

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 990**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2008 E 08703820 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2119780**

54 Título: **Composición de anticuerpo genéticamente recombinante que tiene una actividad efectora mejorada**

30 Prioridad:

24.01.2007 JP 2007013640

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2015

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, OHTEMACHI CHIYODA-KU
TOKYO 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**SHITARA, KENYA;
NIWA, RINPEI y
NATSUME, AKITO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 538 990 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

Composición de anticuerpo genéticamente recombinante que tiene una actividad efectora mejorada.

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a una composición de anticuerpo recombinante que es un anticuerpo IgG1 humano, que comprende un dominio CH2 en el que los aminoácidos en las posiciones 276 y 339 indicadas por el índice EU como en Kabat, *et al.* son sustituidos por otros aminoácidos y que tiene una actividad citotóxica dependiente de complemento mejorada en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio CH2 antes de que los aminoácidos sean sustituidos; un ADN que codifica la molécula de anticuerpo o una región constante de cadena pesada de la molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante; un transformante obtenible mediante la introducción del ADN en una célula hospedadora; un procedimiento para producir la composición de anticuerpo recombinante utilizando el transformante; y un medicamento que comprende la composición de anticuerpo recombinante como ingrediente activo.

Antecedentes de la técnica

Ya que los anticuerpos son moléculas de proteína que tienen una actividad de unión elevada y una especificidad de unión a una molécula diana (antígeno) y una elevada estabilidad en sangre, se han intentado aplicaciones de los mismos para el diagnóstico, en agentes preventivos y terapéuticos para varias enfermedades humanas (Documento no de patente 1). A pesar de que los anticuerpos se producen generalmente mediante la administración (la inmunización) de un antígeno a un animal no humano, los anticuerpos obtenidos a partir de un animal no humano tienen una secuencia de aminoácidos específica de la especie y se provocan efectos secundarios debido a que los anticuerpos son reconocidos como sustancias ajenas en el cuerpo humano. Por consiguiente, se han preparado anticuerpos híbridos o anticuerpos humanizados a partir de anticuerpos derivados de animales otros que humanos (animales no humanos) utilizando técnicas de recombinación genética (Documentos no de patente 2 a 5).

Los anticuerpos híbridos y los anticuerpos humanizados han resuelto problemas que presentaban los anticuerpos animales como los anticuerpos de ratón, tales como la alta inmunogenicidad, la baja función efectora o la corta vida media en sangre, y se hicieron posibles aplicaciones de anticuerpos monoclonales en preparaciones farmacéuticas utilizando dichos anticuerpos (Documentos no de patente 6 a 9). En los Estados-Unidos, por ejemplo, ya se han aprobado una pluralidad de anticuerpos humanizados como un anticuerpo para el tratamiento del cáncer y están en el mercado (Documento no de patente 10).

Estos anticuerpos híbridos y anticuerpos humanizados muestran de hecho efectos hasta un cierto grado a nivel clínico, pero existe una demanda de anticuerpos terapéuticos que presenten mayores efectos. Por ejemplo, en el caso de la administración única de Rituxan (Documento no de patente 11) (producido por IDEC/Roche/Genentech) que es un anticuerpo híbrido para CD20, se ha informado que su ratio de respuesta para pacientes de linfoma no de Hodgkin de baja malignidad recurrente en el ensayo clínico de fase III no es mayor que 48% (remisión completa 6%, remisión parcial 42%), y su duración media de respuesta es de 12 meses (Documento no de patente 12). En el caso de la utilización combinada de Rituxan y quimioterapia (CHOP: Ciclofosfamida, Doxorubicin, Vincristine), se ha informado de que el ratio de respuesta para pacientes recurrentes de linfoma no de Hodgkin folicular y de baja malignidad hasta el ensayo clínico de fase II es de 95% (remisión completa 55% remisión parcial 45%), pero que se hallaron efectos secundarios debido a CHOP (Documento no de patente 13). En el caso de una administración única de HERceptin (producido por Genentech), que es un anticuerpo humanizado contra HER2, se ha informado de que su ratio de respuesta en pacientes de cáncer de pecho metastático en el ensayo clínico de fase III es sólo de 15% y su duración de respuesta medio es de 9,1 meses (Documento no de patente 14).

La molécula de anticuerpo humano también se denomina inmunoglobulina (de ahora en adelante denominada Ig) y está clasificada en isotipos de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y IgM en base a su estructura molecular. Teniendo IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 una homología relativamente elevada en las secuencias de aminoácidos, éstas se denominan genéticamente IgG. Las IgG humanas son utilizadas principalmente como anticuerpos terapéuticos.

Una molécula de anticuerpo comprende dos tipos de polipéptidos, es decir, una cadena pesada (de ahora en adelante denominada cadena H) y una cadena ligera (de ahora en adelante denominada cadena L). Una molécula de anticuerpo IgG humano comprende dos cadenas H y dos cadenas L. Asimismo, una cadena H comprende una región variable de cadena H (de ahora en adelante denominada VH) y una región constante de cadena H (de ahora en adelante denominada CH), y una cadena L comprende una región variable de cadena L (de ahora en adelante denominada VL) y una región constante de cadena L (de ahora en adelante denominada CL). La región constante de cadena H comprende cuatro dominios que se denominan respectivamente dominio CH1, bisagra, CH2 y CH3, desde el dominio cercano a VH localizado en el extremo N-terminal de la cadena pesada en este orden. También, el dominio CH2 y el dominio CH3 en combinación se denominan Fc.

Un anticuerpo se une a un antígeno vía una región de unión a antígeno (de ahora en adelante denominada Fv) que comprende VH y VL y se une a una molécula efectora del sistema inmune tal como un receptor o un complemento

vía la región constante de cadena H. Por mediación de la unión a la molécula efectora en el sistema inmune, el anticuerpo induce una actividad efectora tal como una actividad citotóxica mediada por la célula dependiente de complemento (de ahora en adelante denominada actividad CDC), una actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo (de ahora en adelante denominada actividad ADCC) o una actividad fagocítica para eliminar el antígeno o las células (un patógeno o células tumorales) que expresan el antígeno.

Para inducir la actividad ADCC o la actividad fagocítica, es importante que el anticuerpo se una a un miembro de la familia de receptores gamma Fc (de ahora en adelante denominada FcγR) expresado en la superficie de varios leucocitos tales como los linfocitos citolíticos naturales (de ahora en adelante denominados células NK), monocitos, macrófagos o granulocitos. La familia FcγR incluye FcγR activados y FcγR regulados. FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb pertenecen a los FcγR activados, y FcγRIIb pertenece a los FcγR regulados. Un anticuerpo IgG humano se une fuertemente a tal receptor y consecuentemente induce la actividad ADCC o la actividad fagocítica de leucocitos.

La actividad ADCC es una reacción en la que leucocitos como las células NK lisan principalmente células diana por mediación de un anticuerpo. El anticuerpo se une a un antígeno en la superficie de las células diana vía Fv y se une a FcγRIIIa en la superficie de las células NK vía Fc. Como resultado, las células NK liberan moléculas citotóxicas tales como perforina o grancima y de este modo lisan las células diana (documentos no de patente 15 y 16).

La actividad CDC es una reacción en la que un grupo de proteínas séricas denominadas complementos lisa células diana por mediación de un anticuerpo. Los complementos están clasificados en proteínas C1 a C9 y están sujetos a reacciones en cadena para de este modo inducir la actividad CDC: Cada una de las proteínas del complemento se activan reaccionando con una proteína de complemento específica y luego reacciona con la proteína de complemento subsiguiente. Estas reacciones en cadena empiezan con la unión del primer componente del complemento C1 al Fc de un anticuerpo, que se ha unido vía Fv a un antígeno en la superficie de células diana, vía C1q que es una de las proteínas que constituyen C1. Finalmente, los complejos C5 a C9 se polimerizan juntos para formar un agujero en la membrana celular de las células diana, que resulta en la lisis de las células diana (documentos no de patente 15 y 16).

Cuatro isotipos de IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4) son altamente homólogos entre sí en la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena H excepto por las bisagras que muestran una gran variedad. Sin embargo, estos isotipos inducen una actividad efectora de diferentes intensidades (Documento no de patente 17). En general, la actividad ADCC disminuye en el siguiente orden: IgG1>IgG3>IgG4>IgG2 (Documentos no de patente 18 y 19), mientras que la actividad CDC disminuye en el siguiente orden: IgG3>IgG1>> IgG2=IgG4. Como se ha discutido anteriormente, la unión de un anticuerpo a C1q es importante para inducir la actividad CDC. Las constantes de unión (K_a) en la unión de C1q a una molécula de anticuerpo monomérica en los isotipos de IgG humana, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 son $1,2 \times 10^4$, $0,64 \times 10^4$, $2,9 \times 10^4$ y $0,44 \times 10^4$, respectivamente (documento no de patente 20), reflejando la diferencia en actividad CDC entre estos isotipos.

Con respecto a los mecanismos de efecto farmacológico de fármacos anticuerpo utilizados clínicamente, la importancia de las actividades ADCC y CDC ha atraído particularmente la atención pública. Se ha informado de que Rituxan tal como descrito anteriormente, que es un anticuerpo híbrido humano del isotipo IgG1, muestra unas actividades ADCC y CDC in vitro (Documento no de patente 21). En relación con los efectos clínicos de Rituxan, se ha informado que Rituxan muestra unos efectos terapéuticos elevados en un paciente que presenta un genotipo con elevada actividad ADCC (Documento no de patente 22), que los componentes del complemento en sangre se consumen rápidamente después de la administración del mismo (Documento no de patente 23), que la expresión de CD59, que es un regulador de la actividad CDC, muestra un incremento en células cancerosas de un paciente que sufre de recurrencia después de la administración del mismo (Documento no de patente 24) y similares. Estos informes indican que Rituxan ejerce de hecho una función efectora en el cuerpo de un paciente. También se ha informado de que Herceptin tal como descrito anteriormente, que es un anticuerpo humanizado de la subclase IgG1, muestra una actividad ADCC in vitro (documento no de patente 25).

A pesar de que las IgG1 humanas y las IgG3 humanas son isotipos que tienen excelentes actividades ADCC y CDC, es conocido que un anticuerpo IgG3 humano tiene una vida media más corta en sangre que otros isotipos de IgG humanos y por lo tanto desaparece rápidamente de la sangre después de la administración (documento no de patente 26). También es conocido que la IgG3 humana no tiene actividad de unión a proteína A, a diferencia de otros isotipos de IgG humanas (documento no de patente 27). En la producción de anticuerpo a escala industrial, predomina un procedimiento de purificación utilizando proteína A, así como otros procedimientos que utilizan, por ejemplo, proteína G, tienen algunos problemas como el elevado coste de purificación.

Es conocido que la proteína A se une a una molécula de anticuerpo IgG humana (documento no de patente 28). Cuando indicado por el índice EU como en Kabat *et al.* (documento no de patente 29), los resultados de un análisis cristalográfico de rayos X indicaron que el bucle que comprende los aminoácidos en las posiciones 252 a 254, un bucle que consiste en los aminoácidos en las posiciones 308 a 312, y un bucle que comprende los aminoácidos en las posiciones 433 a 436 son importantes (documento no de patentes 28). Como resultados de un análisis de resonancia magnética nuclear (RMN), se indica asimismo que Ile253, Ser254, His310, Gln311, His433, His435 y His436 son particularmente importantes en Fc de IgG1 (documento no de patente 30). Además, Kim *et al.* hallaron

que la actividad de unión a proteína A se atenuó mediante el reemplazo de His435 de una IgG1 humana por Arg435 derivado de una IgG3 (documento no de patente 31). De ahora en adelante, las posiciones de los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una molécula de anticuerpo están representadas en base al índice EU como en Kabat, *et al.* (documento no de patente 29).

En base a lo anteriormente expuesto, puede decirse que el anticuerpo IgG1 humano es el isotipo más adecuado como fármaco anticuerpo, ya que tiene unas actividades CDC y ADCC mayores que otros isotipos, puede ser purificado utilizando proteína A, presenta una vida media en sangre larga y tiene una ventaja desde el punto de vista de su coste de producción. A pesar de que se han utilizado anticuerpos IgG1 humanos como fármacos en práctica, como se ha descrito anteriormente, los efectos farmacológicos exhibidos por los fármacos anticuerpos existentes son todavía insuficientes. Por lo tanto, se requiere un fármaco anticuerpo que tenga efectos mejorados. Con el objetivo de satisfacer este requerimiento, se han realizado estudios sobre anticuerpos que presentan actividades efectoras mejoradas. Como se ha discutido anteriormente, una actividad efectora de un anticuerpo refleja la actividad de unión de la región constante de cadena H a una molécula efectora en el sistema inmune. Consecuentemente, la actividad efectora del anticuerpo puede mejorarse mejorándola actividad de unión de la región constante de la cadena H a la molécula efectora en el sistema inmune.

Con el fin de analizar las actividades efectoras de anticuerpos humanos, se han realizado estudios sobre anticuerpos que comprenden dos tipos de secuencias de aminoácidos de isotipos humanos que se preparan intercambiando parcialmente las secuencias de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada entre dos tipos de anticuerpos de isotipo humanos que tienen actividades efectoras diferentes (Documento de patente 1 y Documentos no de patente 32 y 33). Al final de los años 1980, Morrison, *et al.* indicaron que moléculas de anticuerpo, que se prepararon intercambiando los dominios individuales (CH1, CH2, CH3 y bisagra) en la región constante de la cadena pesada entre IgG1 que tiene una actividad efectora elevada y IgG4 que tiene una actividad efectora baja, o entre IgG2 que tiene una actividad efectora baja y IgG3 que tiene una actividad efectora elevada, pudieron ser expresadas como proteínas recombinantes (documento de patente 1). Como resultado del análisis subsiguiente sobre estas moléculas de anticuerpo, clarificaron que el extremo C-terminal del dominio CH2 es importante en la actividad CDC de IgG1 y que el dominio CH2 es importante en la actividad CDC de IgG3 (Documento no de patente 32); el dominio CH2 y bisagra son importantes en la unión de IgG1 y IgG3 al FcγRI (Documento no de patente 33); y similares.

Como se ha descrito anteriormente, el dominio CH2 es importante en la actividad CDC. Se analizaron las secuencias de aminoácidos del anticuerpo IgG1 humano y del anticuerpo IgG3 humano que presentan una actividad CDC elevada. Con respecto a las secuencias de aminoácidos de CH2, es conocido que Leu235 (Documento no de patente 34), Asp270, Lys322, Pro329 y Pro331 (Documento no de patente 35) son importantes en la actividad CDC de IgG1 humana; y Gly233, Leu234, Leu235, Gly236 (Documento no de patente 36) y Lys322 (Documento no de patente 37) son importante en la actividad CDC de IgG3 humana. Brekke, *et al.* analizaron varias moléculas de anticuerpo preparadas mediante el trasplante de residuos de aminoácidos comunes a las secuencias de aminoácidos del dominio CH2 de anticuerpo IgG1 humano y el anticuerpo IgG3 humano que tienen una actividad CDC elevada o varios residuos de aminoácidos diferentes de un anticuerpo IgG4 humano que tiene una actividad CDC muy baja, a un anticuerpo IgG4 humano. Como resultado, hallaron que la actividad CDC de un anticuerpo IgG4 humano se veía mejorada mediante el reemplazo de Ser3311 en la IgG4 humana por Pro331 que es común a una IgG1 humana y a una IgG3 humana (Documento no de patente 38).

Además, se han realizado intentos para mejorar la actividad CDC mediante el cambio de una parte de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo IgG3 humano, que es el isotipo de IgG humana que tiene la actividad CDC más elevada, por una secuencia de aminoácidos originada en otro isotipo de IgG humano. Con respecto a las longitudes de bisagra de cada isotipo de IgG, IgG1 tiene 15 residuos de aminoácido, IgG2 tiene 12 residuos de aminoácido, IgG3 tiene 62 residuos de aminoácido y IgG4 tiene 12 residuos de aminoácidos. Por lo tanto, la IgG humana tiene una característica estructural que consiste en tener una bisagra más larga que otros isotipos de IgG3 (Documento no de patente 1). La bisagra de un anticuerpo IgG3 humano que consiste en 62 aminoácidos está codificada por cuatro exones en un gen. Michaelsen, *et al.* informaron que la actividad CDC de un anticuerpo IgG3 humano que tiene una bisagra que se acortó a 15 residuos de aminoácido mediante la supresión de 3 exones en el extremo N-terminal de entre estos cuatro exones fue más elevada que la de IgG3 y IgG1 (Documento no de patente 39). Norderhang, *et al.* informaron que la actividad CDC se ve todavía más aumentada mediante el cambio de las secuencias de aminoácidos de la bisagra acortada anteriormente y la secuencia de aminoácidos de la bisagra de IgG4. Asimismo, Brekke, *et al.* informaron que cuando la bisagra de un anticuerpo IgG3 humano se cambió por la bisagra de un anticuerpo IgG1 humano, la actividad CDC del anticuerpo resultante fue más elevada que IgG3 y similares a IgG1 o mejor (Documento no de patente 41).

Por otro lado, se han realizado estudios sobre un anticuerpo preparado reemplazando la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo IgG1 humano por una secuencia de aminoácidos artificial que no está presente en la naturaleza, para de este modo aumentar la actividad de unión a C1q y por lo tanto mejorar la actividad CDC (Documento no de patente 42 y Documento de patente 2 a 5). Como se ha descrito anteriormente, la actividad CDC se induce por la unión de C1q, que es una de las proteínas que constituyen la proteína del complemento C1, al Fc de una molécula de anticuerpo. Idusogie, *et al.* informaron que reemplazando

Lys326 o Glu333 en el dominio CH2 de Rituxan (un anticuerpo híbrido IgG1 humano) tal como se ha descrito anteriormente por otro aminoácido, la actividad CDC se vio mejorada como máximo al doble (Documento no de patente 42, Documento de patente 2). Además, Idusogie, *et al.* indicaron que reemplazando Lys326 o Glu333 en IgG2 por otro aminoácido, la actividad CDC de IgG2, que inherentemente corresponde a varias centésimas partes de la actividad CDC de IgG1, se incrementó a aproximadamente un veinticincoava parte de la de IgG1 (Documentos de patente 3 a 5).

Sin embargo, tal anticuerpo preparado mediante el reemplazo de una secuencia de aminoácidos que no está presente en la naturaleza tiene el riesgo de ser reconocido como material foráneo en el cuerpo humano y por lo tanto de inducir un efecto secundario similar al de un anticuerpo animal no humano tal como se ha discutido anteriormente. Por otra parte, la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo preparado cambiando secuencias de aminoácidos entre isotipos humanos es una combinación de secuencias de aminoácidos de anticuerpos inherentemente presente en humanos.

