrupo 1 ² de V_L kappa de ratón	84,0	69,8
Secuencia de consenso para subgrupo 2 ² de V_L kappa de ratón	65,1	52,8
Secuencia de consenso para subgrupo 3 ² de V_L kappa de ratón	72,6	57,5
Secuencia de consenso para subgrupo 4 ² de V_L kappa de ratón	72,6	58,5
Secuencia de V_L a partir de RE1 ³ humana (Miembro del subgrupo 1 de V_L de kappa humana)	81,0	72,4

¹ El porcentaje de similitud se determinó usando el programa "GAP" del Grupo Informático de Genética de la Universidad de Wisconsin.

² Las secuencias de consenso se tomaron de Kabat *et al.*, *más arriba*

³ RE1 según se secuenció por Palm *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356:167-191 (1975).

50

Tabla 2

Comparación de la región variable de cadena pesada de 21.6 de ratón con otras regiones variables de cadena pesada.

V _H de 21.6 de ratón frente a:	Porcentaje de similitud ¹	Porcentaje de identidad
Secuencia de consenso para subgrupo 2C ² de V _H de ratón	94,3	91,1
Secuencia de consenso para subgrupo 1 ² de V _H humana	78,0	65,0
Secuencia de consenso para subgrupo 2 ² de V _H humana	70,5	53,3
Secuencia de consenso para subgrupo 3 ² de V _H humana	67,5	52,8
Secuencia de V _H de 21/28'CL ³ humana (Miembro del subgrupo 1 de V _H humana)	76,5	64,7

¹ El porcentaje de similitud se determinó usando el programa "GAP" del Grupo Informático de Genética de la Universidad de Wisconsin.
² Las secuencias de consenso se tomaron de Kabat *et al.*, *más arriba*
³ 21/28'CL según se secuenció por Dersimonian *et al.*, *J. Immunol.* 139:2496-2501 (1987).

Ejemplo 2: Construcción de anticuerpo 21.6 quimérico

Se construyeron cadenas ligera y pesada quiméricas ligando los ADNc clonados mediante PCR de las regiones V_L y V_H de 21.6 de ratón a regiones constantes humanas. Los extremos 5' y 3' de las secuencias de ADNc de ratón se modificaron usando cebadores de PCR diseñados especialmente. Los cebadores de PCR del extremo 5' (Tabla 3), que se hibridan a las secuencias de ADN que codifican los comienzos de las secuencias líder, se diseñaron para crear las secuencias de ADN esencialmente para una traducción eficaz (Kozak, *J. Mol. Biol.* 196:947-950 (1987)), y para crear sitios de restricción HindIII para la clonación en un vector de expresión. Los cebadores del extremo 3' (Tabla 3), que se hibridan a las secuencias de ADN que codifican los extremos de las regiones J, se diseñaron para crear las secuencias de ADN esenciales para el corte y empalme a las regiones constantes, y para crear un sitio BamHI para la clonación en un vector de expresión. Los productos de la amplificación mediante PCR se digirieron con HindIII y BamHI, se clonaron en un vector pUC19, y se secuenciaron para confirmar que no se habían producido errores durante la amplificación mediante PCR. Las regiones variables de 21.6 de ratón adaptadas se subclonaron entonces en vectores de expresión de células de mamíferos, que contienen las regiones constantes kappa o gamma-1 humanas (Figura 3).

Tabla 3

Cebadores de PCR para la construcción de anticuerpo 21.6 quimérico

A. Región variable de cadena ligera

1. Cebador para la reconstrucción del extremo 5' (37mer) (SEC ID n°:18)

5' C AGA AAG CTT GCC GCC ACC ATG AGA CCG TCT ATT CAG 3'
 HindIII **secuencia** M R P S I Q
de consenso
Kozak

2. Cebador para la reconstrucción del extremo 3' (35mer) (SEC ID n°:19)

5' CC GAG GAT CCA CTC ACG TTT GAT TTC CAG CTT GGT 3'
 BamHI **Sitio de donante de corte y empalme**

B. Región variable de cadena pesada

1. Cebador para la reconstrucción del extremo 5' (37mer) (SEC ID n°:20)

5' C AGA AAG CTT GCC GCC ACC ATG AAA TGC AGC TGG GTC 3'
 HindIII **Secuencia** M K C S W V
de consenso
Kozak

2. Cebador para la reconstrucción del extremo 3' (37mer) (SEC ID n°:21)

5' CC GAG GAT CCA CTC ACC TGA GGA GAC GGT GAC T 3'
 BamHI **Sitio de donante de corte y empalme**

Ejemplo 3: Expresión y análisis del anticuerpo quimérico 21.6

Los dos ADN plasmídicos que codifican las cadenas ligera y pesada de 21.6 quimérico se cotransfectaron en células Cos. Después de dos o tres días, los medios de las células Cos se analizaron mediante ELISA (1) para determinar la producción de un anticuerpo de tipo IgG humana, y (2) para determinar la capacidad de este anticuerpo de tipo humano para unirse a células L que expresan $\alpha 4\beta 1$ integrina humana sobre su superficie. Las figuras 4 y 12 muestran análisis de muestras no purificadas y purificadas de la proteína A del anticuerpo 21.6 quimérico para la unión a $\alpha 4\beta 1$ integrina humana, en comparación con un control de anticuerpo 21.6 purificado de ratón. Estas figuras muestran que el anticuerpo 21.6 quimérico se unió bien al antígeno, y confirman que se han clonado las regiones correctas de V_L y V_H de 21.6 de ratón.

Ejemplo 4: Modelo de la estructura de las regiones variables de 21.6 de ratón

Se construyó un modelo molecular de las regiones V_L y V_H del anticuerpo 21.6 de ratón. El modelo se construyó en un puesto de trabajo Silicon Graphics IRIS 4D, que funciona con el sistema operativo UNIS, y que usa el paquete QUANTA de modelos moleculares (Polygen Corp., USA). La estructura de las FR de la región V_L de 21.6 de ratón se basó en la estructura resuelta de la inmunoglobulina RE1 de Bence-Jones humana (Epp *et al.*, Biochemistry 14: 4943-4952 (1975)). La estructura de las FR de la región V_H de 21.6 de ratón se basó en la estructura resuelta del anticuerpo de ratón Gloop2. Se retuvieron restos idénticos en las FR; los restos no idénticos se sustituyeron usando las facilidades con QUANTA. CDR1 y CDR2 de la región V_L de 21.6 de ratón se identificaron como pertenecientes a los grupos 2 y 1 de la estructura canónica, respectivamente (Chothia *et al.*, *más arriba*). Puesto que CDR1 y CDR2 de RE1 pertenecen a los mismos grupos canónicos, CDR1 y CDR2 de la región V_L de 21.6 de ratón se modelaron sobre las estructuras de CDR1 y CDR2 de RE1. CDR3 de la región V_L de 21.6 de ratón no pareció corresponder a ninguno de los grupos de estructura canónica para las CDR3 de las regiones V_L . Una búsqueda en una base de datos reveló, sin embargo, que CDR3 en la región V_L de 21.6 de ratón fue similar a CDR3 en la región V_L de HyHEL-5 de ratón (Sheriff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:85-8079 (1987)). De este modo, la CDR3 de la región V_L de 21.6 de ratón se modeló sobre la estructura de CDR3 en la región V_L de HyHEL-5 de ratón. CDR1 y CDR2 de la región V_H de 21.6 de ratón se identificaron como pertenecientes a los grupos 1 y 2 de estructura canónica, respectivamente. CDR1 de la región V_H de 21.6 de ratón se modeló sobre CDR1 de la región V_H de Gloop2, que se parece mucho a los miembros del grupo 1 canónico para las CDR1 de regiones V_H . CDR2 de la región V_H de 21.6 de ratón se modeló sobre CDR2 de HyHEL-5 de ratón (Sheriff *et al.*, *más arriba*), que también es un miembro del grupo 2 canónico para CDR2 para regiones V_H . Para CDR3 de regiones V_H , no hay estructuras canónicas. Sin embargo, CDR3 en región V_H de 21.6 de ratón fue similar a CDR3 en la región V_H de R19.9 de ratón (Lascombe *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA 86:607-611 (1989)), y se modeló sobre esta CDR3, eliminando un resto extra de serina presente en el apéndice del bucle de CDR3 de la región V_H de R19.9 de ratón, e hibridando y refinando el salto. El modelo se sometió finalmente a descensos graduales y minimización de energía de gradientes de conjugado usando el potencial CHARMM (Brooks *et al.*, J. Comp. Chem. 4:187-217 (1983)), según se implementa en QUANTA, a fin de aliviar los contactos atómicos desfavorables, y optimizar la interacciones de van der Waals y electroestática.

Una vista del modelo estructural de las regiones variables de 21.6 de ratón se presenta en la Figura 5. El modelo se usó para ayudar a refinar el diseño de regiones variables del anticuerpo 21.6 humanizado.

Ejemplo 5: Diseño de regiones variables de 21.6 humano reconformado**(1) Selección de anticuerpos humanos homólogos para la secuencia de armazón**

Las regiones variables humanas, cuyas FR mostraron un elevado porcentaje de identidad con las de 21.6 de ratón, se identificaron mediante comparación de secuencias de aminoácidos. Las tablas 4 y 5 comparan las regiones variables de 21.6 de ratón con todas las regiones variables de ratón conocidas, y después con todas las regiones variables humanas conocidas. La región V_L de 21.6 de ratón se identificó como perteneciente al subgrupo 5 de la región V_L kappa de ratón, como se define por Kabat *et al.*, *más arriba*. Se identificaron las regiones V_L Kappa de ratón individuales, que tuvieron una identidad tan alta como 93,4% con la región V_L kappa de 21.6 de ratón (38C13V'CL y PC613'CL). La región V_L de 21.6 de ratón fue muy similar a regiones V_L kappa humana del subgrupo 1, como se define por Kabat *et al.*, *más arriba*. Se identificaron las regiones V_L kappa humanas individuales, que tuvieron tanta identidad como 72,4% con la región V_L kappa de 21.6 de ratón. Las regiones de armazón (FR) de una de las regiones variables humanas más similares, RE1, se usaron en el diseño de la región V_L de 21.6 humano reconformado. La región V_H de 21.6 de ratón se identificó como perteneciente al subgrupo 2c de la región V_H de ratón como se define por Kabat *et al.*, *más arriba*. Se identificaron las regiones variables de cadena pesada de ratón individuales, que tiene tanto como 93,3 % de identidad con la región V_H de 21.6 de ratón (17.2.25'CL y 87.92.6'CL). La región V_H de 21.6 de ratón fue casi similar a las regiones V_H humanas del subgrupo 1, como se define por Kabat *et al.*, *más arriba*. Se identificaron las regiones V_H humanas individuales, que tiene tanto como un 64,7% de identidad con la región V_H de 21.6 de ratón. Las FR de una de las regiones variables humanas más similares, 21/28'CL, se usó en el diseño de la región V_H de 21.6 humano reconformado.

(2) Sustitución de aminoácidos en regiones de armazón(a) Cadena ligera

5 La siguiente etapa en el proceso de diseño para la región de V_L de 21.6 humano reconformado fue unir las CDR de la región V_L de 21.6 de ratón a las FR de RE1 humana (Palm *et al.*, *más arriba*). En la primera versión de la región de V_L de 21.6 humano reconformado (La), se realizaron siete cambios en las FR humanas (tabla 4, figura 6).

10 En las posiciones 104, 105 y 107 en FR4, los aminoácidos de RE1 se sustituyeron con aminoácidos de la región J humana más típica de otra cadena ligera kappa humana (Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988)).

15 En la posición 45 en FR2, la lisina normalmente presente en RE1 se cambió a una arginina, según se encontró en esa posición en la región V_L de 21.6 de ratón. El resto de aminoácido en esta región se pensó que era importante para apoyar el bucle de CDR2 de la región V_L de 21.6 de ratón.

20 En la posición 49 en FR2, la tirosina normalmente presente en RE1 se cambió a una histidina, según se encontró en esa posición en la región V_L de 21.6 de ratón. Se observó en el modelo que la histidina en esta posición en la región V_L de 21.6 de ratón estaba localizada en el centro del sitio de unión, y posiblemente podría hacer un contacto directo con antígeno durante la unión de anticuerpo-antígeno.

25 En la posición 58 en FR3, la valina normalmente presente en RE1 se cambió a una isoleucina, según se encontró en esa posición en la región V_L de 21.6 de ratón. El resto de aminoácido en esta posición se pensó que era importante para apoyar el bucle de CDR2 de la región V_L de 21.6 de ratón.

30 En la posición 69 en FR3, la treonina normalmente presente en RE1 se cambió a una arginina, según se encontró en esa posición en la región V_L de 21.6 de ratón. Se observó en el modelo que la arginina en esta posición en la región V_L de 21.6 de ratón estaba localizada adyacente al bucle de CDR1 de la región V_L de 21.6 de ratón, y posiblemente podría hacer contacto directo con el antígeno durante la unión de anticuerpo-antígeno.

35 Se diseñó una segunda versión de la región V_L de 21.6 humano reconformado (denominada Lb), que contiene las mismas sustituciones que antes, excepto que no se realizó ningún cambio en la posición 49 en FR2 de RE1 (figura 6).

(b) Cadena pesada

40 La siguiente etapa en el proceso de diseño para la región V_H de 21.6 humano reconformado fue unir las CDR de la región V_H de 21.6 de ratón a las FR de 21/28'CL (Dersimonian *et al.*, *J. Immunol.* 139:2496-2501 (1987)). En la primera versión de la región V de 21.6 humano reconformado (Ha), se hicieron 5 cambios en las regiones de armazón humanas (tabla 5, figura 7). Los cinco cambios en las FR humanas fueron en las posiciones 27, 28, 29, 30 y 71.

45 En las posiciones 27, 28, 29 y 30 en FR1, los aminoácidos presentes en 21/28'CL humano se cambiaron a los aminoácidos encontrados en aquellas posiciones en la región V_H de 21.6 de ratón. Aunque estas posiciones se diseñan para estar dentro de FR1 (kabat *et al.*, *más arriba*), las posiciones 26 a 30 son parte del bucle estructural que forma el bucle de CDR1 de la región V_H . Por lo tanto, es probable que los aminoácidos en estas posiciones estén implicados directamente en la unión al antígeno. De hecho, las posiciones 27 a 30 son parte de la estructura canónica para CDR1 de la región V_H , según se define por Chothia *et al.*, *más arriba*.

50 En la posición 71 en FR3, la arginina presente en 21/28'CL humano se cambió a una alanina, según se encontró en esa posición en la región V_H de 21.6 de ratón. La posición 71 es parte de la estructura canónica para CDR 2 de la región V_H , según se define por Chothia *et al.*, *más arriba*. A partir del modelo de las regiones variables de 21.6 de ratón, parece que la alanina en la posición 71 es importante para apoyar el bucle de CDR2 de la región V_H . Una sustitución de una arginina por una alanina, en esta posición, muy probablemente interrumpiría la colocación del bucle de CDR2.

55 Una segunda versión (Hb) de la región de V_H de 21.6 humano reconformado contiene los cinco cambios descritos anteriormente para la versión H_A , más un cambio adicional en FR2.