De entre los efectos terapéuticos de los anticuerpos terapéuticos, las actividades ADCC y fagocítica inducidas por la unión de la región Fc del anticuerpo a FcγR y la actividad CDC mediada por la unión del anticuerpo a C1q son ambas muy importantes. Sin embargo, las uniones del anticuerpo a C1q y al FcγR están ambas mediadas por el Fc y, por lo tanto, se teme que una modificación de aminoácido destinada a mejorar la actividad CDC pueda dañar la actividad ADCC. En la práctica, Idusogie, *et al.* informan que un anticuerpo cuya actividad CDC ha sido mejorada reemplazando el Fc de un anticuerpo IgG1 humano con una secuencia de aminoácidos artificial mostró una seria reducción en el actividad ADCC (Documento no de patente 42).

Como un procedimiento para mejorar la actividad efectora de un anticuerpo otro que el reemplazo de una secuencia de aminoácido, puede citarse la regulación de la cadena de azúcar unida a la región constante del anticuerpo. Es conocido que la actividad ADCC de los anticuerpos IgG humanos cambia en base a la estructura de una cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico unida a la asparagina en posición 297 en el Fc (la figura 1 muestra una vista modelo de la misma) (Documento de patente 6). También se ha informado de que la actividad ADCC del anticuerpo cambia dependiendo de las cantidades de galactosa y N-acetilglucosamina contenidas en esta cadena de azúcar (Documentos no de patente 43 a 46). Sin embargo, la actividad ADCC se ve mayormente afectada por la fucosa uniéndose a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α-1,6 en la cadena de azúcar. A saber, un anticuerpo IgG que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en las cadenas de azúcar muestra una actividades ADCC y de unión a FcγRIIIa notablemente más altas que un anticuerpo IgG que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en las que la fucosa está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en las cadenas de azúcar (Documentos no de patente 47, 48 y 49 y documento de patente 7). A pesar de que las moléculas de anticuerpo que no tienen fucosa en las cadenas de azúcar existen *in vivo* como un tipo natural, las células knock-out para el gen α-1,6-fucosiltransferasa son conocidas como células capaces de producir específicamente una composición de anticuerpos que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en las cadenas de azúcar (Documentos de patente 7 y 8).

Documento no de patente 1: Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc. (1995)

Documento no de patente 2: Nature, 312, 643 (1984)

Documento no de patente 3: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851 (1984)

Documento no de patente 4: Nature, 321, 522 (1986)

Documento no de patente 5: Nature, 332, 323 (1988)

Documento no de patente 6: Immunol. Today, 21, 364 (2000)

Documento no de patente 7: Immunol. Today, 21, 403 (2000)

Documento no de patente 8: Ann. Allergy Asthma Immunol., 81, 105 (1998)

Documento no de patente 9: Nature Biotechnol., 16, 1015 (1998)

Documento no de patente 10: Nature Reviews Cancer, 1, 119 (2001)

Documento no de patente 11: Curr. Opin. Oncol., 10, 548 (1998)

Documento no de patente 12: J. Clin. Oncol., 16, 2825 (1998)

Documento no de patente 13: J. Clin. Oncol., 17, 268 (1999)

Documento no de patente 14: J. Clin. Oncol., 17, 2639 (1999)

Documento no de patente 15: Chemical Immunology, 65, 88 (1997)

Documento no de patente 16: Immunol. Today, 20, 576 (1999)

Documento no de patente 17: Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc. (1995)

Documento no de patente 18: Nature, 332, 323 (1988)

Documento no de patente 19: Journal of Experimental Medicine, 166, 1351 (1987)

Documento no de patente 20: Biochemistry, 15, 5175 (1976)

Documento no de patente 21: Oncogene, 22, 7359 (2003)

Documento no de patente 22: Blood, 99, 754 (2002)

Documento no de patente 23: J. Immunol., 172, 3280 (2004)

Documento no de patente 24: J. Clin. Oncol., 21, 1466 (2003)

Documento no de patente 25: Cancer Immunol. Immunother., 37, 255 (1993)

Documento no de patente 26: Cancer Res., 58, 3905 (1998)
 Documento no de patente 27: Scand. J Immunol., 15, 275 (1982)
 Documento no de patente 28: Biochemistry, 20, 2361 (1981)
 Documento no de patente 29: Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991)
 Documento no de patente 30: FEBS Lett., 328, 49 (1993)
 Documento no de patente 31: Eur. J. Immunol., 29, 2819 (1999)
 Documento no de patente 32: Journal of Experimental Medicine, 173, 1025 (1991)
 Documento no de patente 33: Journal of Experimental Medicine, 173, 1483 (1991)
 Documento no de patente 34: Immunology, 86, 319 (1995)
 Documento no de patente 35: J Immunol., 164, 4178 (2000)
 Documento no de patente 36: Mol. Immunol., 34, 1019 (1997)
 Documento no de patente 37: Mol. Immunol., 37, 995 (2000)
 Documento no de patente 38: Eur. J. Immunol., 24, 2542 (1994)
 Documento no de patente 39: Scand J. Immunol., 32, 517 (1990)
 Documento no de patente 40: Eur. J. Immunol., 21, 2379 (1991)
 Documento no de patente 41: Mol. Immunol., 30, 1419 (1993)
 Documento no de patente 42: J. Immunol., 166, 2571 (2001)
 Documento no de patente 43: Human Antib Hybrid, 5, 143 (1994)
 Documento no de patente 44: Hum Antib Hybrid, 6, 82 (1995)
 Documento no de patente 45: Nat. Biotechnol., 17, 176 (1999)
 Documento no de patente 46: Biotechnol. Bioeng., 74, 288 (2001)
 Documento no de patente 47: Clin. Cancer. Res., 10, 6248 (2004)
 Documento no de patente 48: J. Biol. Chem., 277, 26733 (2002)
 Documento no de patente 49: J. Biol. Chem., 278, 3466 (2003)
 Documento de patente 1: US2003/0158389A1
 Documento de patente 2: WO00/42072
 Documento de patente 3: US2004/0132101 A1
 Documento de patente 4: US2005/0054832 A1
 Documento de patente 5: WO00/61739
 Documento de patente 6: WO02/31140
 Documento de patente 7: WO03/85107

Divulgación de la invención

Problemas a resolver mediante la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo que tiene unas funciones efectoras mejoradas tales como una actividad CDC y una actividad ADCC y tiene un efecto terapéutico mejorado sin perder otras funciones efectoras y tener antigenicidad. Además, es proporcionar un anticuerpo que puede ser producido como un medicamento, por ejemplo, que tiene una actividad de unión a proteína A.

La presente divulgación se refiere a una composición de anticuerpo recombinante que es un anticuerpo IgG1 humano, que comprende un dominio CH2 en el que los aminoácidos en las posiciones 276 y 339 indicadas por el índice EU como en Kabat *et al.* están reemplazados por otros aminoácidos y tiene una actividad citotóxica dependiente de complemento más mejorada que un anticuerpo que comprende un dominio CH2 antes de que los aminoácidos hayan sido reemplazados; un ADN que codifica una molécula de anticuerpo o una región constante de la cadena pesada de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante; un transformante obtenible mediante la introducción de ADN en una célula hospedadora; un procedimiento para producir la composición de anticuerpo recombinante utilizando el transformante; y un medicamento que comprende la composición de anticuerpo recombinante como ingrediente activo.

Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a los siguientes (1) a (14):

- [1]. Un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 34 o 33.
- [2]. Una composición de anticuerpo recombinante que contiene el anticuerpo de [1].
- [3]. Una composición de anticuerpo recombinante según [2] o un anticuerpo según [1], que comprende una molécula de anticuerpo IgG1 humano que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico a la región Fc,
 - (A) en la que la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de las cadenas de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico que están unidas al Fc contenida en la composición es 20% o

más, o

(B) en la que las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico, unidas a la región Fc del anticuerpo, son cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en las cadenas de azúcar.

[4]. ADN que codifica

(A) una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante según [2] o el anticuerpo según [1], o

(B) una región constante de la cadena pesada humana de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante según [2] o el anticuerpo según [1].

[5]. Transformante obtenible mediante la introducción de ADN según [4] en una célula hospedadora aislada.

[6]. Transformante según [5], en el que la célula hospedadora es una célula resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de una fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar unida por enlace N-glicosídico.

[7]. Transformante según [5],

En el que cuando un gen que codifica una molécula de anticuerpo se introduce en la célula hospedadora, dicha célula hospedadora es capaz de producir una composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en la región Fc, y

(A) en el que la proporción de cadenas de azúcar en las que una fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de las cadenas de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar unidas por enlace N-glicosídico que están unidas a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más, o

(B) en el que las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico que están unidas a la región Fc del anticuerpo son cadenas de azúcar en las que una fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en las cadenas de azúcar.

[8]. Transformante según [7], en el que las cadenas de azúcar en las que una fucosa no está unida a las cadenas de azúcar son cadenas de azúcar en las que la posición 1 de una fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico.

[9]. Transformante según [5],

(A) en el que la célula hospedadora es una célula en la que un genoma se modifica de tal forma para tener una actividad reducida o suprimida de una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intranuclear, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico,

o

(B) en el que la célula hospedadora es una célula en la que todos los alelos en un genoma que codifican una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico están suprimidos.

[10]. Transformante según [9],

en el que la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, es una enzima seleccionada de entre GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) y GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa (Fx),

o

en el que la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la

fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico es α -1,6-fucosiltransferasa.

[11]. Transformante según [10],

(A) en el que la GDP-manosa 4,6-deshidratasa es una proteína codificada por una ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los siguientes (a) y (b) o es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (c) a (e):

- a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 18;
- b) ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:18 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa;
- c) Proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 19;
- d) Proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 19 y que tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa;
- e) Proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 19 y que tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa.

(B) en el que la GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los siguientes (a) y (b) o es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (c) a (e):

- a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representados por la SEC ID NO: 20;
- b) ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 20 bajo condiciones restrictivas y codifica una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa;
- c) Proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:21;
- d) Proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:21 y que tiene una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa.
- e) Proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:21 y tiene una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa; o

(C) en el que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los siguientes (a) a (d) o es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes de (e) a (j):

- a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:22;
- b) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:23;
- c) ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:22 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;
- d) ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:23 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;
- e) Proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:24;
- f) Proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:25;

g) Proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:24 y que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa.

h) Proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:25 y que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa.

i) Proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:24 y tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

j) Proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:25 y tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

[12]. Transformante según cualquiera de [5] a [11], en el que la célula hospedadora es una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (a) a (i):

- (a) una célula CHO derivada de tejido de ovario de hámster chino;
- (b) una célula de línea celular de mieloma de rata, YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;
- (c) una célula de línea celular de mieloma de ratón, NS0;
- (d) una célula de línea celular de mieloma de ratón, SP2/O-Ag14;
- (e) una célula BHK derivada de tejido de riñón de hámster sirio;
- (f) una célula de hibridoma productora de anticuerpos;
- (g) una célula de línea celular de leucemia humana, Namalwa;
- (h) una célula madre embrionaria no humana;
- (i) un óvulo fecundado no humano.

[13]. Procedimiento para producir una composición de anticuerpo recombinante o un anticuerpo, que comprende cultivar el transformante de cualquiera de [5] a [12] en un medio para formar y acumular la composición de anticuerpo o anticuerpo en el cultivo; y recuperar y purificar la composición de anticuerpo o anticuerpo a partir del cultivo.

[14]. Composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpo recombinante o el anticuerpo de cualquiera de [1] a [3] como ingrediente activo.

En la presente memoria también se divulga:

(1) Composición de anticuerpo recombinante que es un anticuerpo IgG1 humano, que comprende un dominio CH2 en el que los aminoácidos en las posiciones 276 y 339 indicadas por el índice EU como en Kabat *et al.* son reemplazadas por otros aminoácidos y tiene una actividad citotóxica dependiente de complemento más mejorada que una composición de anticuerpo que comprende un dominio CH2 antes de que los aminoácidos hayan sido reemplazados.

(2) La composición de anticuerpo recombinante según (1), que es un anticuerpo IgG1 humano, en el que los aminoácidos en las posiciones 276 y 339 indicadas por el índice EU como en Kabat, *et al.* son reemplazados por lisina y treonina respectivamente.

(3) Composición de anticuerpo recombinante según (1) o (2) en la que un polipéptido contenido en un dominio CH3 en la región Fc es un polipéptido que comprende aminoácidos que corresponden a las mismas posiciones en un anticuerpo IgG3 humano indicadas por el índice EU.

(4) Composición de anticuerpo recombinante según (1) a (3), que comprende una molécula de anticuerpo IgG1 humano que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en la región Fc, en el que la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de las cadenas de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico que se unen a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más.

(5) Composición de anticuerpo recombinante según cualquiera de (1) a (3), que comprende una molécula de anticuerpo IgG1 humano que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en la región Fc, en la que cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico unidas a la región Fc del anticuerpo son cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en las cadenas de azúcar.

(6) ADN que codifica una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante

descrita en cualquiera de (1) a (3).

- (7) ADN que codifica una región constante de cadena pesada de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante descrita en cualquiera de (1) a (3).
- (8) Transformante obtenible introduciendo el ADN descrito en (6) en una célula hospedadora.
- (9) Transformante según (8) en el que la célula hospedadora es una célula resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar unida por enlace N-glicosídico.
- (10) Transformante según (8) en el que cuando un gen que codifica una molécula de anticuerpo se introduce en la célula hospedadora, la célula hospedadora es capaz de producir una composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en la región Fc, en el que la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de las cadenas de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico que están unidas a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más.
- (11) Transformante según (10), en el que las cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida son cadenas de azúcar en las que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar unida por enlace N-glicosídico de tipo complejo.
- (12) Transformante según (8) en el que la célula hospedadora es una célula en la que un genoma está modificado de tal forma que tiene una actividad reducida o suprimida de una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar unida por enlace N-glicosídico de tipo complejo.
- (13) Transformante según (8) en el que la célula hospedadora es una célula en la que todos los alelos en un genoma que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico están suprimidos.
- (14) Transformante según (12) o (13), en el que la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa es una enzima seleccionada de entre GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) y GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa (Fx).
- (15) Transformante según (14), en el que la GDP-manosa 4,6-deshidratasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los siguientes a) y b):
 - a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID NO:18;
 - b) ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:18 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa.
- (16) Transformante según (14), en el que la GDP-manosa 4,6-deshidratasa es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguiente a) a c):
 - a) proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID NO:19;
 - b) proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:19 y que tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa;
 - c) proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:19 y tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa.
- (17) Transformante según (14), en el que la GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los siguientes a) y b):

a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID NO:20;

b) ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:20 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa.

(18) Transformante según (14), en el que la GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguiente a) a c):

a) proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID NO:21;

b) proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:21 y que tiene una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa;

c) proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:21 y tiene una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa.

(19) Transformante según (12) o (13), en el que la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico es α -1,6-fucosiltransferasa.

(20) Transformante según (19), en el que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes a) a d):

a) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:22;

b) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 23;

c) ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 22 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

d) ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada en la SEC ID NO:23 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad α -1,6-fucosiltransferasa.

(21) Transformante según (19), en el que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes a) a f):

a) proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID NO:24;

b) proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID NO:25;

c) proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:24 y que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

d) proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:25 y que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

e) proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:24 y tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

f) proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:25 y tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

(22) Transformante según cualquiera de 8) a 21) en el que la célula hospedadora es una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (a) a (i):

(a) una célula CHO derivada de tejido de ovario de hámster chino;

(b) una célula de línea celular de mieloma de rata, YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;

(c) una célula de línea celular de mieloma de ratón, NS0;

(d) una célula de línea celular de mieloma de ratón, SP2/0-Ag14;

(e) una célula BHK derivada de tejido de riñón de hámster sirio;

(f) una célula de hibridoma productora de anticuerpos;

(g) una célula de línea celular de leucemia humana, Namalwa;

(h) una célula madre embrionaria no humana;

(i) un óvulo fecundado no humano.

(23) Procedimiento para producir una composición de anticuerpo recombinante, que comprende cultivar el transformante de cualquiera de (8) a (22) en un medio para formar y acumular la composición de anticuerpo o anticuerpo en el cultivo; y recuperar y purificar la composición de anticuerpo a partir del cultivo.

(24) Composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpo recombinante descrita en cualquiera de (1) a (5) como ingrediente activo.

Efectos de la invención

La presente invención se refiere a una composición de anticuerpo recombinante que es un anticuerpo IgG1 humano, que comprende un dominio CH2 en el que los aminoácidos en las posiciones 276 y 339 indicadas por el índice EU como en Kabat, *et al.* son reemplazados por otros aminoácidos y tiene una actividad citotóxica dependiente de complemento más mejorada que un anticuerpo que comprende un dominio CH2 antes de que los aminoácidos hayan sido reemplazados; un ADN que codifica la molécula de anticuerpos o una región constante de cadena pesada de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante; un transformante obtenible mediante la introducción de ADN en una célula hospedadora; un procedimiento para producir una composición de anticuerpo recombinante utilizando el transformante; y una composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpo recombinante como ingrediente activo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración esquemática que muestra la estructura de una cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico unida a asparagina en la posición 297 en la cadena pesada de un anticuerpo IgG.

La figura 2 es una ilustración esquemática que muestra las estructuras de dominio de un anticuerpo IgG1 humano, un anticuerpo IgG3 humano, un isotipo híbrido de tipo 1133 y un isotipo híbrido de tipo 3311.

La figura 3 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKANTEX2B8y3.

La figura 4 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKTX93/1133.

La figura 5 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKTX93/3311.

La figura 6 muestra la actividad de unión de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, y un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311 con un anticuerpo anti-CD20 CD20-IgG1(+F) en un ensayo de inhibición competitiva sobre una célula Daudi. El eje de las abscisas muestra una concentración de muestra y el eje de las ordenadas muestra una razón de inhibición de unión para cada concentración de muestra. En los gráficos, Δ y $\blacktriangle$ son comunes a los gráficos A a H y muestran un control negativo anticuerpo anti-Her2 Herceptin (Δ) y un anticuerpo anti-CCR4 KM3060 ($\blacktriangle$). Con respecto a $\circ$ y $\bullet$ en los gráficos, la muestra correspondiente en cada gráfico, y el gráfico A muestra CD20-IgG1(+F) ($\circ$) y CD20-IgG1(-F) ($\bullet$), el gráfico B muestra CD20-IgG3(+F) ($\circ$) y CD20-IgG3(-F) ($\bullet$), el gráfico C muestra 1133(+F) ($\circ$) y 1133(-F) ($\bullet$), y el gráfico D muestra 3311(+F) ($\circ$) y 3311(-F) ($\bullet$).

La figura 7 muestra la actividad CDC de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 y un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311 con un anticuerpo anti-CD20 CD20-IgG1(+F) sobre una célula Daudi. El eje de las abscisas muestra los nombres de las muestras, y el eje de las ordenadas muestra la actividad CDC. El gráfico muestra la actividad CDC de cada muestra a una concentración de 0,3 μ g/ml.

La figura 8 muestra la actividad CDC de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 y un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 sobre una célula ST 486 (A) o una célula Raji (B). El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo, y el eje de las ordenadas muestra la actividad CDC a cada concentración de anticuerpo. En el gráfico, □ muestra CD20-IgG1(+F), ■ muestra CD20-IgG1(-F), △ muestra CD20-IgG3(+F), ▲ muestra CD20-IgG3(-F), ○ muestra 1133(+F) y ● muestra 1133(-F).

La figura 9 muestra la actividad ADCC de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 y un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311 sobre una célula Daudi. El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo y el eje de las ordenadas muestra la actividad ADCC a cada concentración de anticuerpo. Con respecto a ○ y ● en los gráficos, la muestra correspondiente es diferente en cada gráfico, y el gráfico A muestra CD20-IgG1(+F) (○) y CD20-IgG1(-F) (●), el gráfico B muestra CD20-IgG3(+F) (○) y CD20-IgG3(-F) (●), el gráfico C muestra 1133(+F) (○) y 1133(-F) (●), y el gráfico D muestra 3311(+F) (○) y 3311(-F) (●).

La figura 10 muestra la actividad de unión de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 y un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 a FcγRIIa humano soluble (tipo valina) (A a C) o FcγRIIa humano soluble (tipo fenilalanina) (D a F) en ELISA en ausencia del antígeno CD20. El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo y el eje de las ordenadas muestra la absorbancia a cada concentración de anticuerpo. Los gráficos A y D muestran la actividad de unión de CD20-IgG1(-F) (●) y CD20-IgG1(+F) (○), los gráficos B y F muestran la de CD20-IgG3(-F) (●) y CD20-IgG3(+F) (○), y los gráficos C y E muestran la de 1133(-F) (●) y 1133(+F) (○) al FcγRIIa humano soluble (tipo valina) (A a C) o al FcγRIIa humano soluble (tipo fenilalanina) (D a F).

La figura 11 es una ilustración esquemática que muestra las estructuras de dominio de un anticuerpo IgG1 humano, de un anticuerpo IgG3 humano, de un anticuerpo de isotipo híbrido de tipo 1133 y de un anticuerpo de isotipo híbrido de tipo 1131.

La figura 12 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKTX93/1131.

La figura 13 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKTX93/1113.

La figura 14 muestra los patrones de electroforesis SDS-PAGE de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, de un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 y de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 que fueron purificados. La tinción de las proteínas se realizó con Coomassie Brilliant Blue (CBB). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde a CD20-IgG1(-F), el carril 3 corresponde a CD20-IgG(-F), el carril 4 corresponde a 1133(-F), el carril 5 corresponde a 1113(-F) y el carril 6 corresponde a 1131(-F).

La figura 15 muestra la actividad CDC de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, de un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 y de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 sobre célula ST 486 (A) o célula Raji (B). El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo, y el eje de las ordenadas muestra la razón de citotoxicidad a cada concentración de anticuerpo. En el gráfico, ■ muestra CD20-IgG1(-F), ▲ muestra CD20-IgG3(-F), ● muestra 1133 (+F), × muestra 1113(-F) y ◆ muestra 1131(-F).

La figura 16 muestra la actividad ADCC de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, de un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 y de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 sobre una célula Daudi. El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo, y el eje de las ordenadas muestra la razón de citotoxicidad a cada concentración de anticuerpo. En el gráfico, ■ muestra CD20-IgG1(-F), ▲ muestra CD20-IgG3(-F), ● muestra 1133 (+F), × muestra 1113(-F) y ◆ muestra 1131(-F).

La figura 17 muestra un resultado de la medición de la actividad de unión de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, de un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 y de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 a proteína A medido mediante un ensayo ELISA. En el gráfico, ■ muestra CD20-IgG1(-F), ▲ muestra CD20-IgG3(-F), ● muestra 1133 (-F), × muestra 1113(-F) y ◆ muestra 1131(-F).

La figura 18 es una ilustración esquemática que muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de los dominios CH de un anticuerpo IgG1 humano y un anticuerpo IgG3 humano. La posición de cada secuencia de aminoácidos está basada en el índice EU como en Kabat *et al.* En el gráfico, * muestra las posiciones en las que las secuencias de aminoácidos son diferentes entre el anticuerpo IgG1 humano y el anticuerpo IgG3 humano.

La figura 19 muestra las etapas de construcción de los plásmidos pKTX93/1133(274-IgG1), pKTX93/1133(276-IgG1), pKTX93/1133(296-IgG1), pKTX93/1133(300-IgG1) y pKTX93/1133(339-IgG1).

La figura 20 muestra los patrones de electroforesis SDS-PAGE de varios anticuerpos purificados. La tinción de las proteínas se realizó con Coomassie Brilliant Blue (CBB). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde a CD20-IgG1(-F), el carril 3 corresponde a 1133(-F), el carril 4 corresponde a 1131(-F), el carril 5 corresponde a 1113(-F), el carril 6 corresponde a 1133(274-IgG1)(-F), el carril 7 corresponde a 1133(276-IgG1)(-F), el carril 8 corresponde a 1133(296-IgG1)(-F), el carril 9 corresponde a 1133(300-IgG1)(-F) y el carril 10 corresponde a 1133(339-IgG1)(-F).

La figura 21 muestra la actividad CDC de varios anticuerpos anti-CD20 sobre células Raji. El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo y el eje de las ordenadas muestra la razón de citotoxicidad a cada concentración de anticuerpo. En el gráfico, ■ muestra CD20-IgG1(-F), ● muestra 1133 (-F), ▲ muestra 1131(-F), □ muestra 1133(274-IgG1)(-F), ○ muestra 1133(276-IgG1)(-F), ◇ muestra 1133(296-IgG1)(-F), × muestra 1133(300-IgG1)(-F) y △ muestra 1133(339-IgG1)(-F).

La figura 22 muestra las etapas de construcción de los plásmidos pKTX93/1131(296/300-IgG1), pKTX93/1131(274/296/300-IgG1), pKTX93/1131(274/276/296/300-IgG1), pKTX93/1131(274/296/300/339-IgG1) y pKTX93/1131(276/296/300/339-IgG1).

La figura 23 muestra los patrones de electroforesis SDS-PAGE de varios anticuerpos purificados. La tinción de las proteínas se realizó con Coomassie Brilliant Blue (CBB). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde a 1131(296/300-IgG1)(-F), el carril 3 corresponde a 1131(274/296/300-IgG1)(-F), el carril 4 corresponde a 1131(274/276/296/300-IgG1)(-F), el carril 5 corresponde a 1131(274/296/300/339-IgG1)(-F) y el carril 6 corresponde a 1131(276/296/300/339-IgG1)(-F).

La figura 24 muestra la actividad CDC de varios anticuerpos anti-CD20 sobre células Raji. El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo y el eje de las ordenadas muestra la actividad CDC a cada concentración de anticuerpo. En el gráfico, ■ muestra CD20-IgG1(-F), □ muestra CD20-IgG3(-F), ▲ muestra 1133(-F), △ muestra 1131(-F), ● muestra 1131(296/300-IgG1)(-F), ○ muestra 1131(274/296/300-IgG1)(-F), ◆ muestra 1131(274/276/296/300-IgG1)(-F), ◇ muestra 1131(274/296/300/339-IgG1)(-F) y × muestra 1131(276/296/300/339-IgG1)(-F).

La figura 25 muestra un resultado de una medición de la actividad de unión de varios anticuerpos anti-CD20 a proteína A medida mediante un ensayo ELISA. El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo y el eje de las ordenadas muestra una actividad de unión (absorbancia) a proteína A a cada concentración de anticuerpo. En el gráfico, ● muestra CD20-IgG1(-F), ○ muestra CD20-IgG3(-F), ▲ muestra 1131(274/296/300/339-IgG1)(-F), △ muestra 1131(274/276/296/300-IgG1)(-F), ■ muestra 1131(274/296/300-IgG1)(-F), □ muestra 1131(-F) y × muestra 1133(-F).

La figura 26 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKTX93/Campath-1133.

La figura 27 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKTX93/Campath-IgG1.

La figura 28 muestra las etapas de construcción de un plásmido pKTX93/Campath-1131.

La figura 29 muestra la actividad CDC de un anticuerpo IgG1 humano anti-Campath y un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1133 sobre células MEC-1 (A), células MEC-2 (B) o células EHEB (C). El eje de las abscisas muestra una concentración de anticuerpo, y el eje de las ordenadas muestra la razón de citotoxicidad a cada concentración de anticuerpo. En el gráfico, ● muestra Campath1H-1131(-F) y ○ muestra Campath1H-IgG1(-F).

Mejor forma de realización de la invención

A continuación se describe la presente invención en detalle.

Una molécula de anticuerpo también denominada inmunoglobulina (de ahora en adelante denominada Ig), y un anticuerpo humano está clasificado en isotipos IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y IgM. IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, los cuales tienen una homología relativamente elevada en las secuencias de aminoácidos se denominan de forma genérica IgG.

Una molécula de anticuerpo está constituida por polipéptidos denominados cadena pesada (también denominada cadena H) y cadena ligera (también denominada cadena L). También, la cadena H está constituida por regiones de una región variable de cadena H (también denominada VH) y una región constante de cadena H (también denominada CH) desde su extremo N terminal, y la cadena L está constituida por regiones de una región variable de cadena L (también denominada VL) y una región constante de cadena L (también denominada CL) desde su extremo N-terminal. CH está además constituido por dominios de un dominio CH1, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. El dominio significa una unidad de constitución funcional que constituye cada polipéptido en la molécula de anticuerpo. Asimismo, el dominio CH2 y el dominio CH3 en combinación se denominan región Fc.

El dominio CH1, el dominio bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y la región Fc en la presente invención están definidos por posiciones de residuos de aminoácidos desde el extremo N-terminal indicadas por el índice EU como en Kabat *et al.* [Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición (1991)]. Específicamente, CH1 está definido como la secuencia de aminoácidos de las posiciones 118 a 215 indicadas por el índice EU, la región bisagra está definida como la secuencia de aminoácidos de las posiciones 216 a 230 indicadas por el índice EU, CH2 está definido como la secuencia de aminoácidos de las posiciones 231 a 340 indicadas por el índice EU, y CH3 está definido como la secuencia de aminoácidos de las posiciones 341 a 447 indicadas por el índice EU (el número de un residuo de aminoácido mostrado está basado en el índice EU).

La composición de anticuerpo recombinante de la presente invención incluye una composición de anticuerpo recombinante que es un anticuerpo IgG1 humano, comprende un dominio CH2 en el que los aminoácidos en las posiciones 276 y 339 indicadas por el índice EU como en Kabat *et al.* son reemplazados por otros aminoácidos y tiene una actividad citotóxica dependiente de complemento más mejorada que un anticuerpo que comprende un dominio CH2 antes de que los aminoácidos sean reemplazados.

Los otros aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido, siempre y cuando sean aminoácidos que aumentan la actividad CDC en comparación con el anticuerpo que comprende un dominio CH2 antes de las sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, el aminoácido en posición 276 es un aminoácido seleccionado de entre ácido aspártico, leucina, serina o lisina, y el aminoácido en posición 339 es un aminoácido seleccionado de entre ácido aspártico, fenilalanina, isoleucina, lisina, asparagina, serina, triptófano, tirosina y treonina.

Los otros aminoácidos son de forma más preferente aminoácidos que corresponden al dominio CH2 de un anticuerpo IgG3.

Los otros aminoácidos son de forma aún más preferente lisina como el aminoácido en posición 276 y treonina como el aminoácido en posición 339.

Además, la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención incluye una composición de anticuerpo recombinante, en la que un polipéptido contenido en un dominio CH3 en la región Fc es un polipéptido que comprende aminoácidos que corresponden a las mismas posiciones en un anticuerpo IgG3 humano indicadas por el índice EU.

Ejemplos específicos incluyen una composición de anticuerpo recombinante en la que el polipéptido que comprende un dominio CH3 en la región Fc es un polipéptido seleccionado de entre los siguientes a) a h):

- a) en el índice EU, las posiciones 341 a 447 están derivadas de una IgG1 humana;
- b) en el índice EU, las posiciones 341 a 356 están derivadas de una IgG3 humana, y las posiciones 357 a 447 están derivadas de una IgG1 humana;
- c) en el índice EU, las posiciones 341 a 358 están derivadas de una IgG3 humana, y las posiciones 359 a 447 están derivadas de una IgG1 humana;
- d) en el índice EU, las posiciones 341 a 384 están derivadas de una IgG3 humana, y las posiciones 385 a 447 están derivadas de una IgG1 humana.
- e) en el índice EU, las posiciones 341 a 392 están derivadas de una IgG3 humana, y las posiciones 393 a 447 están derivadas de una IgG1 humana;
- f) en el índice EU, las posiciones 341 a 397 están derivadas de una IgG3 humana, y las posiciones 398 a 447 están derivadas de una IgG1 humana;
- g) en el índice EU, las posiciones 341 a 422 están derivadas de una IgG3 humana, y las posiciones 423 a 447 están derivadas de una IgG1 humana;
- h) en el índice EU, las posiciones 341 a 434 están derivadas de una IgG3 humana, y las posiciones 435 a 447 están derivadas de una IgG1 humana;

La secuencia de aminoácidos de la región CL en la composición de anticuerpo recombinante de la presente divulgación puede ser o bien una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano o una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo animal no humano, y es preferentemente C_k o C_λ en una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano.

En la presente invención, un isotipo híbrido significa una región constante de cadena pesada que comprende secuencias de aminoácidos de dos o más tipos de isotipo humanos en la que una parte de la secuencia de

aminoácidos de una región constante de cadena pesada de isotipo humano es intercambiada por una secuencia de aminoácidos de una parte correspondiente en un isotipo humano diferente. De ahora en adelante, un anticuerpo recombinante de isotipo híbrido significa un anticuerpo recombinante en el que la región constante de cadena pesada es un isotipo híbrido.

5 También, la composición de anticuerpo recombinante de la presente divulgación puede ser cualquier composición de anticuerpo recombinante, siempre y cuando sea un anticuerpo que tiene Fc y una actividad de unión a una molécula diana o una proteína de fusión que tiene Fc y una actividad de unión a una molécula diana.

10 El anticuerpo que tiene una actividad de unión a una molécula diana incluye un anticuerpo híbrido humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.

15 La proteína de fusión que tiene Fc y que tiene actividad de unión a una molécula diana incluye una proteína de fusión que tiene una actividad de unión a una molécula diana con Fc, una proteína de fusión de un anticuerpo que tiene actividad de unión a una molécula diana con Fc, una proteína de fusión de un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión a una molécula diana con Fc, y similares.

20 Ejemplos específicos de la proteína de fusión Fc incluyen una proteína de fusión Fc en la que un receptor o un ligando se fusiona con la región Fc, una proteína de fusión Fc en la que una pluralidad de regiones Fc están fusionadas con la región Fc de un anticuerpo, y similares.

El fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión a una molécula diana incluye Fab, Fab', F(Ab')₂, scFv, diabody, dsFv, un péptido que comprende CDR, y similares.

25 Un Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y que tiene una actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente la mitad del extremo N-terminal de la cadena H y la cadena L entera, de entre los fragmentos obtenidos mediante tratamiento de anticuerpos IgG con proteasa, papaína (que corta un residuo de aminoácido en la posición 224 de la cadena H), están unidos juntos a través de un puente disulfuro (enlace S-S).

30 Un F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión a antígeno y que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 que es algo más grande que uno en el que Fab están unidos mediante un enlace S-S en la región bisagra, de entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de IgG con una proteasa, pepsina (que corta la cadena H en el residuo de aminoácido en posición 234).

35 Un Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50,000 y que tiene una actividad de unión a antígeno, que se obtiene mediante el corte de un enlace S-S en la región bisagra del F(ab')₂.

40 Un scFv es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH en el que una cadena VH y una cadena VL están unidas utilizando un péptido de unión adecuado (P) que tiene 12 o más residuos y es un fragmento de anticuerpo que tiene actividad de unión a antígeno.

45 Un diabody es un fragmento de anticuerpo en el que scFVs que tienen la misma o diferente especificidad de unión a antígeno forman un dímero, y tiene una actividad de unión a antígeno divalente para el mismo antígeno o dos actividades de unión a antígeno específicas para diferentes antígenos.

Un dsFv se obtiene mediante la unión de polipéptidos en los que un residuo de aminoácido de cada una de VH y VL se sustituye por una cisteína, mediante un enlace S-S entre los residuos de cisteína.

50 Un péptido que comprende CDR está constituido mediante la inclusión de por lo menos una o más regiones de CDR de VH o VL. Un péptido que comprende una pluralidad de CDRs puede producirse mediante la unión directa o mediante un péptido de unión adecuado.

55 Un anticuerpo híbrido humano es un anticuerpo que comprende VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal otro que un humano (animal no humano), y CH y CL de un anticuerpo humano. El animal no humano puede ser cualquier animal tal como un ratón, una rata, un hámster o un conejo, siempre y cuando pueda prepararse un hibridoma a partir de este.

60 Un hibridoma es una célula que produce un anticuerpo monoclonal que tiene una inmunoespecificidad deseada que se obtiene mediante fusión celular de una célula B obtenida mediante la inmunización de un animal no humano con un antígeno, con una célula de mieloma derivada de un ratón o similar. Consecuentemente, una región variable que constituye un anticuerpo producido por un hibridoma comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de animal no humano.

65 El anticuerpo híbrido humano puede ser producido mediante la obtención de ADNcs que codifican VH y VL a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal derivado de un animal no humano, la inserción de estos en

un vector de expresión para células animales que comprende ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano para de este modo construir un vector de expresión de un anticuerpo híbrido humano, y luego la introducción del vector en una célula animal para expresar el anticuerpo.

En cuanto que CH del anticuerpo híbrido humano, cualquier CH puede ser utilizada, siempre y cuando pertenezca a una inmunoglobulina humana (hlg), y los que pertenecen a la clase hlgG son preferidos, y pueden utilizarse cualquiera de los de las subclases que pertenecen a la clase hlgG, tales como $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3) y $\gamma 4$ (IgG4). En cuanto que CL del anticuerpo híbrido humano, cualquier CL puede ser utilizada, siempre y cuando pertenezca a la clase hlg, y pueden utilizarse aquellos que pertenecen a la clase κ (Ck) o la clase λ (C λ).

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de los CDRs de VH y VL de un anticuerpo de animal no humano se injertan en las posiciones adecuadas de VH y VL de un anticuerpo humano. La región otra que los CDRs de VH y VL se denomina región armazón (de ahora en adelante denominada FR).

El anticuerpo humanizado puede producirse construyendo un ADNc que codifica las secuencias de aminoácidos de CDRs en VH de un animal no humano y una secuencia de aminoácidos de VH que comprende una secuencia de aminoácidos de FR en VH de un anticuerpo humano y un ADNc que codifica unas secuencias de aminoácidos de CDRs en VL de un animal no humano y una secuencia de aminoácidos de VL que comprende una secuencia de aminoácidos de FR en VL de un anticuerpo humano; insertándolos en un vector de expresión para células animales que comprende ADNs que codifican CH y CL de un anticuerpo humano para de este modo construir un vector de expresión de anticuerpo humanizado; y luego introduciendo el vector de expresión en una célula animal para expresar en anticuerpo humanizado.