60 En la posición 44 en FR2, la arginina presente en 21/28'CL humano se cambió a una glicina, según se encuentra en esa posición en la región V_H de 21.6 de ratón. Basándose en la información publicada sobre el empaquetamiento de las regiones V_L - V_H , y en el modelo de las regiones variables de 21.6 de ratón, se pensó que el resto de aminoácido en la posición 44 puede ser importante en el empaquetamiento de las regiones V_L - V_H Chothia *et al.*, *más arriba* (Figura 5).

65 La versión Hc de la región V de 21.6 humano reconformado se diseñó para hacer que el bucle de CDR3 parezca más similar a VCAM-1 humano. Tanto el anticuerpo 21.6 de ratón como VCAM-1 humano se unen a la $\alpha 4\beta 1$

integrina. El bucle de CDR3 de la región V_H de anticuerpos es el más diverso de los seis bucles de CDR, y generalmente es el componente individual más importante del anticuerpo en las interacciones de anticuerpo-antígeno (Chothia *et al.*, *más arriba*; Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381-388 (1992); Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4457-4461 (1992)). Se identificó alguna similitud de secuencias entre la CDR3 de la región V_H de 21.6 de ratón y los aminoácidos 86 a 94 de VCAM-1 humano, particularmente entre la secuencia de YGN (Tirosina-glicina-asparagina) en el bucle de CDR3 y la secuencia de FGN (fenilalanina-glicina-asparagina) en VCAM-1. Se piensa que estas secuencias están relacionadas con las secuencias de RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), importantes en diversos sucesos de adhesión celulares (Main *et al.*, *Cell* 71:671-678 (1992)). Por lo tanto, en la posición 98 en CDR3, la tirosina presente en la región V_H de 21.6 de ratón se cambió a una fenilalanina, según se encontró en la secuencia de VCAM-1 humano.

También se consideró la posible sustitución en la posición 36 en FR2. La cadena V_H de 21.6 de ratón contiene un resto de cisteína no habitual, en la posición 36 en FR2. Esta posición en FR2 es habitualmente un triptófano en secuencias de ratón y humanas relacionadas (tabla 5). Aunque los restos de cisteína son importantes a menudo para la conformación de un anticuerpo, el modelo de las regiones variables de 21.6 de ratón no indicó que este resto de cisteína estuviera implicado, directa o indirectamente, en la unión al antígeno, de forma que el triptófano presente en FR2 de la región V_H de 21/28'CL humano se dejó sin sustituir en las tres versiones del anticuerpo de 21.6 humanizado.

20 Ejemplo 6: Construcción de anticuerpos 21.6 humanos reconformados

La primera versión de la región V_L de 21.6 humano reconformado (resh21.6VL_a) se construyó a partir de fragmentos de PCR que solapan, esencialmente como se describe por Daugherty *et al.*, *Nucleic. Acids. Res.* 19:2471-2476 (1981) (véase la figura 8). La región V_L de 21.6 de ratón, adaptada como se describe en el Ejemplo 2, e insertada en pUC19, se usó como molde. Se sintetizaron cuatro pares de cebadores, APCR1-vla1, vla2-vla3, vla4-vla5, y vla6-vla7 (Tabla 6 y Figura 8). Pares adyacentes solapaban en al menos 21 bases. El cebador de APCR1 es complementario al vector pUC19. Se combinaron los pares de cebadores apropiados (0,2 μmoles) con 10 ng de ADN molde, y 1 unidad de Ampli Taq ADN polimerasa (Perkin Elmer cetus), en 50 μl de tampón de PCR que contiene 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 μM dNTPS, y 1,5 mM MgCl₂. Cada reacción se llevó a cabo durante 25 minutos. Después de una fusión inicial a 24 °C durante 5 min., las reacciones se ciclaron a 94°C durante 1 min., 55°C durante 1 min., y 72 °C durante 1 min., y finalmente se incubaron 72°C durante 10 min. La rampa de tiempo entre la hibridación del cebador y las etapas de extensión fue de 2,5 min. Los productos de las cuatro reacciones (A, B, C y D) de la primera ronda de las reacciones de PCR se extrajeron con fenol y se precipitaron con etanol.

35 Tabla 6

Cebadores de PCR para la construcción de regiones variable de 21.6 humano reconformado

A. Región variable de cadena ligera

40 1. Cebadores para la síntesis de la versión "a"

21.6VL_a1 (39mer) (SEQ. ID NO:22):
5' GAT GGT GAC TCT ATC TCC TAC AGA TGC AGA CAG TGA GGA 3'

21.6VL_a2 (32mer) (SEQ. ID NO:23):
5' CTG TAG GAG ATA GAG TCA CCA TCA CTT GCA AG 3'

21.6VL_a3 (39mer) (SEQ. ID NO:24):
5' AGG AGC TTT TCC AGG TGT CTG TTG GTA CCA AGC CAT ATA 3'

21.6VL_a4 (41mer) (SEQ. ID NO:25):
5' ACC AAC AGA CAC CTG GAA AAG CTC CTA GGC TGC TCA TAC AT 3'

21.6VL_a5 (40mer) (SEQ. ID NO:26):
5' GCA GGC TGC TGA TGG TGA AAG TAT AAT CTC TCC CAG ACC C 3'

21.6VL_a6 (42mer) (SEQ. ID NO:27):
5' ACT TTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT 3'

21.6VL_a7 (59mer) (SEQ. ID NO:28):
5' CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTG GTG CCT TGA CCG AAC GTC
CAC AGA TT 3'

45 2. Cebadores para la síntesis de la versión "b"

21.6VL_b1 (33mer) (SEC ID n°: 29): Cambios H-49 hasta Y-49

5' GGA AAA GCT CCT AGG CTG CTC ATA TAT TAC ACA 3'

21.6VLb (38mer (SEC ID n°: 30)): Cambios ACC-101 hasta ACA-101 para destruir un sitio Styl

5' CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTT GTG CC 3'

5

B. Región variable de cadena pesada

1. Cebadores para la síntesis de la versión "a"

21.6VHa1 (51mer) (SEQ. ID NO:31):

5' AAC CCA GTG TAT ATA GGT GTC TTT AAT GTT GAA ACC GCT AGC TTT ACA GCT
3'

21.6VHa2 (67mer) (SEQ. ID NO:32):

5' AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT GGC CAA AGG CTG GAG
TGG ATG GGA AGG ATT G 3'

21.6VHa3 (26mer) (SEQ. ID NO:33):

5' GAC CCG GCC CTG GAA CTT CGG GTC AT 3'

21.6VHa4 (66mer) (SEQ. ID NO:34):

5' GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GCA GAC ACC TCT GCC AGC
ACC GCC TAC ATG GAA 3'

21.6VHa5 (64mer) (SEQ. ID NO:35):

5' CCA TAG CAT AGA CCC CGT AGT TAC CAT AAT ATC CCT CTC TGG CGC AGT AGT
AGA CTG CAG TGT C 3'

21.6VHa6 (63mer) (SEQ. ID NO:36):

5' GGT AAC TAC GGG GTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC
ACC GTC TCC TCA 3'

10 **2. Cebador para la síntesis de la versión "b"**

21.6VHb (37mer (SEC ID n°: 37)): Cambios R-44 a G-44

5' CCA GGG CCG GGT CAC CAT CAC CAG AGA CAC CTC TGC C 3'

15 **3. Cebador para la síntesis de la versión "c"**

21.6VHc (27mer (SEC ID n°: 38)): Cambios Y-98 a F-98

5' CAG GCC CCT GGC CAA GGG CTG GAG TGG 3'

20 **C. Regiones variables tanto de cadena ligera como pesada
Cebadores que se hibridan al ADN del vector pUC19 flanqueante**

APCR1 (17mer (SEC ID n°:39), cebador sentido)

5' TAC GCA AAC CGC CTC TC 3'

25

APCR1 (18mer (SEC ID n°:40), cebador antisentido)

5' GAG TGC ACC ATA TGC GGT 3'

30 Los productos A y B de PCR, y C y D, se unieron en una segunda ronda de reacciones de PCR. Los productos A y B, y C y D, de PCR (50 ng cada uno) se añadieron a 50 µl de reacciones de PCR (como se describe anteriormente), y se amplificaron a través de 20 ciclos como se describe anteriormente, excepto que la temperatura de hibridación se elevó hasta 60°C. Los productos de estas reacciones se denominaron E y F. Los pares de cebadores de PCR usados fueron APCR1-vla3 y vla4-vla7, respectivamente. Los productos E y F de la PCR se extrajeron con fenol, y se precipitaron con etanol, y después se ensamblaron en una tercera ronda de reacciones de PCR mediante su propia complementariedad, en una reacción de PCR de dos etapas, similar a la descrita anteriormente, usando APCR1 y vla7 como los cebadores terminales. El fragmento completamente ensamblado, que representa toda la región VL de 21.6 humano reconformado, incluyendo una secuencia líder, se digirió con HindIII y BamHI, y se clonó en pUC19 para la secuenciación. Un clon que tiene la secuencia correcta se denominó resh21.6VLa.

40 Se construyó la segunda versión de una región VL de 21.6 humano reconformado (Lb), usando cebadores de PCR para hacer modificaciones pequeñas en la primera versión de la región VL de 21.6 humano reconformado (La), mediante el método de Kamman *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:5404 (1989). Se sintetizaron dos conjuntos de cebadores (Tabla 6). Cada reacción de PCR se llevó a cabo esencialmente en las mismas condiciones como se describen anteriormente. En una primera reacción de PCR, se usó el cebador mutagénico 21.6VLb2 para destruir un sitio Styl (Thr-ACC-97 hasta Thr-ACA-97), para producir resh21.6VLa2. Después, en una segunda reacción de PCR, se usó el cebador mutagénico 21.6VLb1 (His-49 hasta Tyr-49), con pUC-resh21.6VLa2 como ADN molde. El producto de la PCR se cortó con Styl y BamHI, y se subclonó en pUC-resh21.6VLa2, escindido con las mismas enzimas de

45

restricción. Un clon con la secuencia correcta se denominó pUC-resh21.6VLb.

Se construyó la versión "a" de una región V_H de 21.6 humano reconformado, usando los mismos métodos de PCR como se describen para la construcción de la versión "a" de una región V_L de 21.6 humano reconformado (Tabla 6 y Figura 9). Los fragmentos de ADN HindIII-BamHI, que codifican la versión "g" de la región V_H de 425 humano reconformado (Kettleborough *et al.*, *más arriba*), y la versión "b" de la región V_H de AUK12-20 humano reconformado, se subclonaron en vectores pUC19, produciendo pUC-resh425g y pUC-reshAUK12-20b, respectivamente. (La versión "b" de AUK12-20 se obtuvo mediante mutagénesis con PCR de un fragmento $V_{Ha}425$ descrito por Kettleborough *et al.*, *más arriba*, y codifica la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº:41):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT SYIIH WVRQAPGQGLEWVG

YIDPFNGGTSYNQKFKG KVTMTVDTSTINTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GGN-RFAY WGQGTLLVTVSS

(los espacios separan las regiones FR y CDR).

El plásmido pUC-resh425g y pUC-reshAUK12-20b, así como el vector pUC que contiene la región V_H de 21.6 de ratón, según se modifica para uso en la construcción de la cadena pesada de 21.6 quimérico (pUC-chim21.6VH), se usaron como ADN moldes en las reacción de PCR subsiguientes. Los cebadores de PCR se diseñaron y se sintetizaron para la construcción de la versión "a" de la región V_H de 21.6 humano reconformado (Tabla 6). El producto A de la PCR (Figura 9) se obtuvo usando pUC-reshAUK12-20b como molde de ADN, y APCR1-vha1 como el par de cebadores de PCR. Los productos B y D de la PCR se obtuvieron usando pUC-chim21.6VH como molde de ADN, y vha2-vha3 y vha6-APCR4 como pares de cebadores de PCR, respectivamente. Finalmente, el producto C de la PCR se obtuvo usando pUC-resh425g como molde de ADN, y vla4-vla5 como el par de cebadores de PCR. El producto final de la PCR se subclonó en pUC19 como un fragmento de HindIII-BamHI para la secuenciación de ADN. Un clon con la secuencia de ADN correcta se denominó pUC-resh21.6VHa. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de la primera versión de la región variable de 21.6 reconformado se muestran en la Figura 10.

Las versiones restantes de la región de V_H de 21.6 humano reconformado se construyeron esencialmente como se describe anteriormente para la construcción de la versión "b" de la región V_L de 21.6 humano reconformado. Se sintetizaron dos conjuntos de cebadores (Tabla 6). Para las versiones segunda (Hb) y tercera (Hc), se usaron cebadores mutagénicos 21.6VHb (Arg-44 hasta Gly-44) y 21.6VHc (Tyr-98 hasta Phe-98), respectivamente, en las reacción de PCR, con pUC-resh21.6VHa como el ADN molde. Los productos VHb y VHc de la PCR se cortaron con enzimas de restricción, y se subclonaron en el vector pUC pUC-resh21.6VHa como fragmentos MscI-BamHI y PstI-BamHI, respectivamente, para producir pUC-resh21.6VHb y pUC-resh21.6VHc.

La primera versión de una región V_H de 21.6 humano reconformado (Ha) se construyó de manera similar a la usada para la construcción de la primera versión de la región V_L de 21.6 humano reconformado (La). En este caso, sin embargo, se usaron cebadores de PCR con tres ADN moldes diferentes, la región V_H de 21.6 de ratón ya adaptada para la expresión de la cadena pesada de 21.6 quimérico, la versión "g" de la región V_H de 425 humanizado (Kettleborough *et al.*, *más arriba*), y la versión "b" de la región V_H de AUK12-20 humanizado (Tabla 6, Figura 9). En la Figura 11 se muestran las secuencias de ADN y de aminoácidos de la primera versión de la región variable de cadena pesada de 21.6 humanizado. Las versiones segunda y tercera de una región V_H de 21.6 humanizado (Hb y Hc) se construyeron usando cebadores de PCR para hacer pequeñas modificaciones en la primera versión de la región V_H de 21.6 humanizado (Ha) (Tabla 6).

Ejemplo 7: Expresión y análisis de anticuerpos humanizados

1. Ligazón de la regiones variables a regiones constantes en vectores de expresión

Los fragmentos de ADN que codifican las regiones V_L y V_H de 21.6 quimérico y reconformado se subclonaron en vectores HCMV diseñados para expresar cadenas pesadas gamma-1 humanas o cadenas ligeras kappa humanas, en células de mamíferos (véase la Figura 3) y Maeda *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 2:124-134 (1991). Ambos vectores contienen el promotor del citomegalovirus humano (HCMV) y el potenciador para la transcripción de alto nivel de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina. El vector de expresión de la cadena ligera es exactamente como se describe en Maeda *et al.*, *más arriba*, y contiene ADN genómico que codifica la región constante kappa humana (Rabbits *et al.*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 113:166-171 (1984)). El vector de expresión de la cadena pesada es esencialmente como se describe en Maeda *et al.*, *más arriba*, con la excepción de que el ADN genómico que codifica la región constante gamma-1 humana se sustituyó por un ADNc. El ADNc que codifica la región constante gamma-1 humana se clonó a partir de una estirpe celular humana que segregó un anticuerpo gamma-1 humano mediante PCR. Para la subclonación conveniente en el vector de expresión, se crearon sitios BamHI en cada extremo del ADNc. Además, se creó un sitio aceptor de corte y empalme y un intrón de 65 pb, en el extremo 5' de la secuencia de ADNc. El fragmento de BamHI (1176 pb), que contiene el sitio aceptor de corte y empalme de ADNc de gamma-1 humano y la secuencia intrónica, se sustituyó por el fragmento BamHI (aproximadamente 2.0 kb) en el vector de cadena pesada existente (Maeda *et al.*, *más arriba*). El sitio de BamHI hacia el lado 3' de la región constante de gamma-1 humana se eliminó entonces con polimerasa de Klenow.