En cuanto que CH del anticuerpo humanizado, cualquier CH puede ser utilizada, siempre y cuando pertenezca a la hlg, y aquellos de la clase hlgG son preferidos y pueden utilizarse cualquiera de los de las subclases que pertenecen a la clase hlgG, tales como $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3) y $\gamma 4$ (IgG4). En cuanto que CL del anticuerpo injertado con CDR humano, cualquier CL puede ser utilizada, siempre y cuando pertenezca a la clase hlg, y pueden utilizarse aquellos que pertenecen a Ck o a C λ .

Un anticuerpo humano es originalmente un anticuerpo que existe de forma natural en el cuerpo humano, pero también incluye anticuerpos obtenidos a partir de una librería de fagos de anticuerpo humanos o un animal transgénico que produce anticuerpos humanos, que se prepara en base a los recientes avances en técnicas de ingeniería genética, de ingeniería celular y de ingeniería del desarrollo.

El anticuerpo que existe en el cuerpo humano puede prepararse, por ejemplo, aislando un linfocito de la sangre periférica humano, inmortalizándolo mediante la infección con virus EB o similar y después clonándolo para obtener de este modo linfocitos capaces de producir el anticuerpo, cultivando los linfocitos así obtenidos, y purificando el anticuerpo a partir del cultivo.

La librería de fagos de anticuerpos humanos es una librería en la que fragmentos de anticuerpo tales como Fab y scFv se expresan en la superficie del fago insertando un gen que codifica un anticuerpo preparado a partir de una célula B humana en un gen de fago. Un fago que expresa un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígeno deseada puede recuperarse a partir de la librería, utilizando su actividad para unirse a un antígeno inmovilizado en un sustrato como índice. El fragmento de anticuerpo puede convertirse asimismo en una molécula de anticuerpo humano que comprende dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

Un animal transgénico que produce un anticuerpo humano es un animal en el que un gen de anticuerpo humano se ha integrado en las células. Específicamente, un animal transgénico que produce un anticuerpo humano puede prepararse introduciendo un gen que codifica un anticuerpo humano en una célula ES de ratón, injertando la célula ES en un embrión en estado temprano de otro ratón y a continuación desarrollándolo. El anticuerpo humano se prepara a partir del animal no humano transgénico que produce un anticuerpo humano obteniendo un hibridoma que produce un anticuerpo humano mediante un método de preparación de hibridoma usualmente realizado sobre mamíferos no humanos, cultivando el hibridoma obtenido y formando y acumulando el anticuerpo humano en el cultivo.

La secuencia de aminoácidos de CL en la composición de anticuerpo recombinante descrita en la presente memoria puede ser una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano o una secuencia de aminoácidos de un animal no humano, pero es preferentemente Ck o C λ de una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano.

En la composición de anticuerpo recombinante descrita en la presente memoria, las secuencias de aminoácidos de VH y de VL pueden ser cualesquiera secuencias de aminoácidos de VH y de VL en un anticuerpo humano, secuencias de aminoácidos de anticuerpos de animal no humano o secuencias de aminoácidos de anticuerpo humanizado en las que los CDRs de un animal no humano están injertadas en el armazón de un anticuerpo humano. Ejemplos específicos incluyen secuencias de aminoácidos de VH y de VL de un anticuerpo de animal no humano producido por un hibridoma, secuencias de aminoácidos de VH y de VL de un anticuerpo humanizado,

secuencias de aminoácidos de VH y de VL de un anticuerpo humano, y similares.

La composición de anticuerpo recombinante descrita en la presente memoria incluye anticuerpos que tienen cualquier especificidad, y es preferentemente un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con un tumor, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una alergia - o una inflamación, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad autoinmune o un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una infección viral o bacteriana, y más preferentemente un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con un tumor.

El antígeno relacionado con un tumor incluye CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD9, CD10, CD13, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD28, CD30, CD32, CD33, CD38, CD40, CD40 ligando (CD40L), CD44, CD45, CD46, CD47, CD52, CD54, CD55, CD55, CD59, CD63, CD64, CD66b, CD69, CD70, CD74, CD80, CD89, CD95, CD105, CD134, CD137, CD138, CD147, CD158, CD160, CD162, CD164, CD200, CD227, adrenomedulina, proteína relacionada con angiopoyetina 4 (ARP4), aurora, B7-H1, B7-DC, integrina, antígeno estromal de médula ósea 2 (BST2), CA125, CA19.9, cadherina, receptor de quimiocina cc (CCR) 4, CCR7, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor de factor de crecimiento de fibroblasto rico en cisteína 1 (CFR-1), c-Met, c-Myc, colágeno, CTA, factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), CTLA-4, citoqueratina-18, DF3, E-caderina, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRVIII, EGFR2 (HER2), EGFR3 (HER3), EGFR4 (HER4), endoglina, molécula de adhesión de célula epitelial (EpCAM), receptor de proteína endotelial C (EPCR), efrina, receptor de efrina (Eph), EphA2, endoteliasa-2 (ET2), FAM3D, proteína activadora de fibroblasto (FAP), homólogo de receptor Fc 1 (FcRH1), ferritina, factor de crecimiento de fibroblasto 8 (FGF-8), receptor FGF8, FGF básico (bFGF), receptor bFGF, receptor FGF (FGFR) 3, FGFR4, FLT1, FLT3, receptor de folato, homólogo de Frizzled 10 (FZD10), receptor de Frizzled 4 (FZD-4), G250, receptor G-CSF, gangliósido (tal como GD2, GD3, GM2 y GM3), globo H, gp75, gp88, GPR-9-6, heparanasa I, factor de crecimiento de hepatocito (HGF), receptor HGF, antígeno HLA (tal como HLA-DR), HM1.24, glóbulo graso de la leche humana (HMFG), hRS7, proteína de choque térmico 90 (hsp90), epítipo de idiotipo, factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), receptor de IGF (IGFR), interleucina (tal como IL-6 y IL-15), receptor de interleucina (tal como IL-6R y IL-15R), integrina, receptor inmunológico asociado a translocación 4 (IRTA-4), kaliceína 1, KDR, KLR2DL1, KIR2DL2/3, KS1/4, lamp-1, lamp-2, laminina-5, Lewis y, sialil Lewis x, receptor de linfotóxina-beta (LTBR), LUNX, proteoglicano condroitín sulfato asociado a melanoma (MCSP), mesotelina, MICA, receptor de tipo II de sustancia inhibidora de muleriano (MISIR), mucina, molécula de adhesión de célula neuronal (TCAM), Necl-5, Notch1, osteopontina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor PDGF, factor plaquetario 4 (PF-4), fosfatidilserina, Antígeno Específico de Próstata (PSA), antígeno de célula madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), proteína/péptido relacionado con hormona paratiroidea (PTHrP), receptor activador de NF-kappaB ligando (RANKL), receptor para motilidad mediada por ácido hialurónico (RHAMM), ROBO1, SART3, semaforina 4B (SEMA4B), inhibidor de proteasa leucocítica secretada (SLPI), SM5-1, esfingosina-1-fosfato, glicoproteína asociada a tumor 72 (TAG-72), receptor de transferrina (TfR), TGF-beta, Thy-1, Tie-1, receptor Tie2, dominio inmunoglobulina de célula T y dominio mucina 1 (TIM-1), factor tisular humano (hTF), antígeno Tn, factor de necrosis tumoral (TNF), antígeno Thomsen-Friedenreich (antígeno TF), receptor de TNF, ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral (TRAIL), receptor TRAIL (tal como DR4 y DR5), trkC, TROP-2, receptor TWEAK Fn14, collagenasa de tipo IV, receptor de uroquinasa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor VEGF (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), vimentina, VLA-4 y similares.

El anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con un tumor incluye un anticuerpo anti-GD2 [Anticancer Res., 13, 331 (1993)], anticuerpo anti-GD3 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 260 (1993)], anticuerpo anti-GM2 [Cancer Res., 54, 1511 (1994)], anticuerpo anti-HER2 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285 (1992)], anticuerpo anti-CD52 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285 (1992)], anticuerpo anti-MAGE [British J. Cancer, 83, 493 (2000)], anticuerpo anti-HM1.24 [Molecular Immunol., 36, 387 (1999)], anticuerpo anti-proteína relacionada con hormona paratiroidea (PTHrP) [Cancer, 88, 2909 (2000)], anticuerpo anti-factor de crecimiento de fibroblasto, anticuerpo anti-factor de crecimiento de fibroblasto 8 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911 (1989)], anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de fibroblasto, anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de fibroblasto 8 [J. Biol. Chem., 265, 16455 (1990)], anticuerpo anti-factor de crecimiento de tipo insulina [J. Neurosci. Res., 40, 647 (1995)], anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de tipo insulina [J. Neurosci. Res., 40, 647 (1995)], anticuerpo anti-PMSA [J. Urology, 160, 2396 (1998)], anticuerpo anti-factor de crecimiento de célula endotelial vascular [Cancer Res., 57, 4593 (1997)], anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de célula endotelial vascular [Oncogene, 19, 2138 (2000)], anticuerpo anti-CD20 [Curr. Opin. Oncol., 10, 548 (1998)], anticuerpo anti-Her2, anticuerpo anti-CD 10, y similares.

El anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una alergia o inflamación incluye un anticuerpo anti-interleucina 6 [Immunol. Rev., 127, 5 (1992)], anticuerpo anti-receptor de interleucina 6 [Molecular Immunol., 31, 371 (1994)], anticuerpo anti-interleucina 5 [Immunol. Rev., 127, 5 (1992)], anticuerpo anti-receptor de interleucina 5, anticuerpo anti-interleucina 4 [Cytokine, 3 562 (1991)], anticuerpo anti-receptor de interleucina 4 [J. Immunol. Meth., 217, 41 (1998)], anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral [Hybridoma, 13, 183 (1994)], anticuerpo anti-receptor de factor de necrosis tumoral [Molecular Pharmacol., 58, 237 (2000)], anticuerpo anti-CCR4 [Nature, 400, 776 (1999)], anticuerpo anti-quimiocina [Peri et al., J. Immuno. Meth., 174, 249-257 (1994)], anticuerpo anti-receptor de quimiocina [J. Exp. Med, 186, 1373 (1997)] o similares. El anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una

enfermedad cardiovascular incluye un anticuerpo anti-GpIIb/IIIa [J. Immunol., 152, 2968 (1994)], anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de plaquetas [Science, 253, 1129 (1991)], anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas [J Biol. Chem., 272, 17400 (1997)], anticuerpo anti-factor de coagulación sanguíneo [Circulation, 101, 1158 (2000)] y similares.

El anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una infección viral o bacteriana incluye un anticuerpo anti-gp120 [Structure, 8, 385 (2000)], anticuerpo anti-CD4 [J. Rheumatology, 25, 2065 (1998)], anticuerpo anti-CCR5, anticuerpo anti-verotoxina [J. Clin. Microbiol., 37, 396 (1999)], y similares.

Además, la presente invención se refiere a una composición de anticuerpo recombinante que tiene actividad de unión a proteína A.

Tener actividad de unión a proteína A significa que la composición de anticuerpo recombinante puede ser purificada utilizando proteína A.

La actividad de unión a proteína A puede medirse mediante ELISA, resonancia de plasmones de superficie o similares. Específicamente, la composición de anticuerpo se hace reaccionar con proteína A en fase sólida sobre una lámina y a continuación se hace reaccionar con un anticuerpo que reconoce los varios anticuerpos marcados, y la actividad de unión puede medirse determinando la composición de anticuerpo unida a proteína A.

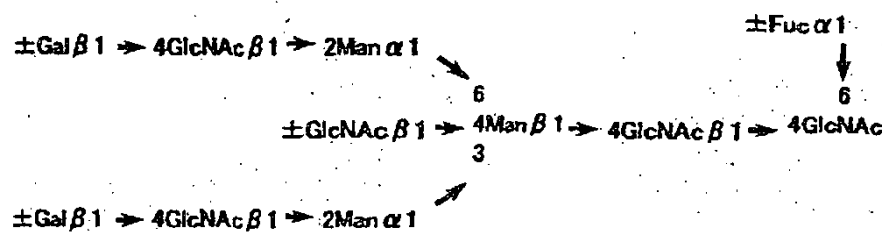
La actividad de unión a proteína A similar a la de un anticuerpo IgG1 significa que cuando la actividad de unión o afinidad del anticuerpo de la presente invención o del anticuerpo IgG1 a proteína se mide, la actividad de unión o actividad de tener afinidad es sustancialmente similar a la del anticuerpo IgG1.

También, la composición de anticuerpo se hace reaccionar con proteína A unida a un transportador como sefaroza bajo condiciones de pH elevado tales como un pH de aproximadamente 5 a 8, seguido de un lavado, y a continuación la actividad de unión puede medirse determinando la composición de anticuerpo eluido bajo condiciones de pH bajo tales como un pH de aproximadamente 2 a 5.

La molécula de anticuerpo tiene Fc, y cadenas de azúcar unidas por enlace N-glicosídico están unidas a su región. Consecuentemente, dos cadenas de azúcar están unidas por una molécula de anticuerpo.

La cadena de azúcar unida mediante enlace N-glicosídico incluye una cadena de azúcar de tipo complejo en la que el extremo terminal no reductor es la estructura principal comprende una o una pluralidad de cadenas laterales paralelas de galactosa-N-acetilglucosamina (de ahora en adelante denominada "Gal-GlcNAc") y el extremo terminal no reductor de Gal-GlcNAc comprende una estructura de ácido siálico, biseccionando N-acetilglucosamina o similares.

En la presente invención, la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico está representada por la siguiente fórmula.



Entre las composiciones de anticuerpo recombinantes de la presente invención, la composición de anticuerpo recombinante que comprende una molécula de anticuerpo que presenta en la región Fc la cadena de azúcar unida por enlace N-glicosídico puede comprender una molécula de anticuerpo que tiene la misma estructura de cadena de azúcar, o una molécula de anticuerpo que tiene diferentes estructuras de cadena de azúcar, en tanto que tenga la estructura de azúcar anterior. Esto es, la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención significa una composición que comprende una molécula de anticuerpo recombinante que tiene la misma estructura o estructuras de cadena de azúcar, o diferentes.

Además, entre los anticuerpos recombinantes de la presente invención, la composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en la región Fc, en la que la relación de cadenas de azúcar en las que fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de las cadenas de azúcar entre las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico totales que se unen a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más, tiene actividad ADCC elevada además de actividad CDC.

En cuanto que proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor del anticuerpo, están incluidos anticuerpos que tienen cualquier proporción, siempre y cuando tanto la actividad ADCC como la actividad CDC estén aumentadas. La proporción es preferentemente 20% o más, más preferentemente 51% a 100%, aún más preferentemente 80% a 100%, particularmente preferente 90% a 99% y de forma más preferente 100%.

En la presente invención, la cadena de azúcar en la que la fucosa no está unida puede tener cualquier estructura de cadena de azúcar en el terminal no reductor, siempre y cuando la fucosa no esté unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor en la fórmula anterior.

En la presente invención, el caso en el que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor en la cadena de azúcar significa que la fucosa no está sustancialmente unida. Una composición de anticuerpo en la que la fucosa no está sustancialmente unida se refiere específicamente a una composición de anticuerpo en la que la fucosa no se detecta sustancialmente, es decir, el contenido de fucosa está por debajo del límite de detección, cuando se somete al análisis de la cadena de azúcar descrito en el siguiente apartado 4. Una composición de anticuerpo recombinante en la que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en los terminales reductores de todas las cadenas de azúcar tiene la actividad ADCC más elevada.

La proporción de las moléculas de anticuerpo que tienen de cadenas de azúcar en la que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor en las cadenas de azúcar contenidas en la composición que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glicosídico en la región Fc se puede determinar liberando las cadenas de azúcar a partir de la molécula de anticuerpo usando un método conocido tal como hidrazinólisis o digestión enzimática [Biochemical Experimentation Methods 23 -Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), editado por Reiko Takahashi (1989)], llevando a cabo el marcaje de fluorescencia o el marcaje radioisotópico de las cadenas de azúcar liberadas, y separando entonces mediante cromatografía las cadenas de azúcar marcadas. También, las cadenas de azúcar liberadas se pueden determinar igualmente analizándolas con el método de HPAED-PAD [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)].

El transformante productor de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención se puede obtener introduciendo, en una célula de animal, un vector de expresión de composición de anticuerpo recombinante en el que se insertan ADNs que codifican una región variable y una región constante de una molécula de anticuerpo.

El vector de expresión de anticuerpo recombinante se construye como se describe más abajo.

Cada uno de los ADNs que codifican CH y CL se introduce en un vector de expresión de anticuerpo recombinante para producir un vector de expresión de composición de anticuerpo recombinante para célula animal.

El vector de expresión de anticuerpo recombinante incluye pAGE107 (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 22979/91; Miyaji H. *et al.*, Cytotechnology, 3, 133-140 (1990)), pAGE103 (Mizukami T. y Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310 (1987)), pHSG274 (Brady G. *et al.*, Gene, 27, 223-232 (1984)), pKCR (O'Hare K. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 1527-1531 (1981)), pSG1βd2-4 (Miyaji H. *et al.*, Cytotechnology, 4, 173-180 (1990)), y similares. El promotor y potenciador usados para el vector de expresión de anticuerpo recombinante incluyen el promotor temprano y potenciador de SV40 (Mizukami T. y Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310 (1987)), el promotor y potenciador LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (Kuwana Y. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960-968 (1987)), el promotor de cadena H de inmunoglobulina (Mason J. O. *et al.*, Cell, 41, 479-487 (1985)) y el potenciador (Gillies S. D. *et al.*, Cell, 33, 717-728 (1983)), y similares.

El vector para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante puede ser de un tipo en el que genes que codifican la cadena H y la cadena L existen en vectores separados, o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de la composición de anticuerpo recombinante, la facilidad de introducción en células de animales, y el balance entre las cantidades de expresión de las cadenas H y L de un anticuerpo en células de animal, se prefiere más un vector de tipo tándem para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante (Shitara K. *et al.*, J. Immunol. Methods, 167, 271-278 (1994)). El vector de tipo tándem para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante incluye pKANTEX93 (documento WO97/10354), pEE18 (Bentley K. J. *et al.*, Hybridoma, 17, 559-567 (1998)) y similares.

Los ADNs que codifican VH y VL de anticuerpos para diversos antígenos se clonan aguas arriba de la dirección 5' de los ADNs que codifican CH y CL del vector construido para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante para construir de ese modo un vector de expresión de la composición de anticuerpo recombinante.

Un método para introducir el vector de expresión en una célula hospedadora incluye electroporación Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891-90; Miyaji H. *et al.*, Cytotechnology, 3, 133-140 (1990)) y similares.

La célula hospedadora que produce la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención puede ser cualquier célula hospedadora que se use generalmente en la producción de una proteína recombinante, tal como una célula de animal, una célula vegetal o un microorganismo.

La célula hospedadora productora de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención incluye una célula CHO derivada de un tejido de ovario de hámster chino, una célula de línea celular de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, una célula de línea celular de mieloma de ratón NS0, una célula de mieloma de ratón SP2/0-Ag14, una célula BHK derivada de un tejido de riñón de hámster sirio, una célula de línea celular de leucemia humana Namalwa, una célula de hibridoma producida usando una célula de mieloma y cualquier célula B, una célula de hibridoma producida mediante una célula B obtenida inmunizando con un antígeno un animal no humano transgénico producido usando una célula madre embrionaria o un óvulo fecundado y cualquier célula de mieloma; una célula de hibridoma producida por la célula de mieloma arriba mencionada y una célula B obtenida inmunizando un animal no humano transgénico producido usando una célula madre embrionaria y un óvulo fecundado; y similares, con un antígeno.

La célula hospedadora capaz de expresar una composición de anticuerpo recombinante que tiene actividad ADCC elevada así como actividad CDC incluye una célula hospedadora resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, tal como una célula hospedadora capaz de producir una composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico en la región Fc, en la que la proporción de cadenas de azúcar en las que fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de las cadenas de azúcar entre las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico totales que se unen a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más. Los ejemplos incluyen células en las que la actividad de al menos una proteína descrita más abajo está disminuida o suprimida, y similares:

(a) una proteína enzimática relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa;

(b) una proteína enzimática relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través de un enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico;

(c) una proteína relacionada con el transporte de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi.

La célula hospedadora anterior es preferiblemente una célula hospedadora en la que un gen que codifica α 1,6-fucosiltransferasa en la célula hospedadora está genosuprimido (documentos WO02/31140, WO03/85107).

La proteína enzimática relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, puede ser cualquier enzima, en tanto que sea una enzima relacionada con la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, como fuente de suministro de fucosa a una cadena de azúcar. La enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, incluye una enzima que tiene influencias sobre la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, y similares.

El nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, se suministra mediante una ruta sintética *de novo* o una ruta sintética de salvamento. De este modo, todas las enzimas relacionadas con las rutas sintéticas se incluyen en la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa.

La enzima relacionada con la ruta sintética *de novo* de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, incluye GDP-manosa 4,6-deshidratasa (en lo sucesivo denominada "GMD"), GDP-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa, 4,6-reductasa (en lo sucesivo denominada "Fx"), y similares.

La enzima relacionada con la ruta sintética de salvamento de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, incluye GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa (en lo sucesivo denominada "GFPP"), fucocinasa y similares.

Como la enzima que tiene influencia sobre la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, también se incluye una enzima que tiene influencia sobre la actividad de la enzima relacionada con la ruta sintética de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, descrita anteriormente, y una enzima que tiene influencia sobre la estructura de sustancias como el sustrato de la enzima.

La GDP-manosa 4,6-deshidratasa incluye:

(a) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 18;

(b) un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 18 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad de GDP-manosa 4,6-deshidratasa,

y similares.

La GDP-manosa 4,6-deshidratasa incluye:

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 19;
 - (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 19 y que tiene actividad de GDP-manosa 4,6-deshidratasa,
 - (c) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 80% o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 19 y que tiene actividad de GDP-manosa 4,6-deshidratasa;
- y similares.

La GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa incluye:

- (a) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 20;
 - (b) un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 20 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad de GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa;
- y similares.

La GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa incluye:

- (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 21;
 - (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 21 y que tiene actividad de GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa;
 - (c) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 80% o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 21 y que tiene actividad de GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa;
- y similares.

La proteína enzimática relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través de un enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluye cualquier enzima, en tanto que sea una enzima relacionada con la reacción de unión de la posición 1 de fucosa a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. La enzima relacionada con la reacción de unión de la posición 1 de fucosa a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluye una enzima que tiene influencia sobre la reacción de unión de la posición 1 de fucosa a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos incluyen α 1,6-fucosiltransferasa, α -L-fucosidasa, y similares.

También, la enzima relacionada con la reacción de unión de la posición 1 de fucosa a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluye una enzima que tiene influencia sobre la actividad de la enzima relacionada con la reacción de unión de la posición 1 de fucosa a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, y una enzima que tiene influencia sobre la estructura de sustancias como el sustrato de la enzima.

En la presente invención, la α 1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN de los siguientes (a), (b), (c) o (d):

- (a) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 22;

- (b) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 23;
 - (c) un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 22 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad de 1,6-fucosiltransferasa;
 - (d) un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 23 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad de α -1,6-fucosiltransferasa, o
 - (e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 24;
 - (f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25;
 - (g) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 24 y que tiene actividad de α 1,6-fucosiltransferasa;
 - (h) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25 y que tiene actividad de α 1,6-fucosiltransferasa;
 - (i) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 80% o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 24 y que tiene actividad de α 1,6-fucosiltransferasa;
 - (j) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 80% o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 25 y que tiene actividad de α 1,6-fucosiltransferasa;
- y similares.

La proteína relacionada con el transporte de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi puede ser cualquier proteína, en tanto que sea una proteína relacionada con el transporte del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi, o una proteína que tenga una influencia sobre la reacción para el transporte del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi. La proteína relacionada con el transporte del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi incluye un transportador de GDP-fucosa y similares.

También, la proteína que tiene una influencia sobre la reacción para el transporte del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi incluye una proteína que tiene una influencia sobre la actividad de la proteína anterior relacionada con el transporte del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi, o tiene influencia sobre la expresión de la misma.

El ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, incluye un ADN que comprende la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 18 o 20; un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 18 o 20 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa; y similares.

El ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la α 1,6-fucosiltransferasa incluye un ADN que comprende la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 22 o 23; un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 22 o 23 en condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene actividad de α 1,6-fucosiltransferasa; y similares.

En la presente invención, el ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas se refiere a un ADN que se obtiene mediante hibridación de colonias, hibridación en placa, hibridación Southern o similares utilizando por ejemplo, un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por cualquiera de las SEC ID NOs anteriores o un fragmento de las mismas como sonda. Un ejemplo específico de tal ADN es un ADN que puede ser identificado mediante la hibridación a 65°C en presencia de cloruro de sodio 0,7 a 1,0 M utilizando un filtro con ADN derivado de colonias o de placas inmovilizado sobre el mismo, y a continuación un lavado del filtro a 65°C con una solución SSC de concentración 0,1 a 2 veces (solución SSC de concentración 1 vez: cloruro de sodio 150 mM y citrato de sodio 15 mM). La hibridación puede llevarse a cabo de acuerdo con los métodos descritos en "Molecular Cloning. A laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989)" (de ahora en adelante denominado "Molecular Cloning, Segunda Edición"), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (de ahora en adelante denominado "Current Protocols in Molecular Biology"); "DNA Cloning 1: Core Techniques, A practical Approach, Segunda Edición, Oxford University (1995)"; y similares. Específicamente, el ADN capaz de hibridarse en condiciones restrictivas incluye ADN que tiene por lo menos 60% o más de homología, preferentemente 70% o más de homología, más preferentemente 80% o más de homología, todavía más preferentemente 90% o más de

homología, en particular preferentemente 95% o más de homología, y de forma más preferente 98% o más de homología con la secuencia de nucleótidos representada por cualquiera de las SEC ID NOs. anteriores.

En la presente invención, la proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más de los residuos de aminoácidos está/n suprimido/s, sustituido/s, insertado/s y/o añadido/s en la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de la SEC ID NOs anteriores y que tiene la actividad anteriormente mencionada puede obtenerse, por ejemplo, introduciendo una mutación dirigida en un ADN que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEC ID NOs anteriores mediante mutagénesis dirigida tal como está descrito en Molecular Cloning, Segunda Edición, Current Protocols in Molecular Biology (1987-1997), Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 82, 488 (1985), o similares. El número de aminoácidos que están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos es uno o más, y no está específicamente limitado, pero está dentro del rango en el que la supresión, sustitución, inserción o adición es posible mediante métodos conocidos tales como la anteriormente mencionada mutagénesis dirigida. El número adecuado es de 1 a docenas, preferentemente 1 a 20, más preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 5.

Asimismo, en la presente invención, con el fin de que la proteína tenga la actividad anteriormente mencionada, es preferente que tenga por lo menos 80% o más de homología, preferentemente 85% o más de homología, más preferentemente 90% o más de homología, aún más preferentemente 95% o más de homología, en particular preferentemente 97% o más de homología, de forma más preferente 99% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEC ID NOs anteriores, cuando se calcula mediante el uso de software de análisis como BLAST [J Mol. Biol., 215, 403 (1990)] o FASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)].

El método para obtener una célula en la que la actividad enzimática anterior está disminuida o suprimida puede ser cualquier método, en tanto que sea un método para disminuir o suprimir la actividad enzimática objetivo. Los ejemplos incluyen:

- (a) interrupción del gen dirigida a un gen que codifica la enzima;
 - (b) introducción de un mutante dominante negativo de un gen que codifica la enzima;
 - (c) introducción de una mutación en la enzima;
 - (d) supresión de la transcripción o traducción de un gen que codifica la enzima;
 - (e) selección de una línea celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar unida mediante enlace N-glicosídico;
- y similares.

En cuanto que lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar unida por enlace N-glicosídico, se puede usar cualquier lectina capaz de reconocer la estructura de cadena de azúcar. Los ejemplos específicos incluyen lectina de lenteja LCA (aglutinina de lenteja derivada de *Lens culinaris*), lectina de guisante PSA (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), lectina de haba ancha VFA (aglutinina derivada de *Vicia faba*), lectina de *Aleuria aurantia* AAL (lectina derivada de *Aleuria aurantia*), y similares.

La "célula resistente a lectina" se refiere a una célula en la que el crecimiento no está inhibido por la presencia de una lectina a una concentración efectiva. La "concentración efectiva" es una concentración mayor que la concentración que no permite el crecimiento normal de una célula antes de la modificación genómica (en lo sucesivo denominada también línea celular progenitora), preferiblemente igual a la concentración que no permite el crecimiento normal de una célula antes de la modificación genómica, más preferiblemente 2 a 5 veces, preferiblemente además 10 veces, lo más preferible 20 o más veces la concentración que no permite el crecimiento normal de una célula antes de la modificación del gen genómico.

La concentración efectiva de lectina que no inhibe el crecimiento se puede determinar apropiadamente según cada línea celular. Habitualmente es 10 $\mu\text{g/ml}$ a 10 mg/ml , preferiblemente 0,5 mg/ml a 2,0 mg/ml .

Los procedimientos para producir la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención se explican más abajo con detalle.

1. Procedimiento para producir composición de anticuerpo recombinante

La composición de anticuerpo recombinante de la presente invención se puede obtener, por ejemplo, expresándola en una célula hospedadora usando los métodos descritos en Molecular Cloning, Segunda Edición; Current Protocols

in Molecular Biology; Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) (en lo sucesivo denominada *Antibodies*); Monoclonal Antibodies: principles and practice, Tercera Edición, Acad. Press (1993) (en lo sucesivo denominada *Monoclonal Antibodies*); Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press, 1996 (en lo sucesivo denominada *Antibody Engineering*); y similares, por ejemplo, de la siguiente manera.

(1) Construcción de un vector de expresión de composición de anticuerpo recombinante de la presente invención

Un vector de expresión de composición de anticuerpo recombinante útil para la presente invención es un vector de expresión para célula de animal en el que se introducen genes que codifican las regiones constantes de la cadena H y de la cadena L de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención. El vector para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante se puede construir clonando cada uno de los genes que codifican regiones constantes de la cadena H y de la cadena L de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante en un vector para la expresión de célula de animal.

El gen que codifica la región constante de la cadena H de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención se puede producir clonando genes que codifican regiones constantes de la cadena H de anticuerpo IgG1 y ligando entonces los fragmentos génicos que codifican las secuencias de aminoácidos deseadas.. También, el ADN total se puede sintetizar usando ADN sintéticos, y también se puede llevar a cabo la síntesis usando PCR (Molecular Cloning, Segunda Edición). Además, se puede producir combinando estas técnicas.

El vector de expresión para célula de animal puede ser cualquier vector, en tanto que se pueda introducir y expresar el gen anterior que codifica la región constante de una molécula de anticuerpo. Los ejemplos incluyen pKANTEX93 [Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)], pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990), pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1527 (1981)], pSG1βd2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] y similares. El promotor y potenciador usados para el vector de expresión para célula de animal incluye el promotor temprano y el potenciador de SV40 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], LTR del virus de la leucemia murina de Moloney [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)], el promotor [Cell, 41, 479 (1985)] y el potenciador [Cell, 33, 717 (1983)] de la cadena H de inmunoglobulina, y similares.

El vector para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención puede ser de un tipo en el que los genes que codifican la cadena H y la cadena L del anticuerpo existen en vectores separados, o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (de ahora en adelante denominado de tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención, la facilidad de introducción en células de animal, y el balance entre las cantidades de expresión de las cadenas H y L de anticuerpo en células de animal, es más preferido un tipo tándem del vector para la expresión del anticuerpo humanizado (J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)).

El vector de expresión de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención construido se puede usar para la expresión de un anticuerpo híbrido humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano en células de animal.

(2) Obtención de ADNc que codifica la región V de anticuerpo de animal no humano

Los ADNcs que codifican la región variable de la cadena H (de ahora en adelante denominada VH) y la región variable de la cadena L (de ahora en adelante denominada VL) de un anticuerpo de animal no humano, tal como un anticuerpo de ratón, se pueden obtener de la siguiente manera.

Un ADNc se sintetiza usando como sonda ARNm extraído de una célula de hibridoma que produce cualquier anticuerpo. El ADNc sintetizado se clona en un vector, tal como un fago o un plásmido, para obtener una librería de ADNc. Cada uno de un fago recombinante o un plásmido recombinante que comprende un ADNc que codifica la región VH, y un fago recombinante o un plásmido recombinante que comprende un ADNc que codifica la región VL, se aísla de la librería usando como la sonda ADNc que codifica la región C o la región V de un anticuerpo de ratón conocido. Las secuencias nucleotídicas de longitud completa de VH y VL del anticuerpo de ratón de interés en el fago recombinante o plásmido recombinante se determinan, y las secuencias de aminoácidos de longitud completa de VH y VL se deducen a partir de las secuencias nucleotídicas.

Las células de hibridoma que producen cualquier anticuerpo derivado de animal no humano se pueden obtener inmunizando un animal no humano con un antígeno unido al anticuerpo, preparando hibridomas a partir de células productoras de anticuerpos del animal inmunizado y células de mieloma según un método conocido [Molecular Cloning, Segunda Edición; Current Protocols in Molecular Biology; Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) (en lo sucesivo denominada *Antibodies*); Monoclonal Antibodies: principles and practice, Tercera Edición, Acad. Press (1993) (en lo sucesivo denominada *Monoclonal Antibodies*); Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press, 1996 (en lo sucesivo denominada *Antibody Engineering*)],

seleccionando los hibridomas clonados, cultivando los hibridomas seleccionados, y purificando células a partir del sobrenadante del cultivo.

En cuanto que animal no humano, se puede usar cualquier animal en tanto que se puedan preparar células de hibridoma a partir del animal. Los animales adecuados incluyen ratón, rata, hámster y conejo.

Los métodos para preparar ARN total a partir de una célula de hibridoma incluyen el método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)], y los métodos para preparar ARNm a partir del ARN total incluyen el método en columna con celulosa unida a oligo (dT) [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989)]. Los ejemplos de los kits para preparar ARNm a partir de una célula de hibridoma incluyen el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen) y el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

Los métodos para sintetizar el ADNc y preparar la librería de ADNc incluyen métodos convencionales [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1-34], o métodos que usan kits comercialmente disponibles tales como el sistema plasmídico para la síntesis de ADNc y clonación de plásmidos SuperScript™ (fabricado por GIBCO BRL) y el kit de síntesis de ADNc ZAP (fabricado por Stratagene).

En cuanto que preparación de la librería de ADNc, el vector para integrar el ADNc sintetizado usando como molde el ARNm extraído de una célula de hibridoma puede ser cualquier vector, en tanto que se pueda integrar el ADNc. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], λZAP 11 (fabricado por STRATAGENE), λgt10, λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell, pT7T3 18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)], y similares.

En cuanto que *Escherichia coli* para introducir la librería de ADNc construida con el vector fágico o plasmídico, se puede usar cualquier *Escherichia coli* en tanto que se pueda introducir, expresar y mantener la librería de ADNc. Los ejemplos de *Escherichia coli* adecuada incluyen XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], Y1088, Y1090 [Science, 222, 778 (1983)], NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], JM105 [Gene, 38, 275 (1985)], y similares.

Los métodos para seleccionar los clones de ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo derivado de animal no humano a partir de la librería de ADNc incluyen hibridación en colonias o hibridación en placa [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press Nueva York (1989)] usando una sonda marcada isotópicamente o fluorescentemente. También es posible preparar los ADNc que codifican VH y VL preparando cebadores y llevando a cabo la PCR [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press Nueva York (1989), Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1-34] usando como molde el ADNc o la librería de ADNc.

Las secuencias nucleotídicas de los ADNc seleccionados mediante los métodos anteriores se pueden determinar escindiendo los ADNc con enzimas de restricción apropiadas, clonando los fragmentos en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por STRATAGENE), y analizando entonces las secuencias mediante métodos de análisis de secuencias nucleotídicas generalmente empleados, tal como el método de didesoxi de Sanger *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)], o mediante el uso de analizadores de secuencias nucleotídicas tal como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems).

La longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL se deduce a partir de las secuencias nucleotídicas determinadas, y se compara con la longitud completa de secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo conocido [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], con lo cual se puede confirmar que los ADNc obtenidos codifican secuencias de aminoácidos que comprenden completamente VH y VL del anticuerpo, incluyendo secuencias señal secretoras.

Además, cuando la secuencia de aminoácidos de una región variable de un anticuerpo o la secuencia nucleotídica de ADN que codifica la región variable ya se conoce, el ADN se puede obtener mediante los siguientes métodos.

Cuando se conoce la secuencia de aminoácidos, el ADN se puede obtener diseñando una secuencia de ADN que codifica la región variable teniendo en cuenta la frecuencia de uso de codones [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], sintetizando varios ADN sintéticos constituidos de aproximadamente 100 nucleótidos en base a la secuencia de ADN diseñada, y llevando a cabo la PCR usando los ADN sintéticos. Cuando se conoce la secuencia nucleotídica, el ADN se puede obtener sintetizando varios ADN sintéticos constituidos de aproximadamente 100 nucleótidos en base a la información de secuencia nucleotídica, y llevando a cabo la PCR usando los ADN sintéticos.

(3) Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región V de un anticuerpo de un animal no humano

Comparando la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo que incluye secuencias señal secretoras con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo conocido [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], es posible deducir la longitud de las secuencias señal secretoras y las secuencias de aminoácidos N-terminales, y saber además el subgrupo al que pertenece el anticuerpo. Además, las secuencias de aminoácidos de CDRs de VH y VL se pueden deducir de manera similar.