2. Transfección de vectores de expresión

Se introdujeron vectores de expresión en células Cos, mediante electroporación usando el aparato Gene Pulsar (BioRad). Se añadió ADN (10 μg de cada vector) a una alícuota de 0,8 ml de 1×10^7 células/ml, en PBS. Se suministró un pulso a 1.900 voltios, 25 μF de capacitancia. Después de un período de recuperación de 10 min. a temperatura ambiente, las células electroporadas se añadieron a 8 ml de DMEM (GIBCO) que contiene 5% de suero fetal de ternera, libre de gamma-globulina, inactivado por calor. Después de 72 h de incubación, el medio se recogió, se centrifugó para eliminar el desecho celular, y se almacenó en condiciones estériles a 4°C durante períodos cortos de tiempo, o a -20°C durante períodos más largos.

3. Purificación de anticuerpos humanizados

Se reunieron los sobrenadantes procedentes de las transfecciones de las células Cos, y se purificaron sobre Proteína A inmovilizada (ImmunoPure IgG Purification Kit, Pierce). El sobrenadante se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de 0,22 μm . Después de mezclar con un volumen igual de tampón de unión de IgG ImmunoPure (pH 8,0), la muestra diluida se aplicó a una columna de 1 ml de proteína A, y se dejó fluir completamente en el gel. Después de lavar con 15 ml de tampón de unión de IgG ImmunoPure, el anticuerpo unido se eluyó con 5 ml de tampón de elución de IgG ImmunoPure (pH 2,8), y se recogieron fracciones de 1 ml. El pH de las fracciones primera y segunda fue aproximadamente 8,0. El pH de la tercera fracción se ajustó hasta pH fisiológico, mediante adición de 100 μl de tampón de unión ImmunoPure. Las cinco fracciones de 1 ml, que contienen el anticuerpo purificado mediante la Proteína A, se ensayaron entonces mediante ELISA para determinar la cantidad de anticuerpo IgG humano presente en cada fracción. El anticuerpo se detectó usando anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina de cabra (molécula completa, Sigma).

4. Medida de la afinidad de unión

La unión de anticuerpos 21.6 humanos reconformados a $\alpha 4\beta 1$ integrina se evaluó mediante ELISA, en comparación con anticuerpos de ratón y quiméricos. De forma breve, se cultivaron en placas a células L transformadas para expresar $\alpha 4\beta 1$ integrina sobre su superficie celular, y e hicieron crecer hasta la confluencia en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Las muestras a ensayar (bien sobrenadantes brutos o purificados mediante proteína A) se diluyeron en serie, y se añadieron a cada pocillo. Después de la incubación durante 1 h en hielo, y del lavado muy suave, se añadieron los conjugados (Sigma) de peroxidasa (específicos de la cadena gamma) anti-ratón o anti-humano de cabra. Después de otra 1 h de incubación sobre hielo, y del lavado muy suave, se añadió el sustrato (dihidrocloreto de o-fenilendiamina, Sigma). Después de la incubación durante 30 min a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo 1 M H_2SO_4 , y se midió la A_{490} .

Los resultados del análisis de los sobrenadantes brutos de las dos versiones de las cadenas ligeras de 21.6 humano reconformado (La y Lb), en combinación con la versión Ha de la cadena pesada de 21.6 humano reconformado, indicaron que la versión La de la región V_L de 21.6 humano reconformado dio una unión ligeramente mejor al antígeno que la versión Lb. La versión La se usó por lo tanto en experimentos subsiguientes. Los resultados del análisis de los sobrenadantes brutos de las cadenas pesadas de 21.6 humanizado (Ha y Hb), en combinación con la versión La de la cadena ligera de 21.6 humanizado, no mostraron diferencia significativa entre las dos versiones (Ha y Hb) de las regiones V_H humanas reconformadas. La versión Ha se seleccionó para uso en otros experimentos, debido a que contenía sólo cinco cambios en las FR humanas, en comparación con seis cambios en la Hb humana.

La Figura 12 compara la unión de anticuerpo 21.6 humanizado (La + Ha) con anticuerpo 21.6 quimérico. Los datos indican que el anticuerpo 21.6 humano reconformado (La + Ha) se unió igualmente a antígeno, y quizás ligeramente mejor que el anticuerpo 21.6 quimérico. Es de esperar que el anticuerpo 21.6 quimérico sea equivalente al anticuerpo 21.6 de ratón en sus características de unión a antígeno, debido a que contiene las regiones variables de 21.6 de ratón intactas. También se ha demostrado que el anticuerpo 21.6 humano reconformado (La + Ha) bloquea la unión a $\alpha 4\beta 1$ integrina humana, con una eficacia comparable a la del anticuerpo 21.6 de ratón original y a la del anticuerpo quimérico. Por lo tanto, se concluye que el anticuerpo 21.6 humano reconformado (La + Ha) tiene una afinidad de unión específica esencialmente igual a la del anticuerpo 21.6 de ratón. Además, debido a que sólo fueron necesarias pequeñas modificaciones en las FR humanas para recrear el sitio de unión a antígeno del anticuerpo 21.6 de ratón dentro de las regiones variables humanas, se predice que el anticuerpo 21.6 humano reconformado se comporta como un auténtico anticuerpo humano.

También se ensayó el anticuerpo 21.6 humano reconformado que contiene la versión La de la región V_L de 21.6 humano reconformado y la versión Hc de la región V_H de 21.6 humano reconformado, para determinar la unión a células L que expresan $\alpha 4\beta 1$ integrina humana sobre su superficie, en paralelo con el anticuerpo 21.6 quimérico. Los resultados indican que el anticuerpo 21.6 humano reconformado (La + Hc) se une bien a antígeno. La alteración en la CDR3 de la región V_H no alteró la unión a antígeno. De hecho, existe cierto signo de que la alteración en la CDR3 puede haber mejorado ligeramente la unión a antígeno (Figura 12). Concebiblemente, la mejora puede ser más pronunciada en un ensayo de bloqueo funcional.

Ejemplo 8: Propiedades de bloqueo del anticuerpo 21.6 de mu

Se comparó 21.6 de mu con otro anticuerpo frente a $\alpha 4$ integrina, denominado L25. L25 está comercialmente disponible de Becton Dickinson, y se ha dado a conocer en la bibliografía como buen inhibidor de la función adhesiva de $\alpha 4\beta 1$ integrina. Como se muestra en la Figura 13 (Panel A), tanto 21.6 de Mu como L25 inhibieron completamente la adhesión, dependiente de $\alpha 4\beta 1$ integrina, de células monocíticas humanas a VCAM-1 purificado, en ausencia de Mn^{+2} . Sin embargo, en presencia de Mn^{+2} (1 mM) (uno de varios activadores de $\alpha 4\beta 1$ integrina), L25 ya no fue un inhibidor eficaz. Se observaron resultados similares cuando se activó $\alpha 4\beta 1$ integrina mediante otros estímulos. La capacidad para bloquear $\alpha 4\beta 1$ integrina activada es probablemente valiosa en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como esclerosis múltiple.

Como una comparación adicional entre 21.6 de mu y L25, se determinó la capacidad del anticuerpo para inhibir la adhesión de las células T humanas a cantidades crecientes de VCAM-1. En este experimento, se revistieron cantidades crecientes de VCAM-1 sobre pocillos de plástico de una placa de ensayo de 96 pocillos, y se midió la capacidad de la estirpe celular T humana, Jurkat (que expresa niveles elevados de $\alpha 4\beta 1$ integrina), para unirse a los pocillos revestidos. Los valores en el eje Y representan el porcentaje de células Jurkat añadidas originalmente a cada pocillo que permaneció unido después del lavado del pocillo cuatro veces (Figura 13 (Panel B)). Este experimento demuestra que L25 es un buen inhibidor de la adhesión celular cuando se encuentran niveles bajos de VCAM-1, pero es completamente ineficaz a niveles más altos de VCAM-1. Por otro lado, 21.6 de Mu inhibe completamente la adhesión celular, independientemente de la cantidad de VCAM-1 presente. La capacidad para bloquear a concentraciones elevadas de VCAM-1 es deseable para aplicaciones terapéuticas debido a la regulación al alza de VCAM-1 en los sitios de inflamación.

Ejemplo 9: Eficacia de anticuerpo 21.6 humanizado en un modelo de animal

Este ejemplo establece la eficacia del anticuerpo 21.6 humanizado en el tratamiento profiláctico y terapéutico de EAE en un modelo de animal que simula la esclerosis múltiple en seres humanos.

(a) Métodos(1) Inducción de EAE

Se retiraron el cerebro y la médula espinal de cada uno de cinco cobayas eutanasiados mediante narcosis con CO_2 . El tejido se mantuvo en PBS sobre hielo seco hasta que se pesó y se homogeneizó a una concentración de 1 gramo de tejido por ml de PBS. El tejido se homogeneizó completamente usando un homogeneizador manual eléctrico, y se mezcló subsiguientemente con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (FCA). El FCA se obtuvo añadiendo 100 mg de tuberculosis mycobacterium H37 RA (DIFCO, 3114-33-8) a 10 ml de adyuvante incompleto de Freund (Sigma, F-5506). La mezcla se emulsionó hasta una consistencia de mayonesa, haciendo pasar la disolución entre dos jeringuillas conectadas mediante una llave de paso de dos vías. Cada cobaya se inmunizó con 600 μ l de emulsión, dividida entre tres sitios de administración.

(2) Puntuación de los animales para los síntomas de la enfermedad

Los síntomas de la enfermedad se evaluaron animando a que cada animal caminase, y asignando al animal una puntuación mediante los siguientes criterios aceptados habitualmente:

- 0 Sin enfermedad
- 1 Debilidad de la pata trasera
- 2 Parálisis total de la pata trasera
- 3 Parálisis total de la pata trasera y cierta parálisis de la pata delantera
- 4 Moribundo o muerto

(3) Recogida de suero y tejidos

Las muestras se recogieron mediante punción cardiaca de cobayas anestesiados con metoxiflurano. Se recogieron alrededor de 300-400 μ l de sangre, y se colocaron en un separador de suero Microtainer y se dejó coagular entre 20-30 min. a temperatura ambiente. El tubo se hizo girar entonces durante 5 min. a temperatura ambiente. El suero se extrajo en tubos Eppendorf, y se almacenó a $-20^{\circ}C$ para el análisis subsiguiente de los títulos de anticuerpo mediante clasificación de células activadas mediante fluorescencia (FACS).

Para el análisis hematológico, se recogió sangre en tubos Microtainer revestidos con ácido etilendiaminotetraacético. Se aspiró una alícuota de 100 μ l en un tubo de hematocritos revestido con acridina. El tubo se cerró, y la sangre se mezcló con naranja de acridina invirtiendo suavemente el tubo 15 veces. Se colocó un flotador en el tubo de hematocritos, y la muestra se centrifugó durante 5 minutos. El tubo de hematocritos se colocó en un aparato precalibrado Idexx QBC Vet Autoreader, diseñado para el análisis cuantitativo de la capa leucocítica. Los valores se

midieron bajo el sistema de calibración del caballo, y se ajustaron a los equivalentes del cobaya usando un factor de conversión predeterminado.

Al final del experimento, los cobayas se sacrificaron mediante narcosis con CO₂, y se retiraron los cerebros y las médulas espinales. La mitad del cerebro y de la médula espinal de cada cobaya se congeló instantáneamente en 2-metilbutano sobre hielo seco (-20 hasta -40°C). Este tejido se cortó y se inmunotizó con un marcador de macrófagos de bandeja (Serotec MCA-518) y con un marcador de linfocitos T (Serotec MCA-751), usando el ensayo de peroxidasa que se enlaza con avidina-biotina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) y diaminobencidina como cromógeno. El tejido se puntuó para la infiltración celular, según el siguiente sistema de puntuación:

- 0 Sin células infiltrantes.
- 0,5 Muy poca tinción; puede ser artificial; habitualmente asociada con vasos.
- 1 Tinción de unas pocas células (menos de 15), habitualmente próxima a un vaso.
- 2 Tinción de muchas células (20-50), habitualmente que radian desde un vaso.
- 3 Tinción de muchas células (> 50), difuminada a lo largo del tejido; muchos vasos borlados.

(b) Tratamiento profiláctico

Este experimento se diseñó para evaluar la eficacia de un anticuerpo 21.6 humanizado para retrasar el comienzo de los síntomas clínicos. Los datos previos han demostrado que el influjo leucocítico en el cerebro y en la médula espinal de cobayas con EAE comienza típicamente entre el día 7 y el día 8. Por lo tanto, los anticuerpos se administraron en el día 7 y en el día 10 después de la inmunización. Para comparar el anticuerpo 21.6 de ratón y el humanizado, se administraron dosis equivalentes de cada uno de los anticuerpos (3,0, 0,30 y 0,03 mg/kg). Los estudios farmacocinéticos preliminares revelaron que se lograron niveles sanguíneos saturantes de anticuerpo 21.6 de ratón en las 24 horas después de la administración subcutánea, y permanecieron elevados hasta 48 horas.

En el día 11, 24 horas después de la segunda dosis de anticuerpo, se extrajeron muestras de sangre de tres animales seleccionados al azar en cada grupo. Para cada grupo de tratamiento, se calculó una media para el número de días para que cada cobaya alcanzara una puntuación clínica de 1 (Tabla 7). El valor medio para el grupo tratado con PBS en este experimento fue de 11 días después de la inmunización (lo que es típico de los resultados previos). El tratamiento con la dosis más elevada de anticuerpo de ratón y anticuerpo humanizado dio como resultado un retraso significativo de la enfermedad, en 4,6 (p=0,000) y 3 (p=0,007) días, respectivamente. Las dosis más bajas de anticuerpo no tuvieron efecto en el curso de la enfermedad.

Tabla 7

Efecto de anticuerpo 21.6 de ratón y humanizado sobre el tiempo, tras la inmunización, para alcanzar una puntuación clínica de 1							
GRUPO	1	2	3	4	5	6	7
Mg/kg	0,03 M#,	3,0 H@	3,0 H	3,0 M	0,03 H	PBS	0,3 M
	8	9	13	10	8	9	9
	9	10	15	12	10	9	9
	9	10	15	14	10	11	11
	9	11	16	14	11	11	12
	11	11	16	14	12	11	12
	12	11	16	15	12	12	13
	12	12	17	15	12	12	13
		13	17	18	12	13	
Media ± SD	10,0 ± 1,6	10,9 ± 1,2	**15,6 ± 1,3	*14,0 ± 2,3	10,9 ± 1,5	11,0 ± 1,4	11,6 ± 1,4
@ H representa anticuerpo humanizado; # M representa anticuerpo de ratón							
**p=0,000 y *p=0,007, según se compara con PBS							

Los pesos corporales diarios del cobaya reflejaron un efecto similar de las dosis elevadas de anticuerpo humanizado y de ratón. (Figura 14). Los animales en estos grupos de tratamiento ganaron peso de forma constante. Los cobayas en todos los otros grupos de tratamiento perdieron peso, a partir desde justo antes del día del comienzo de la enfermedad.

Los títulos séricos de anticuerpo se midieron en tres animales seleccionados al azar a partir de cada grupo, mediante punción cardiaca en el día 11, apenas 24 h después del segundo tratamiento. La eficacia de los anticuerpos para retrasar la enfermedad se correlacionó muy bien con los niveles de suero. Alrededor de 20 µg/ml de anticuerpo sérico estaba presente en la circulación de todos los animales inyectados con la dosis más elevada de ambos anticuerpos, el humanizado y el de ratón. Esta concentración es del mismo orden de magnitud que la concentración de anticuerpo 21.6 requerida para saturar sitios de VLA-4 in vitro. Por el contrario, los animales de todos los otros grupos tuvieron poco o ningún anticuerpo sérico detectable.

(c) Inversión de la enfermedad progresiva

Se inmunizaron alrededor de 60 cobayas, y se dejó que desarrollasen síntomas clínicos de EAE. En el día 13, todos los cobayas que lograron una puntuación clínica de 1 se asignaron al azar a un grupo de tratamiento. La Figura 15 muestra que los animales tratados con 3 mg/kg de anticuerpo humanizado comenzaron a recuperar la función de la pata trasera a las 48 h de tratamiento. En los días 17 y 18, uno y dos días después de la segunda dosis, los ocho animales estaban sanos. ANOVA del área bajo los valores de la curva para grupo de tratamiento reveló que sólo el grupo tratado con un valor de 3 mg/kg de anticuerpo humanizado era estadísticamente más pequeño que el grupo de control de PBS (p=0,042). Estos animales ganaron peso progresivamente en las 24 h después de la primera administración, hasta que el experimento terminó en el día 19 (Figura 16).

Se midieron los títulos de anticuerpo sérico mediante análisis de FACS sobre muestras tomadas 24 h después de la primera inyección (Día 14) y en el momento del sacrificio (Día 19). El tratamiento con anticuerpo 21.6 de ratón dio como resultado títulos de anticuerpo sérico ligeramente más pequeños que el tratamiento con anticuerpo 21.6 humanizado (9,1 frente a 12,6 µg/ml). Esta diferencia se hizo más profunda en el Día 19, tres días después de la segunda administración, cuando había muy poco anticuerpo de ratón sérico detectable, mientras que los niveles de anticuerpo humanizado en el Día 19 había caído por debajo de la saturación, pero aún era medible (6,1 µg/ml). Estos datos demuestran una correlación entre los niveles plasmáticos de anticuerpo y la eficacia fisiológica, y sugieren que el nivel de anticuerpo circulante eficaz está en el intervalo de 10-20 µg/ml en el cobaya.

La infiltración leucocítica en el cerebro y en la médula espinal se evaluó en tejido procedente de animales sacrificados en el Día 19. La Tabla 8 muestra diferencias significativas en el grado de infiltración, como función del tratamiento con anticuerpo. La reducción de la infiltración de células T en el cerebro y en la médula espinal, y la infiltración de macrófagos en la médula espinal, fue significativa después del tratamiento con 3 mg/kg. Dosis más bajas tendieron a reducir la infiltración, pero no tuvieron significancia. No hubo ninguna diferencia significativa en el infiltrado celular de macrófagos en la médula espinal, a cualquier dosis. Puesto que la técnica inmunohistoquímica usada para evaluar macrófagos no distingue células residentes de células invasoras, la falta de efecto sobre macrófagos representa probablemente la presencia sostenida de macrófagos residentes y microneuroglíocitos.

La reducción de células T y linfocitos en tejido cerebral, mediante administración del anticuerpo después del establecimiento de la enfermedad, sugiere que el tráfico celular no es un proceso acumulativo, sino un movimiento dinámico de células hacia dentro y hacia fuera del tejido del SNC. De forma importante, los datos sugieren que la interrupción de la entrada de leucocitos en el tejido parenquimal permite al SNC deshacerse del elemento patológico invasor.

Tabla 8

Diferencias significativas en la infiltración de células T y de macrófagos en el cerebro y en la médula espinal en el Día 19

GRUPO PBS	CEREBRO		MÉDULA ESPINAL	
	CÉLULAS T	MACRÓFAGOS	CÉLULAS T	MACRÓFAGOS
3 mg/kg @ H	p=0,001	p=0,005	p=0,007	NS
3 mg/kg # M	p=0,001	p=0,005	p=0,008	NS
1 mg/kg H	NS	NS	NS	NS
0,3 mg/kg H	NS	NS	NS	NS

NS = no significativa

Los datos de hematología revelaron que el tratamiento con anticuerpo 21.6 de ratón o humanizado no provocó diferencia en los recuentos de glóbulos blancos de sangre completa, en el número de células mononucleares y de granulocitos o en el recuento de glóbulos rojos. La dosis elevada de anticuerpo de ratón o humanizado dio como resultado un incremento significativo en los recuentos de plaquetas, en comparación con los animales tratados con PBS (Tabla 9). En cobayas normales, los recuentos de plaquetas son 755 ± 103 células/ml, alrededor del doble de los animales con EAE tratados con PBS. De este modo, el tratamiento con dosis de anticuerpo de ratón y humanizado que invirtió eficazmente la enfermedad, también restauró el recuento de plaquetas a un nivel normal.

Tabla 9

Efecto del tratamiento de anticuerpo sobre el recuento de plaquetas, en animales con EAE	
TRATAMIENTO	PLAQUETAS X 10 ⁻⁶ CÉLULAS/ML
++ Cobayas sin EAE	755 ± 103 (9)
PBS	373,7 ± 167,5 (7)
3 mg/kg @ H	622,2 ± 97,0 (6)**
3 mg/kg # M	587,5 ± 57,8 (6)

1 mg/kg H	578,3 ± 123,2 (6)
0,3 mg/kg H	492,5 ± 168,6 (6)
++ Los recuentos de plaquetas en cobayas sin EAE se determinaron en un experimento separado *p=0,05 frente a PBS	

En conclusión, tanto los anticuerpos 21.6 humanizados como de ratón son eficaces retrasando e invirtiendo los síntomas clínicos en un modelo de animal que simula la esclerosis múltiple en seres humanos. El anticuerpo humanizado es más eficaz, invirtiendo los síntomas, que la misma dosis de anticuerpo de ratón.

5 Aunque la invención anterior se ha descrito con detalle con fines de claridad de comprensión, será obvio que se pueden hacer ciertas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anejas. Todas las publicaciones y documentos de patente citados anteriormente se incorporan aquí como referencia en su totalidad para todos los fines, en el mismo grado que si cada uno de ellos se señalase individualmente.

10

Tabla 4

Alineamiento de secuencias de aminoácidos que conducen al diseño de las regiones variables de cadena ligera de 21.6 humano reconformado								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	Kappa 5 de ratón (SEC ID nº: 42)	Kappa 1 humana (SEC ID nº: 43)	RE1 humana	V _L de 21.6 HR	Comentario
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2	I	I	I	I	I	I*	
3	3	I	Q	Q	Q	Q	Q	
4	4	I	M	M	M	M	M	
5	5	I	T	T	T	T	T	
6	6	I	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	I	S	S	S	S	S	
8	8	I	P	P	P	P	P	
9	9	I	S	S	S	S	S	
10	10	I	S	S	S	S	S	
11	11	I	L	L	L	L	L	
12	12	I	S	S	S	S	S	
13	13	I	A	A	A	A	A	
14	14	I	S	S	S	S	S	
15	15	I	L	L	V	V	V	
16	16	I	G	G	G	G	G	
17	17	I	G	D	D	D	D	
18	18	I	K	R	R	R	R	
19	19	I	V	V	V	V	V	
20	20	I	T	T	T	T	T	
21	21	I	I	I	I	I	I	
22	22	I	T	T	T	T	T	
23	23	FR1	C	C	C	C	C	
24	24	CDR1	K	R	R	Q	K	
25	25	I	T	A	A	A	T*	
26	26	I	S	S	S	S	S*	
27	27	I	Q	Q	Q	Q	Q*	
27A		I	-	D	S	-	-	
27B		I	-	-	L	-	-	
27C		I	-	-	V	-	-	
27D		I	-	-	X	-	-	
27E		I	-	-	X	-	-	
27F		I	-	-	-	-	-	
28	28	I	D	D	S	D	D*	
29	29	I	I	I	I	I	I*	
30	30	I	N	S	S	I	N*	
31	31	I	K	N	N	K	K*	
32	32	I	Y	Y	Y	Y	Y*	
33	33	I	M	L	L	L	M*	
34	34	CDR1	A	N	A	N	A	
35	35	FR2	W	W	W	W	W	

ES 2 424 292 T3

Alineamiento de secuencias de aminoácidos que conducen al diseño de las regiones variables de cadena ligera de 21.6 humano reconformado								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	Kappa 5 de ratón (SEC ID nº: 42)	Kappa 1 humana (SEC ID nº: 43)	RE1 humana	V _L de 21.6 HR	Comentario
36	36	I	Y	Y	Y	Y	Y	
37	37	I	Q	Q	Q	Q	Q	
38	38	I	H	Q	Q	Q	Q	
39	39	I	K	K	K	T	T	K en CAMPATH-1H
40	40	I	P	P	P	P	P	
41	41	I	G	G	G	G	G	
42	42	I	K	G	K	K	K	
43	43	I	R	S	A	A	A	Considérese R en otras versiones
44	44	I	P	P	P	P	P	
45	45	I	R	K	K	K	<u>R</u>	Apoya el bucle de L2, considérese K en otras versiones
46	46	I	L	L	L	L	L	
47	47	I	L	L	L	L	L	
48	48	I	I	I	I	I	I*	
49	49	FR2	H	Y	Y	Y	<u>H</u>	En la mitad del sitio de unión, potencial para interactuar con antígeno, considérese Y en otras versiones
50	50	CDR2	Y	Y	A	E	Y*	
51	51	I	T	A	A	A	T*	
52	52	I	S	S	S	S	S*	
53	53	I	A	R	S	N	A	
54	54	I	L	L	L	L	L	
55	55	I	Q	H	E	Q	Q	
56	56	CDR2	P	S	S	A	P	
57	57	FR3	G	G	G	G	G	
58	58	I	I	V	V	V	I	Puede estar apoyando L2, considérese V en otras versiones
59	59	I	P	P	P	P	P	
60	60	I	S	S	S	S	S	
61	61	I	R	R	R	R	R	
62	62	I	F	F	F	F	F	
63	63	I	S	S	S	S	S	
64	64	I	G	G	G	G	G*	
65	65	I	S	S	S	S	S	
66	66	I	G	G	G	G	G	
67	67	I	S	S	S	S	S	
68	68	I	G	G	G	G	G	
69	69	I	R	T	T	T	R	Adyacente a L1, sobre la superficie próxima al sitio de unión
70	70	I	D	D	D	D	D	
71	71	I	Y	Y	F	Y	Y*	F en CAMPATH-1H
72	72	I	S	S	T	T	T	
73	73	I	F	L	L	F	F	
74	74	I	N	T	T	T	T	
75	75	I	I	I	I	I	I	
76	76	I	S	S	S	S	S	
77	77	I	N	N	S	S	S	
78	78	I	L	L	L	L	L	
79	79	I	E	E	Q	Q	Q	
80	80	I	P	Q	P	P	P	
81	81	I	E	E	E	E	E	

Alineamiento de secuencias de aminoácidos que conducen al diseño de las regiones variables de cadena ligera de 21.6 humano reconformado								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	Kappa 5 de ratón (SEC ID nº: 42)	Kappa 1 humana (SEC ID nº: 43)	RE1 humana	V _L de 21.6 HR	Comentario
82	82	I	D	D	D	D	D	
83	83	I	I	I	F	I	I	
84	84	I	A	A	A	A	A	
85	85	I	T	T	T	T	T	
86	86	I	Y	Y	Y	Y	Y	
87	87	I	Y	F	Y	Y	Y	
88	88	FR3	C	C	C	C	C	
89	89	CDR3	L	Q	Q	Q	L	
90	90	I	Q	Q	Q	Q	Q*	
91	91	I	Y	G	Y	Y	Y*	
92	92	I	D	N	N	Q	D*	
93	93	I	N	T	S	S	N*	
94	94	I	L	L	L	L	L*	
95		I	-	P	P	P	-	
95A		I	-	P	E		-	
95B		I	-		-	-	-	
95C		I	-	-	-	-	-	
95D		I	-	-	-	-	-	
95E		I	-	-	-	-	-	
95F		I	-	-	-	-	-	
96	95	I	W	R	W	Y	W*	
97	96	CDR3	T	T	T	T	T	
98	97	FR4	F	F	F	F	F	
99	98	I	G	G	G	G	G	
100	99	I	G	G	Q	Q	Q	
101	100	I	G	G	G	G	G	
102	101	I	T	T	T	T	T	
103	102	I	K	K	K	K	K	
104	103	I	L	L	V	L	V	Como en CAMPATH-1H
105	104	I	E	E	E	Q	E	Como en CAMPATH-1H
106	105	I	I	I	I	I	I	
106A		I	-	-	-	-	-	
107	106	FR4	K	K	K	T	<u>K</u>	Como en CAMPATH-1H

Leyenda: (Kabat) numeración según Kabat *et al.*, *más arriba*; (#) numeración secuencial como se usó en el modelo molecular; (21.6 de ratón) secuencia de aminoácidos de la región V_L de anticuerpo 21.6 de ratón; (kappa 5 de ratón) secuencia de consenso de las regiones V_L de kappa de ratón del subgrupo 5 (Kabat *et al.*, *más arriba*); (kappa 1 humana) secuencia de consenso de las regiones V_L humanas del subgrupo 1 (Kabat *et al.*, *más arriba*); (RE1 humana) secuencia de aminoácidos de una región V_L humana (Palm *et al.* (1975), *más arriba*); (V_L de 21.6 HR) secuencia de aminoácidos de una versión L1 de la región V_L de 21.6 humano reconformado; (*) restos que son parte de las estructuras canónicas para los bucles de CDR (Chothia *et al.*, *más arriba*); (subrayado) restos en las FR en las que se cambió el resto de aminoácido.