(4) Construcción de un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano

Un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano se puede construir insertando los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo de un animal no humano en sitios aguas arriba de la dirección 5' de los genes que codifican CH y CL de un anticuerpo humano en el vector para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante descrita en el anterior 1 (1). Por ejemplo, un vector de expresión de anticuerpo humano híbrido se puede construir ligando los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo de un animal no humano respectivamente a ADN sintéticos que comprenden las secuencias nucleotídicas 3' terminales de VH y VL de un anticuerpo de animal no humano y las secuencias nucleotídicas 5' terminales de CH y CL de un anticuerpo humano y que tienen también secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción apropiadas en ambos extremos, e insertándolos en sitios aguas arriba de la dirección 5' de los genes que codifican CH y CL de un anticuerpo humano en el vector para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante descrita en el anterior 1 (1) a fin de expresarlos en una forma apropiada.

(5) Construcción de ADNc que codifica la región V de un anticuerpo humanizado

Los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo humanizado se pueden construir de la siguiente manera. En primer lugar, se seleccionan secuencias de aminoácidos de FRs de VH y VL de un anticuerpo humano para injertar CDRs de VH y VL de un anticuerpo derivado de animal no humano. Las secuencias de aminoácidos de FRs de VH y VL de un anticuerpo humano pueden ser cualquiera de aquellas de anticuerpos humanos. Las secuencias adecuadas incluyen las secuencias de aminoácidos de FRs de VHs y VLs de anticuerpos humanos registrados en bases de datos tales como Protein Data Bank, y las secuencia de aminoácidos comunes a los subgrupos de FRs de VHs y VLs de anticuerpos humanos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]. A fin de preparar un anticuerpo humanizado que tenga una actividad suficiente, se prefiere seleccionar secuencias de aminoácidos que tengan una homología tan alta como sea posible (al menos 60% o más) con las secuencias de aminoácidos de FRs de VH y VL del anticuerpo deseado derivado de animal no humano.

A continuación, las secuencias de aminoácidos de CDRs de VH y VL del anticuerpo deseado derivado de animal no humano se injertan en las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre FRs de VH y VL de un anticuerpo humano para diseñar secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo humanizado. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN teniendo en cuenta la frecuencia de uso de codones en las secuencias nucleotídicas de genes del anticuerpo [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], y se diseñan las secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado. Se sintetizan varios ADN sintéticos constituidos de aproximadamente 100 nucleótidos en base a las secuencias de ADN diseñadas, y se lleva a cabo la PCR usando los ADN sintéticos. Se prefiere diseñar 4 a 6 ADN sintéticos para cada una de la cadena H y la cadena L, en vista de la eficiencia de reacción de la PCR y las longitudes de los ADN que se pueden sintetizar.

La clonación en el vector para la expresión de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención construido en el anterior 1 (1) se puede llevar a cabo fácilmente introduciendo secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción apropiadas en los terminales 5' de los ADN sintéticos presentes en ambos extremos. Tras la PCR, los productos de la amplificación se clonan en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por STRATAGENE), y las secuencias nucleotídicas se determinan mediante el método descrito en el anterior 1 (2) para obtener un plásmido que porta secuencias de ADN que codifican las secuencia de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado deseado.

(6) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V de un anticuerpo humanizado

Se sabe que un anticuerpo humanizado preparado simplemente injertando CDRs de VH y VL de un anticuerpo derivado de animal no humano en FRs de VH y VL de un anticuerpo humano tiene menor actividad de unión a antígeno en comparación con el anticuerpo original derivado de animal no humano [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]. Esto es probablemente debido a que, en VH y VL del anticuerpo original derivado de animal no humano, no solo las CDRs sino también algunos de los restos de aminoácidos en FRs están implicados directa o indirectamente en la actividad de unión a antígeno, y tales restos de aminoácidos se sustituyen por restos de aminoácidos de FRs de VH y VL del anticuerpo humano mediante injerto de CDR. A fin de resolver este problema, se han realizado intentos en la preparación de un anticuerpo humanizado para elevar la actividad de unión a antígeno reducida identificando los restos de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de FRs de VH y VL de un anticuerpo humano que están directamente relacionados con la unión a un antígeno o que están indirectamente relacionados

con ella a través de la interacción con restos de aminoácidos en CDRs o el mantenimiento de la estructura tridimensional del anticuerpo, y modificando tales restos de aminoácidos por aquellos derivados del anticuerpo original derivado de animal no humano [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)].

En la preparación de un anticuerpo humanizado, lo más importante es identificar eficazmente los restos de aminoácidos en FR que están relacionados con la actividad de unión a antígeno. Para la identificación eficaz, se ha llevado a cabo la construcción y análisis de las estructuras tridimensionales de anticuerpos mediante cristalografía de rayos X [J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)], formación de modelos por ordenador [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)], y similares. Aunque estos estudios sobre las estructuras tridimensionales de los anticuerpos han proporcionado gran información útil para la preparación de anticuerpos humanizados, no hay ningún método establecido para preparar un anticuerpo humanizado que sea adaptable a cualquier tipo de anticuerpo. Esto es, actualmente, todavía es necesario realizar enfoques de ensayo y error, por ejemplo preparación de varias modificaciones para cada anticuerpo y examen de cada modificación en busca de la correlación con la actividad de unión a antígeno.

La modificación de los restos de aminoácidos en FRs de VH y VL de un anticuerpo humano se puede lograr mediante PCR como se describe en el anterior 1 (5) usando los ADN sintéticos para la modificación. La secuencia nucleotídica del producto de la amplificación por PCR se determina mediante el método descrito en el anterior 1 (2) para confirmar que se ha logrado la modificación deseada.

(7) Construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado

Un vector de expresión de anticuerpo humanizado se puede construir insertando los ADNcs que codifican VH y VL del anticuerpo humanizado construidos en los anteriores 1 (5) y (6) en sitios aguas arriba de la dirección 5' de los genes que codifican CH y CL de un anticuerpo humano en el vector para expresión de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención descrito en el anterior 1 (1). Por ejemplo, un vector de expresión de anticuerpo humanizado se puede construir introduciendo secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción apropiadas en los terminales 5' de ADN sintéticos presentes en ambos extremos entre los ADN sintéticos usados para construir VH y VL del anticuerpo humanizado en los anteriores 1 (5) y (6), e insertándolas en sitios aguas arriba de la dirección 5' de los genes que codifican CH y CL de un anticuerpo humano en el vector para la expresión del anticuerpo recombinante de la presente invención descrita en el anterior 1 (1) para expresarlos en una forma apropiada.

(8) Producción estable de un anticuerpo humanizado

Los transformantes capaces de producir de forma estable un anticuerpo híbrido humano y un anticuerpo humanizado se pueden obtener introduciendo los vectores de expresión del anticuerpo híbrido humano o del anticuerpo humanizado descritos en el anterior 1 (4) y (7) en células de animal apropiadas.

La introducción del vector de expresión del anticuerpo humanizado en una célula de animal se puede llevar a cabo mediante electroporación [Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891/90; Cytotechnology, 3, 133 (1990)], y similares.

En cuanto a la célula de animal para introducir el vector de expresión del anticuerpo híbrido humano o del anticuerpo humanizado, se puede usar cualquier animal capaz de producir un anticuerpo híbrido humano o un anticuerpo humanizado.

Los ejemplos de las células de animal incluyen estirpes celulares de mieloma de ratón NS0 y SP2/0, células de ovario de hámster chino CHO/dhfr- y CHO/DG44, estirpes celulares de mieloma de rata YB2/0 y IR983F, célula BHK derivada de riñón de hámster sirio, y la línea celular de mieloma humana Namalwa. Se prefieren la célula de ovario de hámster chino CHO/DG44 y la línea celular de mieloma de rata YB2/0.

Tras la introducción del vector de expresión del anticuerpo híbrido humano o del anticuerpo humanizado, el transformante capaz de producir de forma estable el anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado se puede seleccionar usando un medio para cultivo de células de animal que contiene un agente tal como sulfato de G418 (en lo sucesivo denominado G418; fabricado por SIGMA) según el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891/90. Los ejemplos de los medios para el cultivo de células de animal incluyen medio RPMI1640 (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), medio EX-CELL 302 (fabricado por JRH), medio IMDM (fabricado por GIBCO BRL), medio de hibridoma-SFM (fabricado por GIBCO BRL), y medios preparados añadiendo diversos aditivos, tales como suero fetal de ternera (en lo sucesivo denominado FCS), a estos medios. Cultivando en el medio el transformante obtenido, se puede formar y acumular en el sobrenadante del cultivo el anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado. La cantidad y la actividad de unión a antígeno del anticuerpo híbrido humano o del anticuerpo humanizado producido en el sobrenadante del cultivo se pueden medir mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzima [en lo sucesivo denominado ELISA; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Capítulo 14 (1998); Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] o similar. La

cantidad del anticuerpo híbrido humano o del anticuerpo humanizado a producir por el transformante se puede incrementar utilizando un sistema de amplificación del gen de DHFR, o similar, según el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891/90.

El anticuerpo híbrido humano o el anticuerpo humanizado se puede purificar a partir del sobrenadante del cultivo del transformante usando una columna con proteína A [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Capítulo 8 (1988); Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)]. Además, también se pueden usar métodos de purificación empleados generalmente para la purificación de proteínas. Por ejemplo, la purificación se puede llevar a cabo mediante combinaciones de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración, y similares. El peso molecular de la cadena H, de la cadena L o de toda la molécula de anticuerpo del anticuerpo híbrido humano o del anticuerpo humanizado purificado se puede medir mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizado con SDS [en lo sucesivo denominada SDS-PAGE; Nature, 227, 680 (1970)], transferencia Western [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Capítulo 12 (1988); Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)], y similares.

Se muestra anteriormente el método para producir la composición de anticuerpo usando como hospedadora una célula de animal. La composición de anticuerpo también se puede producir usando levadura, una célula de insecto, una célula vegetal, un individuo animal o un individuo vegetal, mediante métodos similares.

En consecuencia, cuando la célula hospedadora es capaz de expresar una molécula de anticuerpo, la composición de anticuerpo de la presente invención se puede producir introduciendo un gen que codifica un anticuerpo en la célula hospedadora que expresa una molécula de anticuerpo, cultivando la célula, y purificando la composición de anticuerpo deseada a partir del cultivo.

Cuando se usa levadura como la célula hospedadora, se puede usar como el vector de expresión YEP13 (ATCC 37115), YEp24 (ATCC 37051), YCp50 (ATCC 37419), y similares.

En cuanto que promotor, se puede usar cualquier promotor capaz de expresar en cepas de levadura. Los promotores adecuados incluyen promotores de genes de la ruta glicolítica, tales como hexosaquinasa, promotor de PHO5, promotor de PGK, promotor de GAP, promotor de ADH, promotor de gal 1, promotor de gal 10, promotor de proteína de choque térmico, promotor de MF α 1 y promotor de CUP 1.

Los ejemplos de células hospedadoras adecuadas son microorganismos que pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Trichosporon* y *Schwanniomyces*, y específicamente, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces alluvius* y similares.

La introducción del vector recombinante se puede llevar a cabo por cualquiera de los métodos para introducir ADN en levadura, por ejemplo electroporación [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)], el método de esferoplastos [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)], el método de acetato de litio [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)] y el método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978).

Cuando se usa una célula de animal como la célula hospedadora, se puede usar como el vector de expresión pcDNA1, pcDM8 (comercialmente disponible de Funakoshi Co., Ltd.), pAGE107 [Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 22979/91; Cytotechnology, 3, 133 (1990)], pAS3-3 [Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90], pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)], pcDNA1/Amp (fabricado por Invitrogen Corp.), pREP4 (fabricado por Invitrogen Corp.), pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)], pAGE210, y similares.

En cuanto que promotor, se puede usar cualquier promotor capaz de expresar en células de animal. Los promotores adecuados incluyen el promotor del gen IE (temprano inmediato) de citomegalovirus (CMV), el promotor temprano de SV40, el promotor de un retrovirus, el promotor de metalotioneína, el promotor de choque térmico, el promotor de SR α , y similares. El potenciador del gen IE de CMV humano se puede usar en combinación con el promotor.

Los ejemplos de células hospedadoras adecuadas son células Namalwa derivadas de ser humano, células COS derivadas de mono, células CHO derivadas de hámster chino, HBT5637 [Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 299/88], células de mieloma de rata, células de mieloma de ratón, células derivadas de riñón de hámster sirio, células madre embrionarias, óvulos fecundados, y similares.

Cuando se usa una célula de insecto como la célula hospedadora, la proteína se puede expresar mediante los métodos descritos en Current Protocols in Molecular Biology; Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992); Bio/Technology, 6, 47 (1988), y similares.

Esto es, el vector de expresión y un baculovirus se cotransfectan en células de insecto para obtener un virus recombinante en el sobrenadante del cultivo de las células de insecto, y entonces las células de insecto se infectan con el virus recombinante, con lo que se puede expresar la proteína.

Los vectores introductores de genes útiles en este método incluyen pVL1392, pVL1393, pBlueBacIII (productos de Invitrogen Corp.) y similares.

- 5 Un ejemplo del baculovirus es el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica*, que es un virus que infecta a insectos que pertenecen a la familia *Barathra*.

10 Los ejemplos de células de insecto son células ováricas de *Spodoptera frugiperda* Sf9 y Sf21 [Current Protocols in Molecular Biology; Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1992)] y células ováricas de *Trichoplusia ni* High 5 (fabricada por Invitrogen Corp.).

15 La cotransfección del vector de expresión anterior y del baculovirus anterior en células de insecto para la preparación del virus recombinante se puede llevar a cabo mediante el método de fosfato de calcio (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90), lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], y similares.

Cuando se usa una célula vegetal como la célula hospedadora, se puede usar como el vector de expresión el plásmido Ti, el vector del virus del mosaico del tabaco, y similares.

- 20 Como el promotor, se puede usar cualesquiera promotores capaces de expresar en células vegetales. Los promotores adecuados incluyen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor de actina 1 del arroz, y similares.

25 Los ejemplos de células hospedadoras adecuadas son células de plantas tales como tabaco, patata, tomate, zanahoria, haba de soja, colza, alfalfa, arroz, trigo y cebada.

30 La introducción del vector recombinante se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos para introducir ADN en células vegetales, por ejemplo el método que usa *Agrobacterium* (Solicitudes de Patente Japonesas Publicadas Sin Examinar nºs 140885/84 y 70080/85, documento WO94/00977), electroporación (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 251887/85) y el método que usa una pistola de partículas (pistola génica) (patentes japonesas nºs 2606856 y 2517813).

35 La introducción del vector recombinante se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos para introducir ADN en células de animal, por ejemplo electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], el método de fosfato de calcio (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90), lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], el método de inyección (*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*), el método que usa pistola de partículas (pistola génica) (patentes japonesas nºs 2606856 y 2517813), el método de DEAE-dextrano [Biomannual Series 4 - Methods of Gene Transfer, Expression and Analysis (Yodosha), editado por Takashi Yokota y Kenichi Arai (1994)] el método de vector vírico (*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*).

40 La expresión del gen que codifica el anticuerpo se puede llevar a cabo no solo mediante expresión directa sino también mediante producción secretora, expresión de una proteína de fusión de la región Fc y otra proteína, y similares, según los métodos descritos en *Molecular Cloning*, Segunda Edición.

- 45 La composición de anticuerpo se puede producir cultivando el transformante obtenido como anteriormente en un medio, permitiendo que se formen las moléculas de anticuerpo y se acumulen en el cultivo, y recuperándolas del cultivo. El cultivo del transformante en un medio se puede llevar a cabo por métodos convencionales para cultivar la célula hospedadora.

50 Para el cultivo del transformante obtenido usando como hospedador un eucariota tal como levadura, se puede usar cualquiera de medios naturales y medios sintéticos en tanto que sea un medio adecuado para el cultivo eficiente del transformante que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, y similares, que pueden ser asimiladas por el microorganismo usado.

55 Como las fuentes de carbono, se pueden usar cualesquiera fuentes de carbono que puedan ser asimiladas por el hospedador. Los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas incluyen hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melazas que los contienen, almidón e hidrolizado de almidón; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido propiónico; y alcoholes tales como etanol y propanol.

60 Como las fuentes de nitrógeno, se pueden usar amoníaco, sales de amonio de ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, acetato de amonio y fosfato de amonio, y otros compuestos que contienen nitrógeno, así como también peptona, extracto de carne, extracto de levadura, licor de maceración de maíz, hidrolizado de caseína, torta de haba de soja, hidrolizado de torta de haba de soja, y diversas células microbianas fermentadas y sus productos digeridos.

65 Los ejemplos de las sales inorgánicas incluyen dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, fosfato

de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, carbonato de calcio, y similares.

5 El cultivo se lleva a cabo habitualmente en condiciones aerobias, por ejemplo en un cultivo agitado o en cultivo con rotor sumergido bajo aireación. La temperatura del cultivo es preferiblemente 15 a 40°C, y el período de cultivo es habitualmente de 16 horas a 7 días. El pH se mantiene a entre 3,0 y 9,0 durante el cultivo. El ajuste del pH se lleva a cabo usando un ácido orgánico o inorgánico, una disolución alcalina, urea, carbonato de calcio, amoníaco, y similares.

10 Si es necesario, durante el cultivo se pueden añadir antibióticos tales como ampicilina y tetraciclina al medio.

15 Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante usando un promotor inducible, se puede añadir al medio, si es necesario, un inductor. Por ejemplo, en el caso de un microorganismo transformado con un vector recombinante usando el promotor *lac*, se puede añadir al medio isopropil-β-D-tiogalactopiranosido o similar; y en el caso de un microorganismo transformado con un vector recombinante usando el promotor *trp*, se puede añadir ácido indolacrílico o similar.

20 Para el cultivo del transformante obtenido usando una célula de animal como hospedadora, se puede usar como medio los medios empleados generalmente tales como medio RPMI1640 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio MEM de Eagle [Science, 122, 501 (1952)], medio MEM modificado de Dulbecco [Virology, 8, 396 (1959)], medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] y medio de Whitten [Developmental Engineering Experimentation Manual - Preparation of Transgenic Mice (Kodansha), editado por Motoya Katsuki (1987)], medios preparados añadiendo suero fetal de ternera o similar a estos medios, y similares.

25 El cultivo se lleva a cabo habitualmente en condiciones de pH 6,0 a 8,0 a 30 a 40°C durante 1 a 7 días en presencia de 5% de CO₂.

30 Si es necesario, se pueden añadir al medio durante el cultivo antibióticos tales como kanamicina y penicilina.

35 Para cultivar el transformante obtenido usando como hospedador una célula de insecto, se puede usar como medio los medios generalmente empleados tales como medio TNM-FH (fabricado por Pharmingen, Inc.), medio Sf-900 II SFM (fabricado por Life Technologies, Inc.), ExCell 400 y ExCell 405 (fabricado por JRH Biosciences, Inc.) y Medio de Insecto de Grace [Nature, 195, 788 (1962)].