Tabla 5

Alineamiento de secuencias de aminoácidos que conducen al diseño de las regiones variables de cadena pesada de 21.6 humano reconformado								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón (SEC ID nº: 44)	Humana 1 (SEC ID nº: 45)	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
1	1	FR1	E	E	Q	Q	Q	
2	2	I	V	V	V	V	V	
3	3	I	Q	Q	Q	Q	Q	
4	4	I	L	L	L	L	L	
5	5	I	Q	Q	V	V	V	
6	6	I	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	I	S	S	S	S	S	

ES 2 424 292 T3

Alineamiento de secuencias de aminoácidos que conducen al diseño de las regiones variables de cadena pesada de 21.6 humano reconformado								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón (SEC ID nº: 44)	Humana 1 (SEC ID nº: 45)	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
8	8	I	G	G	G	G	G	
9	9	I	A	A	A	A	A	
10	10	I	E	E	E	E	E	
11	11	I	L	L	V	V	V	
12	12	I	V	V	K	K	K	
13	13	I	K	K	K	K	K	
14	14	I	P	P	P	P	P	
15	15	I	G	G	G	G	G	
16	16	I	A	A	A	A	A	
17	17	I	S	S	S	S	S	
18	18	I	V	V	V	V	V	
19	19	I	K	K	K	K	K	
20	20	I	L	L	V	V	V	
21	21	I	S	S	S	S	S	
22	22	I	C	C	C	C	C	
23	23	I	T	T	K	K	K	
24	24	I	A	A	A	A	A	
25	25	I	S	S	S	S	S	
26	26	I	G	G	G	G	G*	
27	27	I	F	F	Y	Y	F*	Estructura canónica H1, considérese Y en otras versiones
28	28	I	N	N	T	T	N*	Estructura canónica H1, sobre la superficie
29	29	I	I	I	F	F	I*	Estructura canónica H1, considérese F en otras versiones
30	30	FR1	K	K	T	T	K*	Estructura canónica H1, sobre la superficie
31	31	CDR1	D	D	S	S	D*	
32	32	I	T	T	Y	Y	T*	
33	33	I	Y	Y	A	A	Y	
34	34	I	I	M	I	M	I*	
35	35	I	H	H	S	H	H	
35A		I	-	-	-	-	-	
35B		CDR1	-	-	-	-	-	
36	36	FR2	C	W	W	W	W	Resto enterrado, no papel especial obvio para C
37	37	I	V	V	V	V	V	
38	38	I	K	K	R	R	R	
39	39	I	Q	Q	Q	Q	Q	
40	40	I	R	R	A	A	A	
41	41	I	P	P	P	P	P	
42	42	I	E	E	G	G	G	
43	43	I	Q	Q	Q	Q	Q	
44	44	I	G	G	G	R	R	Empaquetamiento V _L -V _H , considérese G en otras versiones
45	45	I	L	L	L	L	L	
46	46	I	E	E	E	E	E	
47	47	I	W	W	W	W	W	
48	48	I	I	I	M	M	M	
49	49	FR2	G	G	G	G	G	
50	50	CDR2	R	R	W	W	R	
51	51	I	I	I	I	I	I	
52	52	I	D	D	N	N	D	
52A	53	I	P	P	P	A	P*	

ES 2 424 292 T3

Alineamiento de secuencias de aminoácidos que conducen al diseño de las regiones variables de cadena pesada de 21.6 humano reconformado								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón (SEC ID nº: 44)	Humana 1 (SEC ID nº: 45)	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
52B		I	-	-	Y	-	-	
52C		I	-	-	-	-	-	
33	54	I	A	A	G	G	A*	
54	55	I	N	N	N	N	N*	
55	56	I	G	G	G	G	G*	
56	57	I	Y	N	D	N	Y	
57	58	I	T	T	T	T	T	
58	59	I	K	K	N	K	K	
59	60	I	Y	Y	Y	Y	Y	
60	61	I	D	D	A	S	D	
61	62	I	P	P	Q	Q	P	
62	63	I	K	K	K	K	K	
63	64	I	F	F	F	F	F	
64	65	I	Q	Q	Q	Q	Q	
65	66	CDR2	G	G	G	G	G	
66	67	FR3	K	K	R	R	R	
67	68	I	A	A	V	V	V	
68	69	I	T	T	T	T	T	
69	70	I	I	I	I	I	I	
70	71	I	T	T	T	T	T	
71	72	I	A	A	A	R	A*	Estructura canónica H2, que apoya H2
72	73	I	D	D	D	D	D	
73	74	I	T	T	T	T	T	
74	75	I	S	S	S	S	S	
75	76	I	S	S	T	A	A	
76	77	I	N	N	S	S	S	
77	78	I	T	T	T	T	T	
78	79	I	A	A	A	A	A	
79	80	I	Y	Y	Y	Y	Y	
80	81	I	L	L	M	M	M	
81	82	I	Q	Q	E	E	E	
82	83	I	L	L	L	L	L	
82A	84	I	S	S	S	S	S	
82B	85	I	S	S	S	S	S	
82C	86	I	L	L	L	L	L	
83	87	I	T	T	R	R	R	
84	88	I	S	S	S	S	S	
85	89	I	E	E	E	E	E	
86	90	I	D	D	D	D	D	
87	91	I	T	T	T	T	T	
88	92	I	A	A	A	A	A	
89	93	I	V	V	V	V	V	
90	94	I	Y	Y	Y	Y	Y	
91	95	I	F	Y	Y	Y	Y	
92	96	I	C	C	C	C	C	
93	97	I	A	A	A	A	A	
94	98	FR3	R	R	R	R	R*	
95	99	CDR3	E	G	A	G	E	
96	100	I	G	Y	P	G	G	
97	101	I	Y	Y	G	Y	Y	
98	102	I	Y	Y	Y	Y	Y	
99	103	I	G	Y	G	G	G	
100	104	I	N	D	S	S	N	
100A	105	I	Y	S	G	G	Y	
100B	106	I	G	X	G	S	G	
100C	107	I	V	V	G	-	V	

Alineamiento de secuencias de aminoácidos que conducen al diseño de las regiones variables de cadena pesada de 21.6 humano reconformado								
Kabat	Nº	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón (SEC ID nº: 44)	Humana 1 (SEC ID nº: 45)	21/28'CL humana	V _H de 21.6 HR	Comentario
100D	108	I	Y	G	C	-	Y	
100E	109	I	A	Y	Y	-	A	
100F	110	I	M	Y	R	-	M	
100G		I	-	A	G	-	-	
100H		I	-	M	D	-	-	
100I		I	-	-	Y	-	-	
100J		I	-	-	X	-	-	
100K		I	-	-	F	-	-	
101	111	I	D	D	D	N	D	
102	112	CDR3	Y	Y	Y	Y	Y	
103	113	FR4	W	W	W	W	W	
104	114	I	G	G	G	G	G	
105	115	I	Q	Q	Q	Q	Q	
106	116	I	G	G	G	G	G	
107	117	I	T	T	T	T	T	
108	118	I	S	X	L	L	L	
109	119	I	V	V	V	V	V	
110	120	I	T	T	T	T	T	
111	121	I	V	V	V	V	V	
112	122	I	S	S	S	S	S	
113	123	FR4	S	S	S	S	S	

Leyenda: (Kabat) numeración según Kabat *et al.*, *más arriba*; (#) numeración secuencial como se usó en el modelo molecular; (21.6 de ratón) secuencia de aminoácidos de la región V_H de anticuerpo 21.6 de ratón; (2c de ratón) secuencia de consenso de las regiones V_H de ratón del subgrupo 2c (Kabat *et al.*, *más arriba*); (1 humana) secuencia de consenso de las regiones V_H humanas del subgrupo 1 (Kabat *et al.*, *más arriba*); (21/28'CL humana) secuencia de aminoácidos de una región V_H humana (Dersimonian *et al.* (1987), *más arriba*); (V_H de 21.6 HR) secuencia de aminoácidos de la versión H1 de la región V_H de 21.6 humano reconformado; (*) restos que son parte de las estructuras canónicas para los bucles de CDR (Chothia *et al.*, *más arriba*); (subrayado) restos en las FR humanas en las que se cambió el resto de aminoácido.

Listado de secuencias

(1) INFORMACIONES GENERALES

5

(i) SOLICITANTE: Bendig, Mary M.
 Legar, Olivier J.
 Saldaña, Jose
 Jones, S. Tarran

10

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Anticuerpos Humanizados contra la Molécula de Adhesión Leucocitaria VLA-4
 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 45
 (iv) DIRECCIÓN POSTAL:

15

(A) DESTINATARIO: Townsend and Townsend Khourie and Crew
 (B) DIRECCIÓN: One Market Plaza, Steuart Tower, Suite 2000
 (C) CIUDAD: San Francisco
 (D) POBLACIÓN: California
 (E) PAÍS: USA
 (F) CÓDIGO POSTAL: 94105

20

(v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

25

(A) TIPO DE SOPORTE: disquete
 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 (D) PROGRAMA: Patentln Release #1,0, versión #1,25

30

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/186.269
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 25 de enero de 1994
- (C) CLASIFICACIÓN:

5 (viii) INFORMACIÓN DEL AGENTE/ABOGADO:

- (A) NOMBRE: Smith, William L.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 30.223
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/CASO: 15270-14

10 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

- (A) TELÉFONO: 415-543-9600
- (B) FAX: 415-543-5043

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 483 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: doble
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 53..430

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 1:

ATGAGGGCCC	CTGCTCAGAT	TTTTGGATTC	TTGGTCAGGA	GACGTTGTAG	AA	ATG	55									
						Met										
						1										
AGA	CCG	TCT	ATT	CAG	TTC	CTG	GGG	CTC	TTG	TTG	TTC	TGG	CTT	CAT	GGT	103
Arg	Pro	Ser	Ile	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe	Trp	Leu	His	Gly	
			5					10					15			
GCT	CAG	TGT	GAC	ATC	CAG	ATG	ACA	CAG	TCT	CCA	TCC	TCA	CTG	TCT	GCA	151
Ala	Gln	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	
			20				25						30			

TCT	CTG	GGA	GGC	AAA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	AAG	ACA	AGC	CAA	GAC	ATT	199
Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Thr	Ser	Gln	Asp	Ile	
	35					40					45					
AAC	AAG	TAT	ATG	GCT	TGG	TAC	CAA	CAC	AAG	CCT	GGA	AAA	CGT	CCT	AGG	247
Asn	Lys	Tyr	Met	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Arg	Pro	Arg	
	50				55					60					65	
CTG	CTC	ATA	CAT	TAC	ACA	TCT	GCA	TTA	CAG	CCA	GGC	ATC	CCA	TCA	AGG	295
Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Gln	Pro	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	
				70					75					80		
TTC	AGT	GGA	AGT	GGG	TCT	GGG	AGA	GAT	TAT	TCC	TTC	AAC	ATC	AGC	AAC	343
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ser	Phe	Asn	Ile	Ser	Asn	
			85					90					95			
CTG	GAG	CCT	GAA	GAT	ATT	GCA	ACT	TAT	TAT	TGT	CTA	CAG	TAT	GAT	AAT	391
Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Asn	
		100					105					110				
CTG	TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGGGCTGATG			440
Leu	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
	115					120					125					
CTGCACCAAC	TGTATCCATC	TTCCCACCAT	CCACCCGGGA	TCC												483

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 2:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 126 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Met	Arg	Pro	Ser	Ile	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Trp	Leu	His	
1				5					10				15		
Gly	Ala	Gln	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
			20					25					30		
Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Thr	Ser	Gln	Asp
		35					40						45		
Ile	Asn	Lys	Tyr	Met	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Arg	Pro
	50					55					60				
Arg	Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Gln	Pro	Gly	Ile	Pro	Ser
	65				70					75					80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ser	Phe	Asn	Ile	Ser
				85					90					95	
Asn	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp
			100					105					110		
Asn	Leu	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
		115					120					125			

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 470 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: doble
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..420

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

ATG AAA TGC AGC TGG GTC ATG TTC TTC CTG ATG GCA GTG GTT ACA GGG	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Met Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
1 5 10 15	
GTC AAT TCA GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AAG	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys	
20 25 30	
CCA GGG GCC TCA GTC AAG TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
35 40 45	
AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGT GTG AAG CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG	192
Lys Asp Thr Tyr Ile His Cys Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
50 55 60	
GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AAT GGT TAT ACT AAA TAT GAC	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp	
65 70 75 80	
CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATA ACA GCT GAC ACA TCC TCC AAC	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
85 90 95	
ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC	336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
TAT TTC TGT GCT AGA GAG GGA TAT TAT GGT AAC TAC GGG GTC TAT GCT	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala	
115 120 125	
ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCCTCAGCCA	430
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val	
130 135 140	
AAACGACACC CCCATCTGTC TATCCACTGG CCCGGGATCC	470

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 140 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

ES 2 424 292 T3

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

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala
 115 120 125
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 130 135 140

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 5:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 106 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 6:

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ile Lys Tyr
20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Tyr
85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
100          105
  
```

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 106 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácidos
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 7:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 8:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 9:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 123 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Cys Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 119 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 123 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 11:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 12:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 119 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 12:

ES 2 424 292 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 13:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 119 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 14:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 406 pares de base

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: doble
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 16..393

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 14:

AAGCTTGCCG	CCACC	ATG	AGA	CCG	TCT	ATT	CAG	TTC	CTG	GGG	CTC	TTG	TTG	51		
		Met	Arg	Pro	Ser	Ile	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu			
		1				5					10					
TTC	TGG	CTT	CAT	GGT	GCT	CAG	TGT	GAC	ATC	CAG	ATG	ACA	CAG	TCT	CCA	99
Phe	Trp	Leu	His	Gly	Ala	Gln	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	
		15					20					25				
TCC	TCA	CTG	TCT	GCA	TCT	CTG	GGA	GGC	AAA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	AAG	147
Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	
		30				35					40					
ACA	AGC	CAA	GAC	ATT	AAC	AAG	TAT	ATG	GCT	TGG	TAC	CAA	CAC	AAG	CCT	195
Thr	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Lys	Tyr	Met	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	
45					50					55					60	
GGA	AAA	CGT	CCT	AGG	CTG	CTC	ATA	CAT	TAC	ACA	TCT	GCA	TTA	CAG	CCA	243
Gly	Lys	Arg	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Gln	Pro	
				65					70					75		
GGC	ATC	CCA	TCA	AGG	TTC	AGT	GGA	AGT	GGG	TCT	GGG	AGA	GAT	TAT	TCC	291
Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ser	
			80					85					90			
TTC	AAC	ATC	AGC	AAC	CTG	GAG	CCT	GAA	GAT	ATT	GCA	ACT	TAT	TAT	TGT	339
Phe	Asn	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
			95				100					105				
CTA	CAG	TAT	GAT	AAT	CTG	TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	387
Leu	Gln	Tyr	Asp	Asn	Leu	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
	110					115					120					
ATC	AAA	CGTGAGTGG	TCC													406
Ile	Lys															
125																

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 126 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 15:

ES 2 424 292 T3

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
 1 5 10 15
 Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp
 35 40 45
 Ile Asn Lys Tyr Met Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Arg Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Asn Ile Ser
 85 90 95
 Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
 100 105 110
 Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 16:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 454 pares de base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 16..441

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

AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC	51
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala	
1 5 10	
GTG GCT CCT GGG GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC	99
Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala	
15 20 25	
GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA GCT AGC	147
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser	
30 35 40	
GGT TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT	195
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro	
45 50 55 60	
GGC CAA AGG CTG GAG TGG ATG GGA AGG ATT GAT CCT GCG AAT GGT TAT	243
Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr	
65 70 75	
ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GCA GAC	291
Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp	
80 85 90	
ACC TCT GCC AGC ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG	339
Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu	
95 100 105	
GAC ACT GCA GTC TAC TAC TGC GCC AGA GAG GGA TAT TAT GGT AAC TAC	387
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr	
110 115 120	
GGG GTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC	435
Gly Val Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
125 130 135 140	
TCC TCA GGTGAGTGGG TCC	454
Ser Ser	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 17:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 142 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala
 115 120 125
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 18:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

15 CAGAAAGCTT GCCGCCACCA TGAGACCGTC TATTCAG 37

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 19:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

30 CCGAGGATCC ACTCACGTTT GATTTCCAGC TTGGT 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 20:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

5 CAGAAAGCTT GCCGCCACCA TGAAATGCAG CTGGGTC 37

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

20 CCGAGGATCC ACTCACCTGA GGAGACGGTG ACT 33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

35 GATGGTGACT CTATCTCCTA CAGATGCAGA CAGTGAGGA 39

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

50 CTGTAGGAGA TAGAGTCACC ATCACTTGCA AG 32

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

60

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

65 AGGAGCTTTT CCAGGTGTCT GTTGGTACCA AGCCATATA 39

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 41 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

ACCAACAGAC ACCTGGAAAA GCTCCTAGGC TGCTCATACA T 41

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

GCAGGCTGCT GATGGTGAAA GTATAATCTC TCCCAGACCC 40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 42 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

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

ACTTTCACCA TCAGCAGCCT GCAGCCTGAA GATATTGCAA CT 42

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 59 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 28:

CCGAGGATCC ACTCACGTTT GATTTCCACC TTGGTGCCTT GACCGAACGT CCACAGATT 59

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 29:

10 GGAAAAGCTC CTAGGCTGCT CATATATTAC ACA 33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 30:

25 CCGAGGATCC ACTCACGTTT GATTTCACACC TTTGTGCC 38

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 51 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 31:

40 AACCCAGTGT ATATAGGTGT CTTAATGTT GAAACCGCTA GCTTTACAGC T 51

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45

- (A) LONGITUD: 67 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 32:

AAAGACACCT ATATACACTG GGTTAGACAG GCCCCTGGCC AAAGGCTGGA GTGGATGGGA 60

55

AGGATTG 67

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 33:

GACCCGGCCC TGGAACTTCG GGTCAT 26

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 66 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 34:

GACCCGAAGT TCCAGGGCAG GGTCACCATC ACCGCAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC 60
ATGGAA 66

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 64 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 35:

CCATAGCATA GACCCCGTAG TTACCATAAT ATCCCTCTCT GGCGCAGTAG TAGACTGCAG 60
TGTC 64

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 63 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 36:

GGTAACTACG GGGTCTATGC TATGGACTAC TGGGGTCAAG GAACCCTTGT CACCGTCTCC 60
TCA 63

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 37:

CCAGGGCCGG GTCACCATCA CCAGAGACAC CTCTGCC 37

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 38:

CAGGCCCTG GCCAAGGGCT GGAGTGG 27

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 39:

TACGCAAACC GCCTCTC 17

40

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (cebador)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 40:

GAGTGCACCA TATGCGGT 18

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 116 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 41:

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

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 109 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 42:

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

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 114 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 43:

```

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

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 125 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 44:

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
                20           25           30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35           40           45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
        50           55           60
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65           70           75
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85           90           95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Xaa Val Gly Tyr Tyr Ala Met
                100           105           110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
        115           120           125
    
```

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 129 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) NÚMERO DE HEBRAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº: 45:

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Tyr	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	
	50					55					60					
Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	
65					70					75					80	
Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
Cys	Ala	Arg	Ala	Pro	Gly	Tyr	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asp
			100					105					110			
Tyr	Xaa	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
	115					120					125					

RE1VINDICACIONES

1. Inmunoglobulina humanizada para su utilización en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, que comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada:

(1) comprendiendo la cadena ligera humanizada tres regiones que determinan la complementariedad, (CDR1, CDR2 y CDR3), que tienen secuencias de aminoácidos de las correspondientes regiones que determinan la complementariedad, de una cadena ligera inmunoglobulínica 21.6 de ratón, de SEC ID nº: 2, (como se muestra en la Figura 1), y un armazón de región variable procedente de una secuencia de armazón de región variable de cadena ligera kappa humana, excepto en al menos una posición seleccionada de entre un primer grupo que consiste en L45, L49, L58 y L69, en la que la posición del aminoácido está ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del armazón de la región variable de cadena ligera inmunoglobulínica 21.6 de ratón; y

(2) comprendiendo la cadena pesada humanizada tres regiones que determinan la complementariedad, (CDR1, CDR2 y CDR3), que tienen secuencias de aminoácidos procedentes de las regiones correspondientes que determinan la complementariedad de una cadena pesada inmunoglobulínica 21.6 de ratón, de SEC ID nº: 4, (como se muestra en la Figura 2), y un armazón de región variable procedente de una secuencia de armazón de región variable de cadena pesada humana, excepto en al menos una posición seleccionada de entre un grupo que consiste en H27, H28, H29, H30, H44, H71, en la que la posición del aminoácido está ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del armazón de la región variable de cadena pesada inmunoglobulínica 21.6 de ratón;

en la que la inmunoglobulina se une específicamente a un ligando VLA-4 con una afinidad de unión que tiene un límite inferior de 10^7 M^{-1} y un límite superior de cinco veces la afinidad de unión de la inmunoglobulina 21.6 de ratón que tiene la cadena ligera de SEC ID nº: 2 y la cadena pesada de SEC ID nº: 4.

2. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 1, en la que el armazón de región variable de cadena ligera humanizada procede de una secuencia de armazón de la región variable de RE1, excepto en al menos una posición seleccionada de entre el primer grupo, y excepto en al menos una posición seleccionada de entre un tercer grupo que consiste en las posiciones L104, L105 y L107, en la que la posición del aminoácido está ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de una cadena ligera kappa de una inmunoglobulina humana distinta de RE1.

3. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el armazón de región variable de cadena pesada humanizada procede de una secuencia de armazón de la región variable de 21/28'CL.

4. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el armazón de región variable de cadena ligera humanizada comprende al menos tres aminoácidos de la inmunoglobulina 21.6 de ratón en las posiciones en el primer grupo, y tres aminoácidos de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina humana distinta de RE1, en las posiciones en el tercer grupo, y el armazón de región variable de cadena pesada humanizada comprende al menos cinco aminoácidos procedentes de la inmunoglobulina 21.6 de ratón, en las posiciones en el segundo grupo.

5. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 4, en la que el armazón de región variable de cadena ligera humanizada es idéntico a la secuencia del armazón de región variable de cadena ligera RE1, excepto por al menos las tres posiciones del primer grupo, y las tres posiciones del tercer grupo, y el armazón de región variable de cadena pesada es idéntico a la secuencia de armazón de la región variable de cadena pesada de 21/28'CL, excepto para al menos las cinco posiciones del segundo grupo.

6. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 5, en la que al menos las tres posiciones del primer grupo son posiciones L45, L58 y L69, y al menos cinco posiciones del segundo grupo son las posiciones H27, H28, H29, H30 y H71.

7. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 6, en la que la cadena ligera humanizada comprende regiones que determinan la complementariedad, que son idénticas a las correspondientes regiones que determinan la complementariedad de la cadena pesada de 21.6 de ratón, y la cadena pesada humanizada comprende regiones que determinan la complementariedad, que son idénticas a las correspondientes regiones que determinan la complementariedad de la cadena pesada de 21.6 de ratón, excepto que la región CDR3 de la cadena pesada humanizada puede comprender o no un resto de fenilalanina en la posición H98.

8. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 7, en la que la CDR3 de la cadena pesada humanizada comprende una fenilalanina en la posición H98.

9. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácido de la región variable de cadena ligera madura es la secuencia denominada La (SEC ID n°:7) en la Figura 6, o la secuencia denominada Lb (SEC ID n°: 8) en la Figura 6.
- 5 10. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 1 o reivindicación 9, en la que la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada madura se selecciona de: Ha (SEC ID n°:11), Hb (SEC ID n°:12) o Hc (SEC ID n°:13), según se muestra en la Figura 7.
- 10 11. Inmunoglobulina humanizada para su utilización según la reivindicación 10, que tiene un dominio de región constante, teniendo el dominio de región constante una función efectora, o careciendo de una función efectora, preferiblemente siendo capaz dicha función efectora de la fijación al complemento o de la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

```

          atgagggcccctgctcagatttttggattcttggtcaggagacgttgt
1  -----
          tactcccggggacgagtctaaaaacctaagaaccagtcctctgcaaca
ACTAGTCGACATGAGGGCCCCTGCTCAGTTTTTTGGCTTCTTG-3'
          A          A C    AA
          CEBADOR DE MKV4

          agaaatgagaccgtctattcagttcctggggctcttgttgttctggcttcatgg
49 -----
          tctttactctggcagataagtcaaggaccccgagaacaacaagaccgaagtacc

          [M R P S I Q F L G L L L F W L H G
          LÍDER

          tgctcagtggtgacatccagatgacacagtcctccatcctcactgtctgcatctct
103 -----
          acgagtcacactgtaggtctactgtgtcagaggtaggagtgacagacgtagaga

          A Q C][D I Q M T Q S P S S L S A S L
          FR1

          gggaggcaaagtcaccatcacttgcaagacaagccaagacattaacaagtatat
157 -----
          ccctccgtttcagtggtagtgaaacgttctgttcggttctgtaattgttcatata

          G G K V T I T C][K T S Q D I N K Y M
          CDR1

          ggcttggtagcaacacaagcctggaaaacgtcctaggctgctcatacattacac
211 -----
          ccgaaccatggttgtggtcggaccttttgcaggatccgacgagtatgtaatgtg

          A][W Y Q H K P G K R P R L L I H][Y T
          FR2

          atctgcattacagccaggcatcccatcaaggttcagtggaagtgggtctgggag
265 -----
          tagacgtaatgtcgggtccgtagggtagttccaagtcaccttcacccagaccctc

          S A L Q P][G I P S R F S G S G S G R
          CDR2
    
```

FIG. 1-1.

```

319 agattattccttcaacatcagcaacctggagcctgaagatattgcaacttatta
-----
tctaataaggaagttgtagtcgttggacctcggacttctataacgttgaataat

  D Y S F N I S N L E P E D I A T Y Y
    FR3

373 ttgtctacagtatgataatctgtggacgttcggaggagccaccaagctggaaat
-----
aacagatgtcatactattagacacctgcaagccacctccgtggttcgaccttta

  C ][ L Q Y D N L W T ][ F G G G T K L E I
    CDR3                               FR4

                                CEBADOR KAPPA DE RATÓN
                                3' -GTAGAAGGGTGGTAGGTGGGCCCT
427 caaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccaccggga
-----
gtttgcccgactacgacgtggttgacataggtagaagggtggtaggtgggcct

  K]