El cultivo se lleva a cabo habitualmente en condiciones de pH 6,0 a 7,0 a 25 hasta 30°C durante 1 a 5 días.

Si es necesario, se pueden añadir al medio durante el cultivo antibióticos tales como gentamicina.

40 El transformante obtenido usando como hospedador una célula vegetal se puede cultivar en forma de células como tales o tras la diferenciación en células vegetales u órganos vegetales. Para cultivar tal transformante, se puede usar como medio los medios generalmente empleados tales como medio de Murashige-Skoog (MS) y medio de White, medios preparados añadiendo fitohormonas tales como auxina y citocinina a estos medios, y similares.

45 El cultivo se lleva a cabo habitualmente en condiciones de pH 5,0 a 9,0 a 20 hasta 40°C durante 3 a 60 días.

Si es necesario, durante el cultivo se pueden añadir antibióticos tales como kanamicina e higromicina al medio.

50 Como se ha descrito anteriormente, la composición de anticuerpo se puede producir cultivando, según un método de cultivo convencional, el transformante derivado de una célula de animal o una célula vegetal, y que porta un vector de expresión en el que se ha integrado ADN que codifica la molécula de anticuerpo, permitiendo que se forme y se acumule la composición de anticuerpo, y recuperando la composición de anticuerpo desde el cultivo.

55 La expresión del gen que codifica el anticuerpo se puede llevar a cabo no sólo mediante expresión directa sino también mediante producción secretora, expresión de proteína de fusión, y similares, según los métodos descritos en Molecular Cloning, Segunda Edición.

60 La composición de anticuerpo se puede producir mediante expresión intracelular en células hospedadoras, se puede producir mediante secreción extracelular a partir de células hospedadoras, o se puede producir sobre membranas exteriores de células hospedadoras. Un método de producción deseable se puede adoptar cambiando el tipo de las células hospedadoras usadas o la estructura de la molécula de anticuerpo a producir.

65 Cuando la composición de anticuerpo se produce en células hospedadoras o sobre membranas exteriores de células hospedadoras, es posible hacer que la composición de anticuerpo sea secretada fuera de las células hospedadoras aplicando el método de Paulson *et al.* [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)], el método de Lowe *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)], o los métodos descritos en la

Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 336963/93, documento WO94/23021, y similares.

Esto es, es posible hacer que la molécula de anticuerpo deseada sea secretada fuera de las células hospedadoras insertando ADN que codifica la molécula de anticuerpo y ADN que codifica un péptido señal adecuado para la expresión de la molécula de anticuerpo en un vector de expresión, introduciendo el vector de expresión en las células hospedadoras, y expresando entonces la molécula de anticuerpo mediante uso de técnicas de ADN recombinante.

También es posible incrementar la cantidad de la composición de anticuerpo a producir utilizando un sistema de amplificación génica usando un gen de dihidrofolato reductasa o similar, según el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90.

Además, la composición de anticuerpo se puede producir usando un individuo animal en el que se introduce un gen (animal transgénico no humano) o un individuo vegetal en el que se introduce un gen (planta transgénica) construido rediferenciando las células de animal o vegetales en las que se introducen los genes.

Cuando el transformante es un individuo animal o un individuo vegetal, la composición de anticuerpo se puede producir criando o cultivando el animal o vegetal de manera habitual, permitiendo que se forme y acumule en él la composición de anticuerpo, y recogiendo la composición de anticuerpo del individuo animal o individuo vegetal.

La producción de la composición de anticuerpo usando un individuo animal se puede llevar a cabo, por ejemplo, produciendo la composición de anticuerpo deseada en un mamífero construido introduciendo el gen según métodos conocidos [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996); American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996); Bio/Technology, 9, 830 (1991)].

En el caso de un individuo animal, la composición de anticuerpo se puede producir, por ejemplo, criando un animal transgénico no humano en el que se introduce ADN que codifica la molécula de anticuerpo, permitiendo que se forme y acumule en el animal la composición de anticuerpo, y recogiendo la composición de anticuerpo del animal. Los sitios en los que la composición de anticuerpo se forma y acumula incluyen leche (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 309192/88), huevo, o similar del animal. Como promotor en este proceso, se pueden usar cualesquiera promotores capaces de la expresión en un animal. Los promotores preferidos incluyen promotores específicos de células de la glándula mamaria, tales como el promotor de α caseína, el promotor de β caseína, el promotor de β lactoglobulina, y el promotor de la proteína ácida del suero lácteo.

La producción de la composición de anticuerpo usando un individuo vegetal se puede llevar a cabo, por ejemplo, cultivando una planta transgénica en la que se introduce ADN que codifica la molécula de anticuerpo según métodos conocidos [Soshiki Baiyo (Tissue Culture), 20 (1994); Soshiki Baiyo (Tissue Culture), 21 (1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)], permitiendo que se forme y se acumule en la planta la composición de anticuerpo, y recogiendo la composición de anticuerpo de la planta.

Cuando la composición de anticuerpo producida por el transformante en el que se introduce el gen que codifica la molécula de anticuerpo se expresa en forma soluble en células, las células se recuperan mediante centrifugación después de terminar el cultivo y se suspenden en un tampón acuoso, seguido de la disrupción usando un sonicador, una prensa francesa, el homogeneizador de Manton Gaulin, Dynomill, o similar, para obtener un extracto libre de células. Una preparación purificada de la composición de anticuerpo se puede obtener centrifugando el extracto libre de células para obtener el sobrenadante, y sometiendo después el sobrenadante a medios normales para aislar y purificar enzimas, por ejemplo extracción con un disolvente, precipitación salina con sulfato de amonio, y similares, desalado, precipitación con un disolvente orgánico, cromatografía de intercambio aniónico usando resinas tales como dietilaminoetil (DEAE)-Sefarosa y DIAION HPA-75 (fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation), cromatografía de intercambio catiónico usando resinas tales como S-Sepharose FF (fabricada por Pharmacia), cromatografía hidrófoba usando resinas tales como butil sefarosa y fenil sefarosa, filtración en gel usando un tamiz molecular, cromatografía de afinidad, cromatografía de electroforesis tal como electroenfoque, solos o en combinación.

Cuando la composición de anticuerpo se expresa como un cuerpo insoluble en las células, las células se recuperan y disgregan de forma similar, seguido de la centrifugación para recuperar el cuerpo insoluble de la composición de anticuerpo como una fracción del precipitado. El cuerpo insoluble recuperado de la composición de anticuerpo se solubiliza con un agente desnaturante de proteínas. La disolución de anticuerpo solubilizado se diluye o dializa, con lo que la composición de anticuerpo se renaturaliza para obtener la estructura tridimensional normal. Después, se puede obtener una preparación purificada de la composición de anticuerpo mediante los mismos métodos de aislamiento y purificación como se describen anteriormente.

Cuando la composición de anticuerpo se secreta extracelularmente, la composición de anticuerpo o su derivado se puede recuperar en el sobrenadante del cultivo. Esto es, el cultivo se trata por los mismos medios que antes, por ejemplo centrifugación, para obtener el sobrenadante del cultivo. Una preparación purificada de la composición de anticuerpo se puede obtener a partir del sobrenadante del cultivo usando los mismos métodos de aislamiento y

purificación como se describen anteriormente.

2. Preparación de célula productora de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención

La célula productora de la composición de anticuerpo que tiene actividad ADCC elevada así como actividad CDC elevada entre las composiciones de anticuerpo recombinante de la presente invención se puede producir preparando una célula hospedadora usada para la producción de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención mediante las siguientes técnicas, e introduciendo entonces en la célula hospedadora el vector de expresión del anticuerpo híbrido humano o del anticuerpo humanizado descrito en los anteriores 1 (4) y (7).

Específicamente, como célula hospedadora se selecciona una célula en la que está inactivada una enzima relacionada con la modificación de la cadena de azúcar unida mediante enlace N-glicosídico unida al Fc de una molécula de anticuerpo, esto es, una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en la cadena de azúcar unida mediante enlaces N-glucosídico de tipo complejo, o se puede usar una célula obtenida por diversas técnicas artificiales descritas más abajo. Los detalles se describen más abajo.

(1) Técnica de interrupción génica dirigida a un gen que codifica una enzima

La célula hospedadora usada para la producción de la célula que produce el anticuerpo que tiene actividad ADCC elevada (en lo sucesivo denominado anticuerpo con actividad ADCC elevada) se puede preparar mediante una técnica de interrupción génica dirigida a un gen que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de las enzimas relacionadas con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, incluyen GDP-manosa 4,6-deshidratasa (en lo sucesivo denominada GMD) y GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa (en lo sucesivo denominada Fx).

Los ejemplos de las enzimas relacionadas con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen α 1,6-fucosiltransferasa, α -L-fucosidasa, y similares. El gen como se usa aquí incluye ADN y ARN.

El método de interrupción génica puede ser cualquier método capaz de destruir el gen que codifica la enzima. Los métodos útiles incluyen el método antisentido, el método de ribozima, el método de recombinación homóloga, el método de oligonucleótido de ARN-ADN (en lo sucesivo denominado el método de RDO), el método de interferencia con ARN (en lo sucesivo denominado como método de ARNi), el método que usa un retrovirus y el método que usa un transposón, y similares. Estos métodos se describen específicamente más abajo.

(a) Preparación de la célula hospedadora para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada mediante el método antisentido o el método de ribozima

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar mediante el método antisentido o el método de ribozima descrito en Cell Technology, 12, 239 (1993); BIO/TECHNOLOGY, 17, 1097 (1999); Hum. Mol. Genet., 5, 1083 (1995); Cell Technology, 13, 255 (1994); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 1886 (1999); y similares, dirigido a un gen que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, por ejemplo, de la siguiente manera.

Se prepara un ADNc o un ADN genómico que codifica una enzima relacionada con la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Se determina la secuencia nucleotídica del ADNc o del ADN genómico preparado. Sobre la base de la secuencia de ADN determinada, se diseña un gen antisentido o una ribozima de longitud apropiada que comprende un resto de ADN que codifica una enzima relacionada con la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, o regiones no traducidas o intrones.

Con el fin de expresar el gen antisentido o ribozima en una célula, se prepara un vector recombinante insertando un

fragmento o una longitud completa del ADN preparado en un sitio aguas abajo en dirección 3' de un promotor en un vector de expresión apropiado.

Un transformante se puede obtener introduciendo el vector recombinante en una célula hospedadora adecuada para el vector de expresión.

La célula hospedadora usada para la producción de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico en la región Fc, en la que la relación de cadenas de azúcar en las que fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de las cadenas de azúcar entre las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico totales que se unen a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más, se puede obtener seleccionando un transformante usando, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora de anticuerpos con actividad ADCC elevada también se puede obtener seleccionando un transformante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular, o la estructura de la cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo producida.

Como la célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada, se puede usar cualquier levadura, célula de animal, célula de insecto, célula vegetal, o similar, en tanto que tenga un gen que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de las células hospedadoras incluyen aquellos descritos en el anterior 1.

Los vectores de expresión que se pueden emplear son aquellos capaces de una replicación autónoma o integración en el cromosoma en las células hospedadoras anteriores, y que comprenden un promotor en una posición apropiada para la transcripción del gen antisentido o ribozima diseñada. Los ejemplos de los vectores de expresión incluyen los descritos en el anterior 1.

La introducción de un gen en diversas células hospedadoras se puede llevar a cabo mediante los métodos adecuados para introducir un vector recombinante en diversas células hospedadoras descrito en el anterior 1.

La selección de un transformante usando, como índice, la actividad de una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante los siguientes métodos.

Métodos para seleccionar un transformante

Una célula en la que se suprime la actividad de una enzima relacionada con la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede seleccionar midiendo la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico usando métodos bioquímicos o técnicas de ingeniería genética descritos en Shin Seikagaku Jikken Koza (New Lectures on Experiments in Biochemistry) 3 - Saccharides 1, Glycoprotein (Tokyo Kagaku Dojin), editado por The Japanese Biochemical Society (1988); Cell Technology, Edición Extra, Experimental Protocol Series, Glycobiology Experimental Protocol, Glycoprotein, Glycolipid and Proteoglycan (Shujunsha), editado por Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Kiyoshi Furukawa y Kazuyuki Sugawara (1996); Molecular Cloning, Segunda Edición; Current Protocols in Molecular Biology; y similares. Un ejemplo de los métodos bioquímicos es un método en el que la actividad enzimática se evalúa usando un sustrato específico de la enzima. Los ejemplos de las técnicas de ingeniería genética incluyen análisis Northern y RT-PCR, en la que se mide la cantidad de ARNm para un gen que codifica la enzima.

La selección de un transformante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína sobre la membrana celular se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el método descrito en 2(5) más abajo. La selección de un transformante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante los métodos descritos en 4 o 5 más abajo.

La preparación de un ADNc que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el siguiente método.

Método de preparación de ADNc

El ARN total o el ARNm se prepara a partir de un tejido o célula de diversas células hospedadoras.

Una librería de ADNc se prepara a partir del ARN total o del ARNm obtenido.

Los cebadores degenerativos se preparan en base a la secuencia de aminoácidos de una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, y un fragmento génico que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se obtiene mediante PCR usando como molde la librería de ADNc preparada.

Un ADN que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede obtener mediante cribado de la librería de ADNc usando como sonda el fragmento génico obtenido.

En cuanto que ARNm de un tejido o célula de ser humano o de animal no humano, se puede usar uno comercialmente disponible (por ejemplo, fabricado por Clontech), o se puede preparar a partir de un tejido o célula humana o de animal no humano de la siguiente manera.

Los métodos para preparar ARN total a partir de un tejido o célula humana o de animal no humano incluyen el método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)], el método de tiocianato de guanidina ácida-fenol-cloroformo (AGPC) [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987); Experimental Medicine, 9, 1937 (1991)] y similares.

Los métodos para preparar ARNm como ARN poli(A)⁺ a partir del ARN total incluyen el método en columna con celulosa unida a oligo (dT) (Molecular Cloning, Segunda Edición).

También es posible preparar ARNm usando un kit comercialmente disponible, tal como el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen) o el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

Una librería de ADNc se prepara a partir del ARNm obtenido de un tejido o célula humana o de animal no humano. Los métodos para preparar la librería de ADNc incluyen los métodos descritos en Molecular Cloning, Segunda Edición; Current Protocols in Molecular Biology; A Laboratory Manual, 2ª Ed. (1989); y similares, y métodos que usan kits comercialmente disponibles tales como el sistema plasmídico SuperScript para la síntesis de ADNc y clonación plasmídica (fabricado por Life Technologies) y el kit de síntesis de ADNc ZAP (fabricado por STRATAGENE).

En cuanto que vector de clonación para preparar la librería de ADNc, se pueden usar cualesquiera vectores, por ejemplo vectores fágicos y vectores plasmídicos, en tanto que sean replicables de forma autónoma en *Escherichia coli* K12. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen ZAP Express [fabricado por STRATAGENE; Strategies, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], λ ZAP II (fabricado por STRATAGENE), λ gt10, λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)], λ Trip1Ex (fabricado por Clontech), λ ExCell (fabricado por Pharmacia), pT7T318U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)], y similares.

En cuanto que microorganismo hospedador para preparar la librería de ADNc, se puede usar cualquier microorganismo, pero se usa preferiblemente *Escherichia coli*. Los ejemplos de microorganismos hospedadores adecuados son *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [fabricado por STRATAGENE; Strategies, 5, 81 (1992)], *Escherichia coli* C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], *Escherichia coli* Y1088 [Science, 222, 778 (1983)], *Escherichia coli* Y1090 [Science, 222, 778 (1983)], *Escherichia coli* NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], *Escherichia coli* K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], *Escherichia coli* JM105 [Gene, 38, 275 (1985)], y similares.

La librería de ADNc se puede usar como en el siguiente análisis. Como alternativa, a fin de obtener eficazmente ADNc de longitud completa disminuyendo la relación de los ADNs parciales, se puede usar en el siguiente análisis una librería de ADNc preparada usando el método de oligo-cap desarrollado por Sugano *et al.* [Gene, 138, 171 (1994); Gene, 200, 149 (1997); Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 41, 603 (1996); Experimental Medicine, 11, 2491 (1993); cDNA Cloning (Yodosh) (1996); Methods for Preparing Gene Libraries (Yodosh) (1994)].

Los cebadores degenerativos específicos para las secuencias nucleotídicas 5'-terminal y 3'-terminal de una secuencia nucleotídica que se supone que codifica la secuencia de aminoácidos de una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se preparan en base a la secuencia de aminoácidos de la enzima. Un fragmento génico que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede obtener mediante amplificación del ADN mediante PCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)] usando como molde la librería de ADNc preparada.

Se puede confirmar que el fragmento génico obtenido es un ADN que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico analizando la secuencia nucleotídica mediante métodos de análisis de secuencias nucleotídicas generalmente empleados, tales como el método dideoxi de Sanger *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)], o mediante el uso de analizadores de secuencias nucleotídicas tal como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems).

Un ADN que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede obtener a partir del ADNc o de la librería de ADNc sintetizada a partir del ARNm contenido en un tejido o célula humana o de animal no humano mediante hibridación en colonias o hibridación en placas (Molecular Cloning, Segunda Edición) usando como sonda el fragmento génico anterior.

Un ADNc que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico también se puede obtener mediante amplificación mediante PCR usando como molde el ADNc o la librería de ADNc sintetizada a partir del ARNm contenido en un tejido o célula humana o de animal no humano y usando los cebadores usados para obtener el fragmento génico que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico.

La secuencia nucleotídica del ADN que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede determinar mediante métodos de análisis de secuencias nucleotídicas empleados generalmente, tales como el método dideoxi de Sanger *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)], o mediante el uso de analizadores de secuencias nucleotídicas tales como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems).

Al llevar a cabo una búsqueda de bases de datos de secuencias nucleotídicas tales como GenBank, EMBL o DDBJ usando un programa de búsqueda de homologías tal como BLAST en base a la secuencia nucleotídica determinada del ADNc, se puede confirmar que el ADN obtenido es un gen que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico entre los genes en la base de datos de secuencias nucleotídicas.

Los ejemplos de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, obtenidas mediante los métodos anteriores incluyen las secuencias nucleotídicas representadas por SEC ID N°: 18 o 20.

Los ejemplos de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifica la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico obtenidas mediante los métodos anteriores incluyen la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 22 o 23.

El ADNc que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico también se puede obtener mediante síntesis química con un sintetizador de ADN, tal como el sintetizador de ADN modelo 392 (fabricado por Perkin Elmer) utilizando el método de fosforamido en base a la secuencia nucleotídica determinada del ADN deseado.

La preparación de un ADN genómico que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el siguiente método.