AGG-5'
tcc
481 ---
agg

```

FIG. 1-2.

atgaaatgcagctgggtcatgttcttcctgatggcagtggttacaggg
 1 -----
 tactttacgtcgacccagtacaagaaggactaccgtcaccaatgtccc
 ACTAGTCGACATGAAATGCAGCTGGGTCATCTTCTTC-3'

G

CEBADOR MVH1

[M K C S W V M F F L M A V V T G

LÍDER

gtcaattcagaggttcagctgcagcagctctggggcagagcttgtgaagccaggg
 49 -----
 cagttaagtctccaagtcgacgctcgtcagaccccgtctcgaacacttcgggtccc

V N S][E V Q L Q Q S G A E L V K P G
 FR1

gcctcagtcgaagttgtcctgcacagcttctggcttcaacattaaagacacctat
 103 -----
 cggagtcagttcaacaggacgtgtcgaagaccgaagttgtaatttctgtggata

A S V K L S C T A S G F N I K][D T Y
 CDR1

atacactgtgtgaagcagaggcctgaacagggcctggagtgattggaaggatt
 157 -----
 tatgtgacacacttcgtctccggacttgtcccggacctcacctaaccttcctaa

I H][C V K Q R P E Q G L E W I G][R I
 FR2

gatcctgcgaatggttataactaaatagacccgaagttccagggcaaggccact
 211 -----
 ctaggacgcttaccaatagatttatactgggcttcaaggtcccgttccgggtga

D P A N G Y T K Y D P K F Q G][K A T
 CDR2

ataacagctgacacatcctccaacacagcctacctgcagctcagcagcctgaca
 265 -----
 tattgtcgactgtgtaggaggttgtgtcggatggacgtcgagtcgtcggactgt

I T A D T S S N T A Y L Q L S S L T
 FR3

FIG. 2-1.

319 tctgaggacactgccgtctatctgtgctagagagggatattatggtaactac

agactcctgtgacggcagataaagacacgatctctccctataataccattgatg
S E D T A V Y F C A R][E G Y Y G N Y
CDR3

373 ggggtctatgctatggactactggggtcaaggaaacctcagtcaccgtctcctca

ccccagatacgataacctgatgaccccagttccttggagtcagtggcagaggagt
G V Y A M D Y][W G Q C T S V T V S S]

CEBADOR GAMMA-1 DE RATÓN

3' -GTAGACAGATAGGTGACCGGGCCCTAGG-5

427 gccaaaacgacacccccatctgtctatccactggcccgggatcc

cggttttgctgtgggggtagacagataggtgaccgggccctagg
S S]

FIG. 2-2.

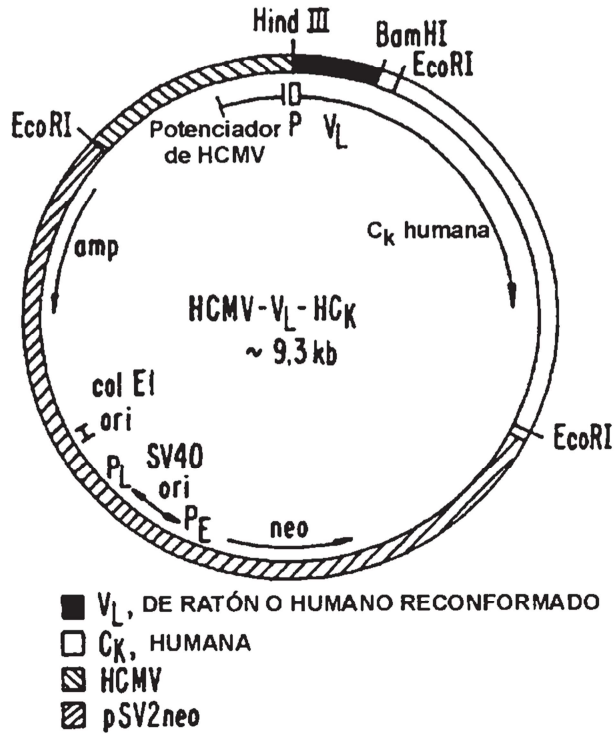


FIG. 3A.

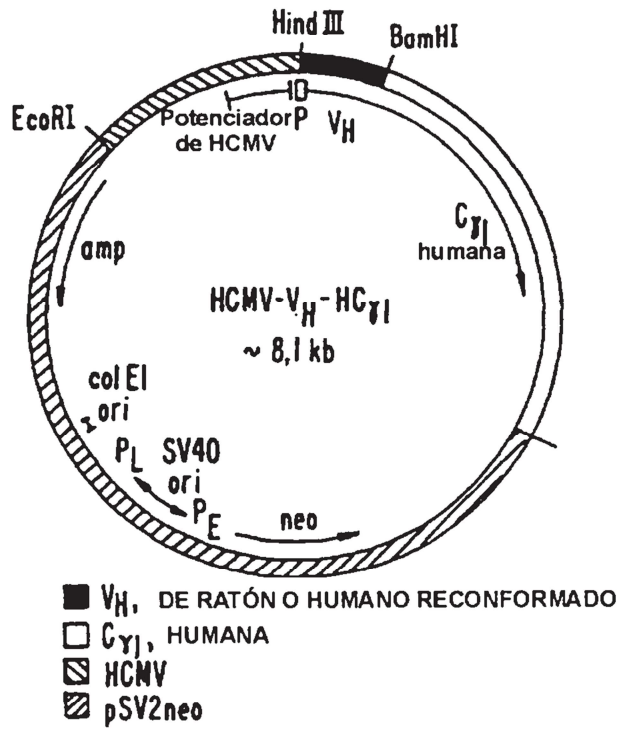


FIG. 3B.

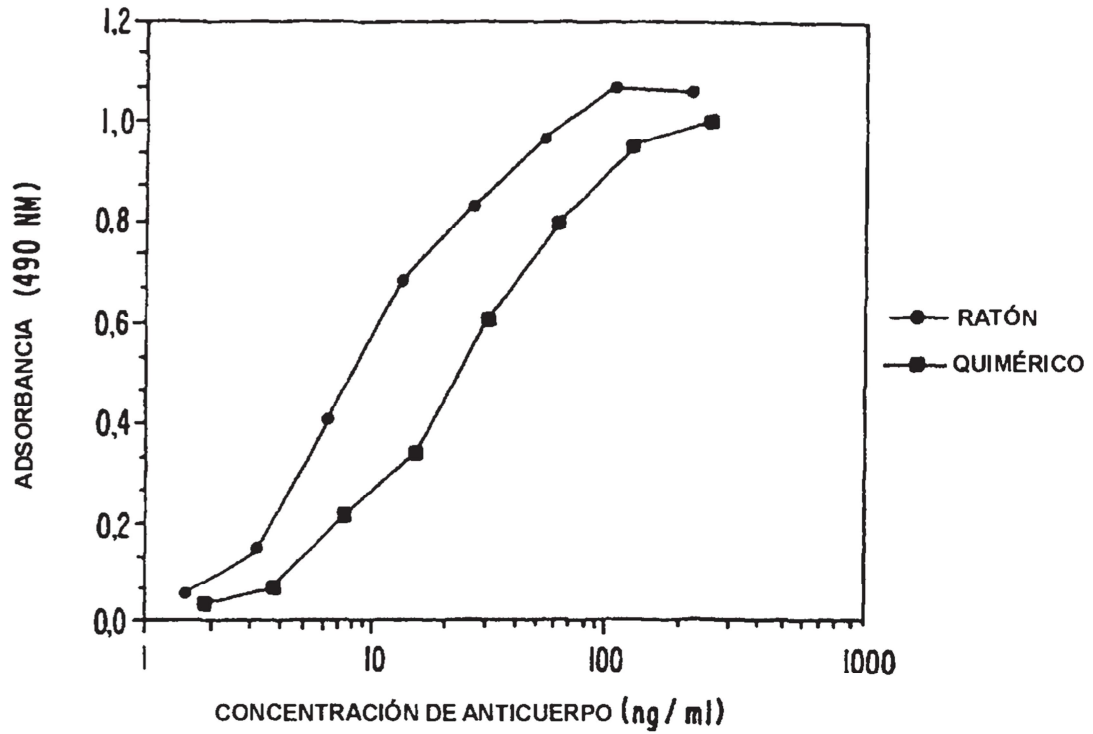


FIG. 4.

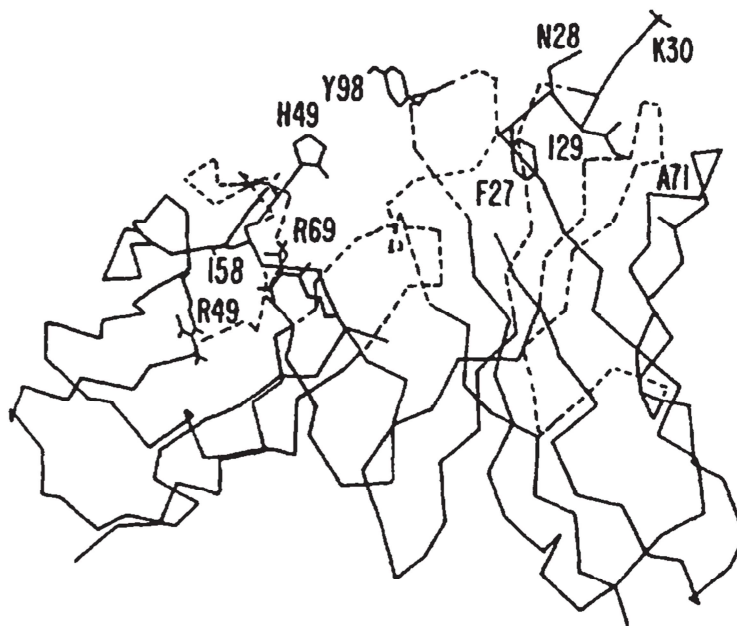


FIG. 5.

```

FR1          CDR1          FR2          CDR2
1           2           3           4           5
12345678901234567890123 45678901234 567890123456789 0123456
*
21.6 DIQMTQSPSSLSASLGKVTITC KTSQDINKYMA WYQHKPGKRPRLLIH YTSALQP
REI DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC QASQDIIKYLN WYQQTGKAPKLLIY EASNLQA
La  DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC KTSQDINKYMA WYQQTGKAPRLLIH YTSALQP
Lb  -----R-----

FR3          CDR3          FR4
6           7           8           9           10
78901234567890123456789012345678 901234567 8901234567
*
21.6 GIPSRFSGSGGRDYSFNISNLEPEDIATYIC LQYDNL-WT FGGGTKLEIK
REI GVPSRFSGSGGTDYFTTISLQPEDIAITYC QQYQSLPYT FGQGTKLQIT
La  GIPSRFSGSGGRDYFTTISLQPEDIAITYC LQYDNL-WT FGQGTKVEIK
Lb  -I-----R-----VE-K

```

FIG. 6.

```

FR1      CDR1      FR2      CDR2
 1      2      3      4      5      6
123456789012345678901234567890 12345 67890123456789 012A3456789012345
          **** * * * *
21.6 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK DTYIH CVKQRPEQGLEWIG RIDPANGYTKYDPKFKQG
          **** * * * *
2*CL QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYAMH WVRQAPGQRLEWMG WINAGNGNTKYSQKFKQG
Ha   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGENIK DTYIH WVRQAPGQRLEWMB RIDPANGYTKYDPKFKQG
Hb   -----FNIG -----G-----
Hc   -----FNIG -----
          FR3      CDR3      FR4      CDR4
          7      8      9      10     11
67890123456789012ABC345678901234 567890ABCDEF12 34567890123
          *
21.6 KATITADTSSNTAYLQLSLSLTSEDYAVYFCAR EGYGNIGYVYAMDY WQGTSVTVSS
2*CL RVTITRDTASAYMELSSLRSEDYAVYYCAR GGYGSGS-----NY WQGTLTVTVSS
Ha   RVTITADTSAYMELSSLRSEDYAVYYCAR EGYGNIGYVYAMDY WQGTLTVTVSS
Hb   -----A-----
Hc   -----A-----F-----

```

FIG. 7.

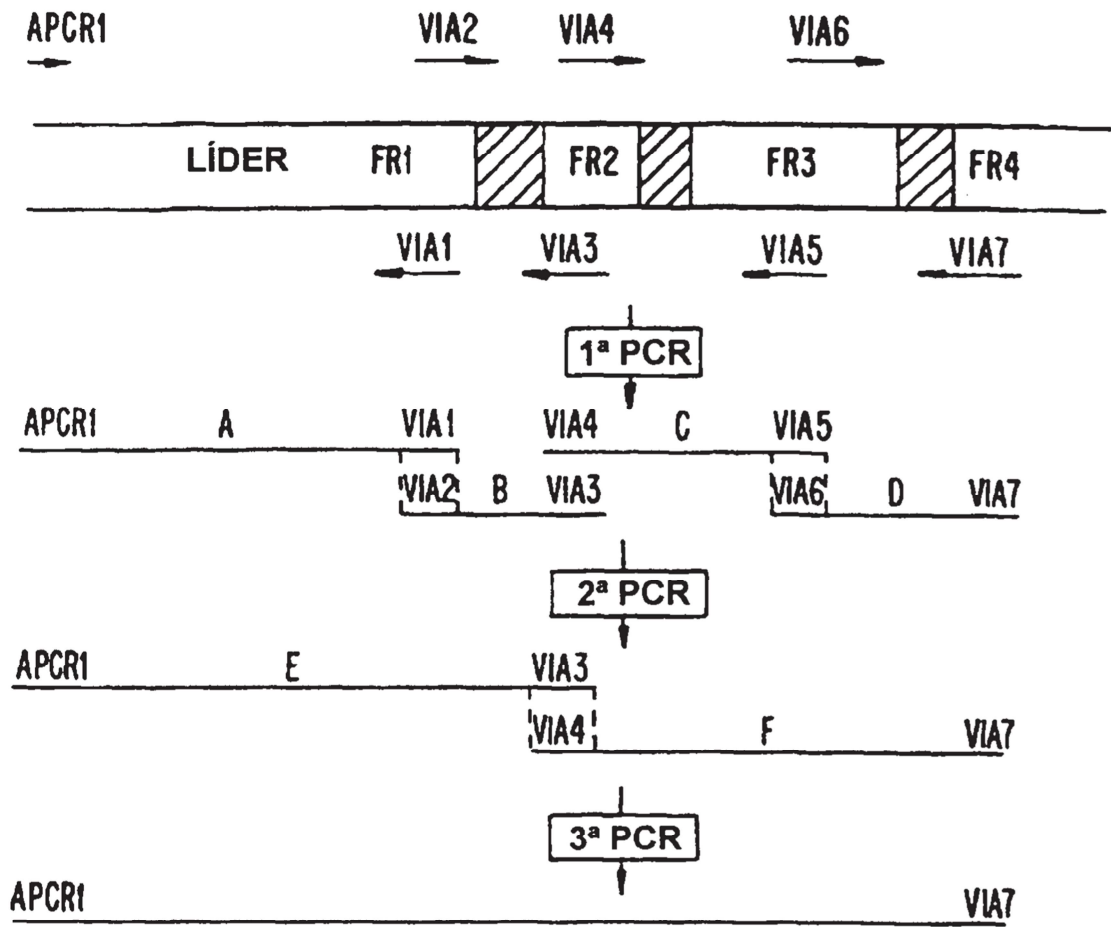


FIG. 8.

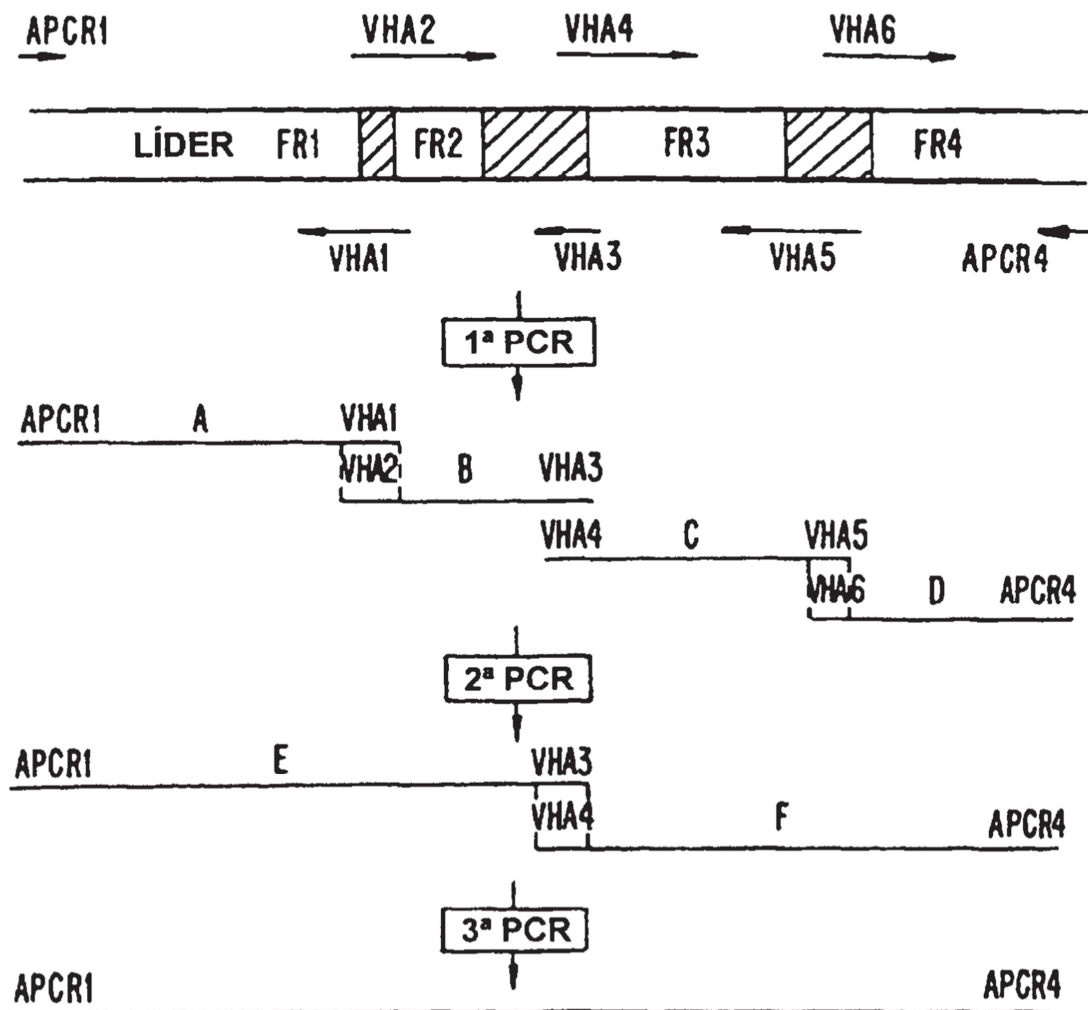


FIG. 9.

HindIII **SECUENCIA DE KOZAK**

1 aagcttgccgccaccatgagaccgtctattcagttcctggggctcttggtgttc

 1 ttcgaacggcggtggtactctggcagataagtcaaggacccccgagaacaacaag

[M R P S I Q F L G L L L F
 LIDER

55 tggcttcatggtgctcagtggtgacatccagatgacacagtctccatcctcactg

 55 accgaagtaccacgagtcacactgtaggtctactgtgtcagaggtaggagtgac

W L H G A Q C][D I Q M T Q S P S S L
 FR1

09 tctgcatctGTAggaGATAGAgtcaccatcacttgcaagacaagccaagacatt

 09 agacgtagaCATcctCTATCTcagtggtagtgaaacggtctggttcggttctgtaa

S A S V G D R V T I T C][K T S Q D I
 CDR1

63 aacaagtatatggcttggtaccaaCAGACAcctggaaaaGTCcctaggctgctc

 63 ttgttcataataccgaaccatgggtGTCTGTggaccttttCGAggatccgacgag

N K Y M A][W Y Q Q T P G K A P R L L
 FR2

17 atacattacacatctgcattacagccaggcatcccatcaagggtcagtggaagt

 17 tatgtaatgtgtagacgtaatgtcgggtccgtagggtagttccaagtcaccttca

I H][Y T S A L Q P][G I P S R F S G S
 CDR2

71 gggctctgggagagattatACTttcACCatcagcAGCctgCAGcctgaagatatt

 71 cccagaccctctctaataTGAaagTGGtagtcgTCGgacGTCggacttctataa

G S F R D Y T F T I S S L Q P E D I
 FR3

FIG. 10-1.

325 gcaacttattattgtctacagtatgataatctgtggacggttcggtCAAggcacc

 cgttgaataataacagatgtcatactattagacacctgcaagccaGTTccgtgg
 A T Y Y C] [L Q Y D N L W T] [F G Q G T
 CDR3 FR4

**SITIO DE DONANTE
 DE CORTE Y EMPALME BamHI**
 aagGTGgaaatcaaacgtgagtggatcc
 379 -----
 ttcCACctttagtttgactcacctagg
 K V E I K]

FIG. 10-2.

HindIII **SECUENCIA DE KOZAK**
 AAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGCGCGTGTTTTGCCTGCTCGCCGTG
 1 -----
 TTCGAACGGCGGTGGTACCTGACCTGGACCGCGCACAAAACGGACGAGCGGCAC
 [M D W T W R V F C L L A V
 LÍDER

GCTCCTGGGGCCCACAGCCAGGTGCAACTAGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAG
 55 -----
 CGAGGACCCCGGGTGTCTGGTCCACGTTGATCACGTCAGGCCGCGGCTTCACTTC
 A P G A H S] [Q V Q L V Q S G A E V K

AAACCCGGTGCTTCCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGCTAGCGGTttcaacattaaa
 109 -----
 TTTGGGCCACGAAGGCACTTTCAGTCGACATTTTCGATCGCCAaagttgtaattt
 K P G A S V K V S C K A S G F N I K] [
 FR1

gacacatatacacTGGGTTAGACAGGCCCCtGGCCAAaGGCTgGAGTGGATg
 163 -----
 ctgtggatatatgtgACCCAATCTGTCCGGgGaCCGGTTtCCGAcCTCACCTAc
 D T Y I H] [W V R Q A P G Q R L E W M
 CDR1 FR2

FIG. 11-1.

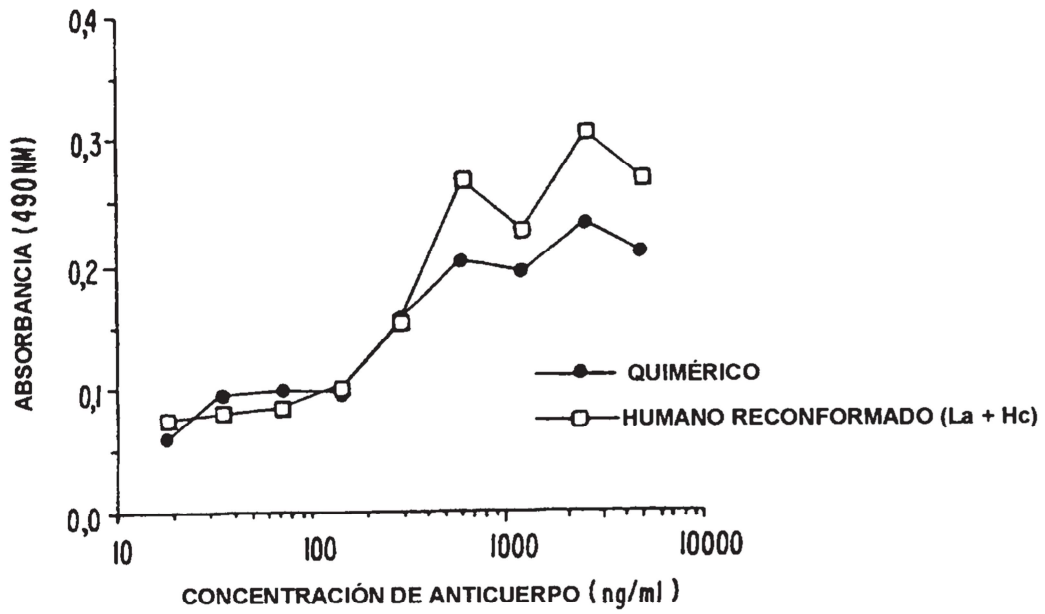


FIG. 12A.

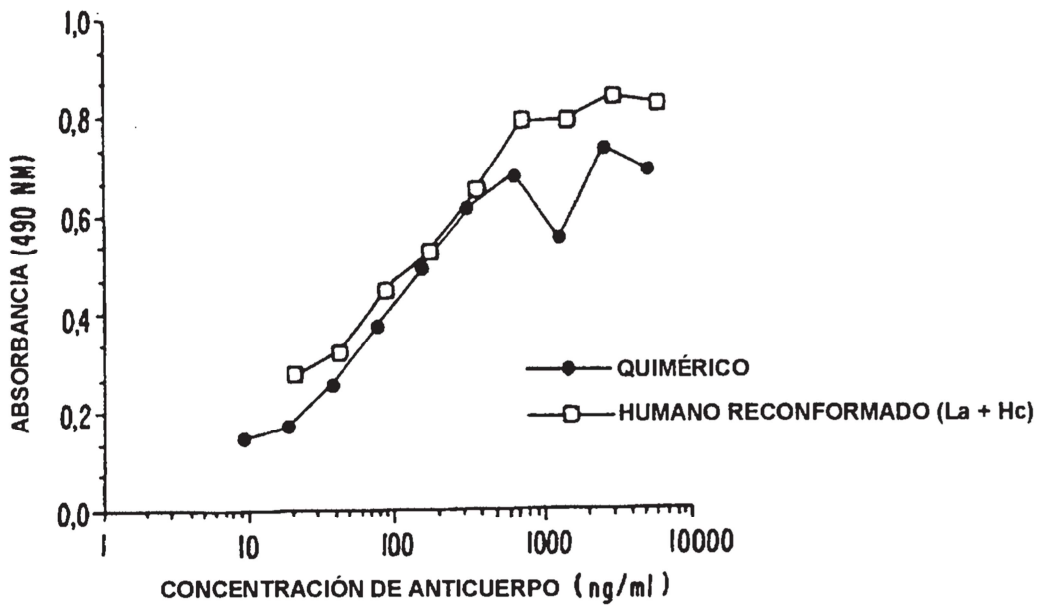
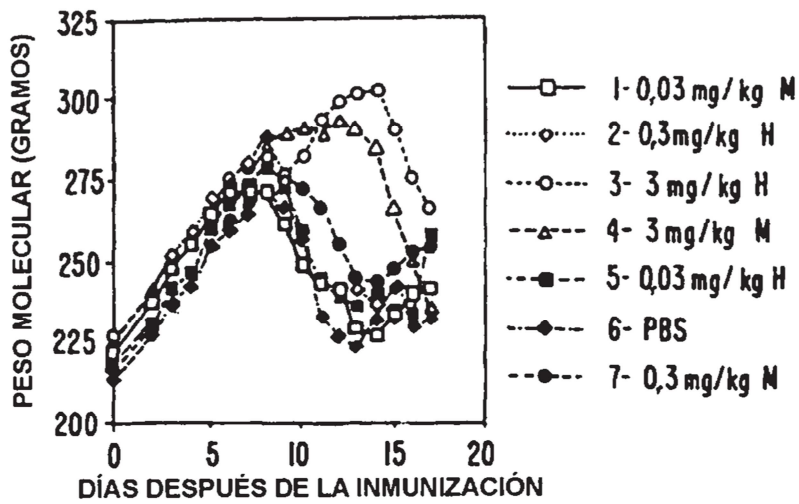
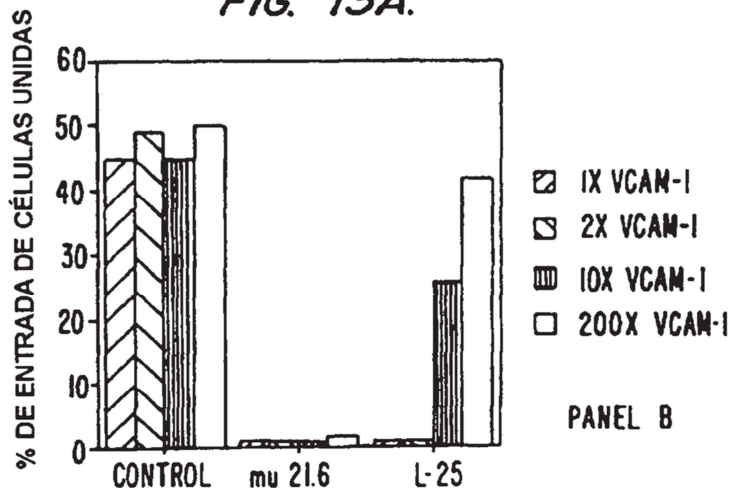
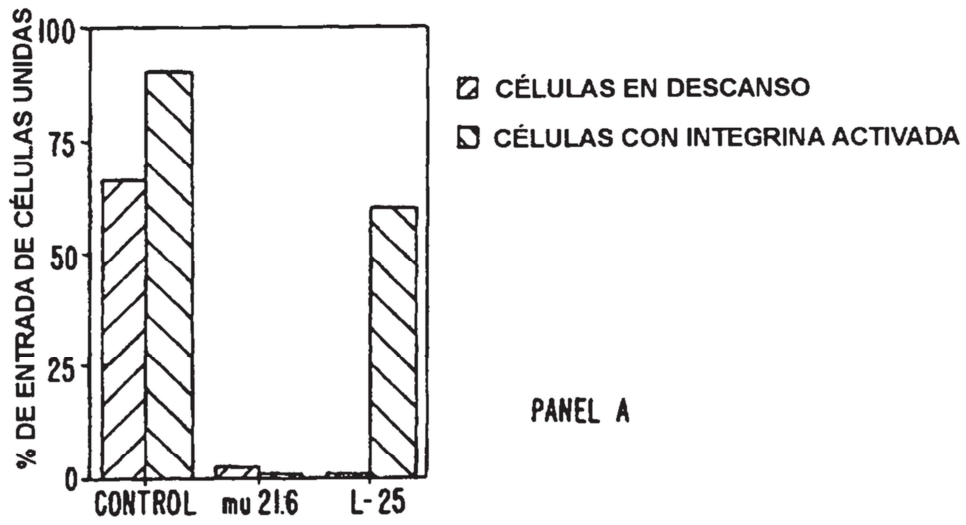


FIG. 12B.



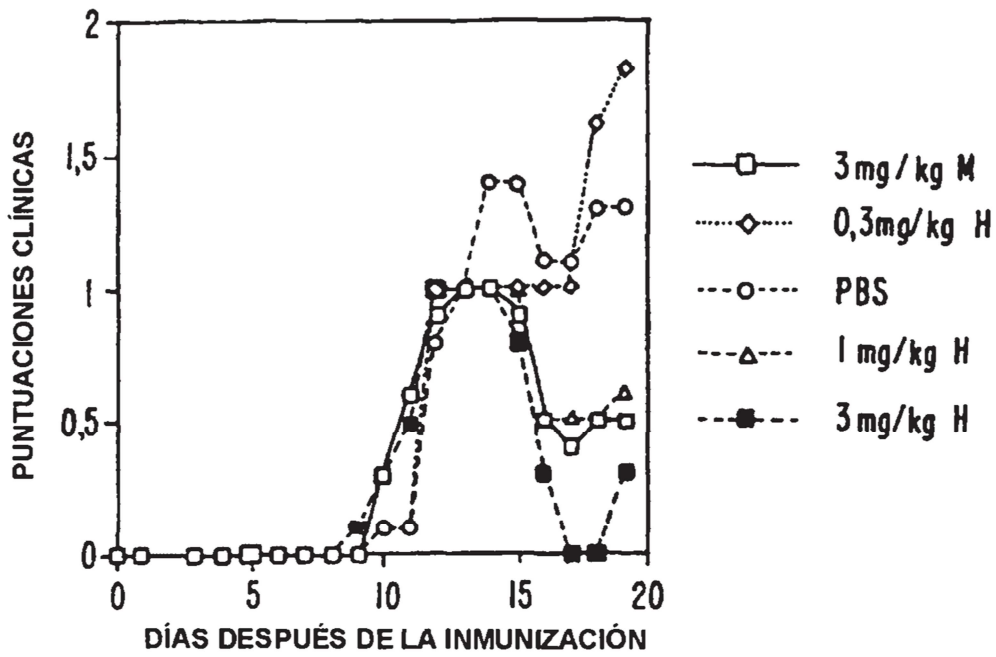


FIG. 15.

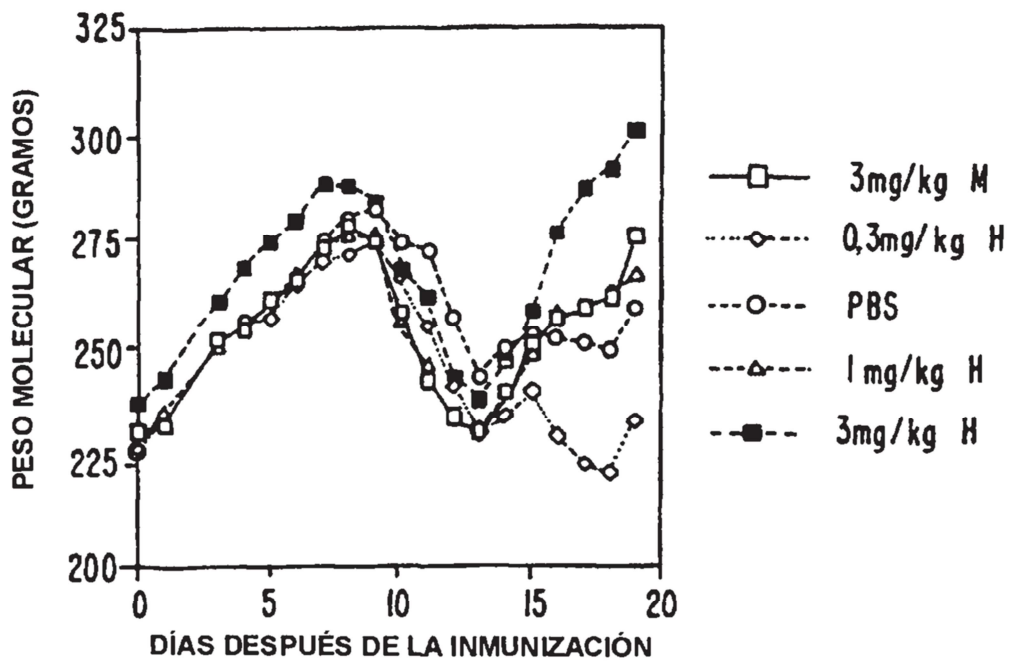


FIG. 16.