Método para preparar ADN genómico

El ADN genómico se puede preparar mediante métodos conocidos descritos en Molecular Cloning, Segunda Edición, *Current Protocols in Molecular Biology*, y similares. Además, el ADN genómico que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico también se puede obtener usando un kit, tal como el Sistema de Cribado de Librerías de ADN Genómico (fabricado por Genome Systems) o los kits Universal GenomeWalker™ (fabricados por CLONTECH).

La secuencia nucleotídica del ADN que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede determinar mediante métodos de análisis de secuencias nucleotídicas generalmente empleados tales como el método dideoxi de Sanger *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)], o mediante el uso de analizadores de secuencias nucleotídicas tales como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems).

Al llevar a cabo una búsqueda de bases de datos de secuencias nucleotídicas tales como GenBank, EMBL o DDBJ usando un programa de búsqueda de homologías tal como BLAST en base a la secuencia nucleotídica determinada del ADN genómico, se puede confirmar que el ADN obtenido es un gen que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico entre los genes en la base de datos de secuencias nucleotídicas.

El ADN genómico que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico también se puede obtener mediante síntesis química con un sintetizador de ADN, tal como el sintetizador de ADN modelo 392 (fabricado por Perkin Elmer) utilizando el método de fosforamido en base a la secuencia nucleotídica determinada del ADN.

Los ejemplos de las secuencias nucleotídicas de los ADN genómicos que codifican la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, obtenidas mediante los métodos anteriores incluyen las secuencias nucleotídicas representadas por SEC ID N°: 26, 27, 28 y 29.

Un ejemplo de la secuencia nucleotídica del ADN genómico que codifica la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico obtenida mediante los métodos anteriores es la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 30.

La célula hospedadora usada para la producción de la composición de anticuerpo de la presente invención también se puede obtener sin usar un vector de expresión introduciendo directamente en una célula hospedadora un

oligonucleótido antisentido o una ribozima diseñada en base a la secuencia nucleotídica que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico.

El oligonucleótido antisentido o ribozima se puede preparar mediante métodos conocidos, o usando un sintetizador de ADN. Específicamente, en base a la información de secuencia en un oligonucleótido que tiene una secuencia que corresponde a 5 a 150, preferiblemente 5 a 60, más preferiblemente 10 a 40 nucleótidos continuos en la secuencia nucleotídica del ADNc y del ADN genómico que codifican la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, se puede sintetizar un oligonucleótido que corresponde a la secuencia complementaria al oligonucleótido anterior (oligonucleótido antisentido) o una ribozima que comprende la secuencia oligonucleotídica.

El oligonucleótido incluye oligo ARN y derivados del oligonucleótido (en lo sucesivo denominados derivados oligonucleotídicos).

Los derivados oligonucleotídicos incluyen un derivado oligonucleotídico en el que el enlace de fosfodiéster en el oligonucleótido se convierte en un enlace de fosforioato, un derivado oligonucleotídico en el que el enlace de fosfodiéster en el oligonucleótido se convierte en un enlace N3'-P5' fosforoamidato, un derivado oligonucleotídico en el que el enlace de ribosa-fosfodiéster en el oligonucleótido se convierte en un enlace de péptido-ácido nucleico, un derivado oligonucleotídico en el que el uracilo en el oligonucleótido se sustituye por C-5 propiniluracilo, un derivado oligonucleotídico en el que el uracilo en el oligonucleótido se sustituye por C5 tiazoliluracilo, un derivado oligonucleotídico en el que la citosina en el oligonucleótido se sustituye por C5 propinilcitosina, un derivado oligonucleotídico en el que la citosina en el oligonucleótido se sustituye por citosina modificada con fenoxazina, un derivado oligonucleotídico en el que la ribosa en el oligonucleótido se sustituye por 2'-O-propilribosa, y un derivado oligonucleotídico en el que la ribosa en el oligonucleótido se sustituye por 2'-metoxietoxirribosa [Cell Technology, 16, 1463 (1997)].

(b) Preparación de la célula hospedadora para la producción de célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada mediante el método de recombinación homóloga

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada de la presente invención se puede preparar modificando un gen diana en el cromosoma mediante el método de recombinación homóloga dirigido a un gen que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico.

La modificación del gen diana en el cromosoma se puede llevar a cabo usando los métodos descritos en *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (en lo sucesivo denominado "*Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*"; Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells, Yodosha (1995) (en lo sucesivo denominado *Preparation of Mutant Mice Using ES Cells*); y similares., por ejemplo, de la siguiente manera.

Se prepara un ADN genómico que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico.

En base a la secuencia nucleotídica del ADN genómico, se prepara un vector diana para recombinación homóloga de un gen diana a modificar (por ejemplo, el gen estructural o gen promotor para la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico).

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar introduciendo en una célula hospedadora el vector diana preparado y seleccionando una célula en la que se produjo la recombinación homóloga entre los genes diana en el cromosoma y el vector diana.

Como la célula hospedadora, se puede usar cualquier levadura, célula de animal, célula de insecto, célula vegetal, o similar, en tanto que tenga un gen que codifique la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar

intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de las células hospedadoras incluyen los descritos en el anterior 1.

El ADN genómico que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede preparar mediante los métodos para preparar un ADN genómico descritos en el anterior 1 (1) (a).

Los ejemplos de las secuencias nucleotídicas de los ADN genómicos que codifican la enzima relacionada con la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, obtenidas mediante los métodos anteriores incluyen las secuencias nucleotídicas representadas por SEC ID N°: 26, 27, 28 y 29.

Un ejemplo de la secuencia nucleotídica del ADN genómico que codifica la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico obtenida mediante los métodos anteriores es la secuencia nucleotídica representada por SEC ID N°: 30.

El vector diana para uso en la recombinación homóloga del gen diana en el cromosoma se puede preparar según los métodos descritos en Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells, Yodosha (1995); y similares. El vector diana puede ser un tipo de sustitución o un tipo de inserción.

La introducción del vector diana en diversas células hospedadoras se puede llevar a cabo mediante los métodos adecuados para introducir un vector recombinante en diversas células hospedadoras, descritos en el anterior 1.

Los métodos para seleccionar eficazmente un recombinante homólogo incluyen selección positiva, selección mediante promotor, selección negativa y selección mediante poliA, descritos en Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press en Oxford University Press (1993); Biomanual Series 8, Gene Targeting, Preparation of Mutant Mice Using ES Cells, Yodosha (1995); y similares. Los métodos para seleccionar el recombinante homólogo deseado a partir de las líneas celulares seleccionadas incluyen hibridación Southern (*Molecular Cloning*, Segunda Edición) y PCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)] con el ADN genómico.

(c) Preparación de la célula hospedadora para la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada mediante el método de RDO

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar mediante el método de RDO dirigido a un gen que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, por ejemplo de la siguiente manera.

Un ADNc o un ADN genómico que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se prepara mediante los métodos descritos en el anterior 1 (1) (a). Se determina la secuencia nucleotídica del ADNc o ADN genómico preparado. En base a la secuencia de ADN determinada, se diseña y sintetiza un constructo de RDO de longitud apropiada que comprende una parte que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, una parte de su región no traducida o una parte de intrones.

La célula hospedadora se puede obtener introduciendo el RDO sintetizado en una célula hospedadora y seleccionando entonces un transformante en el que se produjo una mutación en la enzima diana, esto es, la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico.

Como célula hospedadora, se puede usar cualquier levadura, célula de animal, célula de insecto, célula vegetal, o

similar, en tanto que tenga un gen que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de las células hospedadoras incluyen los descritos en el anterior 1.

La introducción del RDO en diversas células hospedadoras se puede llevar a cabo mediante los métodos adecuados para introducir un vector recombinante en diversas células hospedadoras descritas en el anterior 1.

El ADNc que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede preparar mediante los métodos para preparar un ADNc descritos en el anterior 2 (1) (a) o similares.

El ADN genómico que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico se puede preparar mediante los métodos para preparar un ADN genómico descritos en el anterior 2 (1) (b) o similares.

Después de que el ADN se escinde con enzimas de restricción apropiadas, la secuencia nucleotídica del ADN se puede determinar subclonando los fragmentos de ADN en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), sometiendo los clones a la reacción usada generalmente como un método para analizar una secuencia nucleotídica, tal como el método dideoxi de Sanger *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)] o similar, y analizando entonces los clones usando un analizador de secuencias nucleotídicas automático, tal como el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems) o similar.

El RDO se puede preparar mediante métodos convencionales o usando un sintetizador de ADN. Los métodos para seleccionar una célula en la que se produjo una mutación introduciendo el RDO en la célula hospedadora, en el gen que codifica la enzima, esto es, la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, incluyen los métodos para detectar directamente mutaciones en genes cromosómicos descritos en Molecular Cloning, Segunda Edición, Current Protocols in Molecular Biology, y similares.

Para la selección del transformante, también se pueden emplear los siguientes métodos: el método que usa, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico descrito en el anterior 2 (1) (a); el método que usa, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína en la membrana celular descrito en 2 (5) más abajo; y el método que usa, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida descrito en 4 o 5 más abajo.

El RDO se puede diseñar según las descripciones en Science, 273, 1386 (1996); Nature Medicine, 4, 285 (1998); Hepatology, 25, 1462 (1997); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); Gene Therapy, 5, 1960 (1999); J. Mol. Med., 75, 829 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8774 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8768 (1999); Nuc. Acids Res., 27, 1323 (1999); Invest. Dermatol., 111, 1172 (1998); Nature Biotech., 16, 1343 (1998); Nature Biotech., 18, 43 (2000); Nature Biotech., 18, 555 (2000); y similares.

(d) Preparación de la célula hospedadora para la producción de la célula productora del anticuerpo de actividad ADCC elevada mediante el método de ARNi

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar mediante el método de ARNi dirigido a un gen que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, por ejemplo de la siguiente manera.

Un ADNc que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo

complejo unida mediante enlace N-glucosídico se prepara mediante los métodos descritos en el anterior 2 (1) (a). Se determina la secuencia nucleotídica del ADNc preparado. En base a la secuencia de ADNc determinada, se diseña un gen de ARNi de longitud apropiada que comprende una parte que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, o una parte de regiones no traducidas.

Con el fin de expresar el gen de ARNi en una célula, se prepara un vector recombinante insertando un fragmento o longitud completa del ADNc preparado en un sitio aguas abajo en dirección 3' de un promotor en un vector de expresión apropiado. El vector recombinante se introduce en una célula hospedadora adecuada para la expresión del vector, para obtener un transformante. La célula hospedadora usada para la preparación de la célula productora de anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede obtener seleccionando un transformante usando, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, o la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida o una glicoproteína en la membrana celular.

En cuanto que célula hospedadora, se puede usar cualquier levadura, célula de animal, célula de insecto, célula vegetal, o similar, en tanto que tenga un gen que codifique la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de las células hospedadoras incluyen los descritos en el anterior 1.

Los vectores de expresión que se pueden emplear son aquellos capaces de una replicación autónoma o de integración en el cromosoma en las células hospedadoras anteriores y que comprenden un promotor en una posición apropiada para la transcripción del gen de ARNi diseñado. Los ejemplos de los vectores de expresión incluyen los descritos en el anterior 1.

La introducción de un gen en diversas células hospedadoras se puede llevar a cabo mediante los métodos adecuados para introducir un vector recombinante en diversas células hospedadoras descritas en el anterior 1.

Los métodos para seleccionar el transformante usando, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen los métodos descritos en el anterior (2) (1) (a).

Los métodos para seleccionar el transformante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína en la membrana celular incluyen el método descrito en 2 (5). Los métodos para seleccionar el transformante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluyen los métodos descritos en 4 o 5 más abajo.

Los métodos para preparar ADNc que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen los métodos para preparar un ADNc descrito en el anterior 2 (1) (a), y similares.

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad CDC elevada y con actividad ADCC elevada también se puede obtener, sin usar un vector de expresión, introduciendo directamente en una célula hospedadora el gen de ARNi diseñado en base a la secuencia nucleotídica que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico.

El gen de ARNi se puede preparar mediante métodos conocidos o usando un sintetizador de ADN. El constructo del gen de ARNi se puede diseñar según las descripciones en Nature, 391, 806 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502 (1998); Nature, 395, 854 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049 (1999); Cell, 95, 1017 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959 (1998); Nature Cell Biol., 2, 70 (2000); y similares.

(e) Preparación de la célula hospedadora para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada mediante el método que usa un transposón

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar usando el sistema transposónico descrito en Nature Genet., 25, 35 (2000), y similares, y seleccionando entonces un mutante usando, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, o la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida o una glicoproteína en la membrana celular.

El sistema transposónico es un sistema para inducir una mutación mediante inserción al azar de un gen exógeno en el cromosoma, en el que habitualmente se usa como vector para inducir una mutación un gen exógeno insertado en un transposón y al mismo tiempo se introduce en la célula un vector de expresión de transposasa para insertar aleatoriamente el gen en el cromosoma.

Se puede usar cualquier transposasa en tanto que sea adecuada para la secuencia del transposón a usar.

Como el gen exógeno, se puede usar cualquier gen en tanto que pueda inducir una mutación en el ADN de una célula hospedadora.

Como la célula hospedadora, se puede usar cualquier levadura, célula de animal, célula de insecto, célula vegetal, o similar, en tanto que tenga un gen que codifique la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de las células hospedadoras incluyen los descritos en el anterior 1. La introducción del gen en diversas células hospedadoras se puede llevar a cabo mediante los métodos adecuados para introducir un vector recombinante en diversas células hospedadoras, descritos en el anterior 1.

Los métodos para seleccionar el mutante usando, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen los métodos descritos en el anterior 2 (1) (a).

Los métodos para seleccionar el mutante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína en la membrana celular incluyen el método descrito en 2 (5). Los métodos para seleccionar el mutante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluyen los métodos descritos en 4 o 5 más abajo.

(2) Técnica para introducir un mutante dominante negativo de un gen que codifica una enzima

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar usando la técnica de introducir un mutante dominante negativo de un gen diana, es decir, un gen que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de las enzimas relacionadas con la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, incluyen GMD y Fx. Los ejemplos de las enzimas relacionadas con la modificación de una cadena de azúcar en la que en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen α 1,6-fucosiltransferasa y α -L-fucosidasa.

Estas enzimas tienen especificidad por el sustrato y catalizan reacciones específicas. Destruyendo el centro activo de tales enzimas que tienen especificidad por el sustrato y actividad catalítica, se pueden preparar sus mutantes dominantes negativos. La preparación de un mutante dominante negativo se describe con detalle más abajo, usando como ejemplo, entre las enzimas diana, GMD.

Como resultado del análisis de la estructura tridimensional de GMD derivada de *Escherichia coli*, se ha revelado que cuatro aminoácidos (treonina en la posición 133, ácido glutámico en la posición 135, tirosina en la posición 157 y lisina en la posición 161) tienen una función importante para la actividad enzimática (Structure, 8, 2, 2000). Esto es, los mutantes preparados sustituyendo los cuatro aminoácidos anteriores por otros aminoácidos en base a la información de la estructura tridimensional mostraron todos ellos una actividad enzimática significativamente reducida. Por otro lado, se observó poco cambio en la capacidad de los mutantes para unirse a la coenzima de GMD

NADP o al sustrato GDP-manosa. En consecuencia, un mutante dominante negativo se puede preparar sustituyendo los cuatro aminoácidos que son responsables de la actividad enzimática de GMD. En base al resultado de la preparación de un mutante dominante negativo de GMD derivada de *Escherichia coli*, se pueden preparar mutantes dominantes negativos llevando a cabo una comparación de homología y una predicción de la estructura tridimensional usando la información de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, en el caso de GMD derivada de célula CHO (SEC ID N°: 19), un mutante dominante negativo se puede preparar sustituyendo treonina en la posición 155, ácido glutámico en la posición 157, tirosina en la posición 179 y lisina en la posición 183 por otros aminoácidos. La preparación de tal gen que posee sustituciones de aminoácidos introducidas se puede llevar a cabo mediante mutagénesis dirigida al sitio, descrita en Molecular Cloning, Segunda Edición, Current Protocols in Molecular Biology, y similares.

La célula hospedadora usada para la producción de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar según el método de introducción génica descrito en Molecular Cloning, Segunda Edición, Current Protocols in Molecular Biology, Manipulating the Mouse Embryo, Segunda Edición, y similares, usando un gen que codifica un mutante dominante negativo de una enzima diana (en lo sucesivo abreviado gen de mutante dominante negativo) preparado como anteriormente, por ejemplo de la siguiente manera.

Se prepara un gen del mutante dominante negativo que codifica la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico.

En base al ADN de longitud completa del gen del mutante dominante negativo preparado, se prepara según las necesidades un fragmento de ADN de longitud apropiada que contiene una región que codifica la proteína.

Se prepara un vector recombinante insertando el fragmento de ADN o el ADN de longitud completa en un sitio en dirección 3' de un promotor en un vector de expresión apropiado. El vector recombinante se introduce en una célula hospedadora adecuada para el vector de expresión, para obtener un transformante.

La célula hospedadora usada para la preparación de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede obtener seleccionando un transformante usando, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, o la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida o una glicoproteína en la membrana celular.

Como célula hospedadora, se puede usar cualquier levadura, célula de animal, célula de insecto, célula vegetal, o similar, en tanto que tenga un gen que codifique la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de las células hospedadoras incluyen aquellos descritos en el anterior 1.

Los vectores de expresión que se pueden emplear son aquellos capaces de una replicación autónoma o de una integración en el cromosoma en las células hospedadoras anteriores y que comprenden un promotor en una posición apropiada para la transcripción del ADN que codifica el mutante dominante negativo deseado. Los ejemplos de los vectores de expresión incluyen los descritos en el anterior 1.

La introducción de un gen en diversas células hospedadoras se puede llevar a cabo mediante los métodos adecuados para introducir un vector recombinante en diversas células hospedadoras descritas en el anterior 1.

Los métodos para seleccionar el transformante usando, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen los métodos descritos en 2 (1) (a) más abajo.

Los métodos para seleccionar el transformante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína en la membrana celular incluyen el método descrito en 2 (5) más abajo. Los métodos para seleccionar el transformante usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluyen los métodos descritos en 4 o 5 más abajo.

(3) Técnica para introducir una mutación en una enzima

La célula hospedadora usada para la preparación la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se

puede preparar introduciendo una mutación en un gen que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico, y seleccionando entonces una línea celular deseada en la que se produjo la mutación en la enzima.

Los ejemplos de las enzimas relacionadas con la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, incluyen GMD, Fx, y similares. Los ejemplos de las enzimas relacionadas con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen α 1,6-fucosiltransferasa, α -L-fucosidasa, y similares.

Los métodos para introducir una mutación en la enzima incluyen: 1) un método en el que se selecciona una línea celular deseada a partir de mutantes obtenidos sometiendo una línea celular progenitora a mutagénesis o mediante mutación espontánea usando, como índice, la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico; 2) un método en el que se selecciona una línea celular deseada a partir de mutantes obtenidos sometiendo una línea celular progenitora a mutagénesis o mediante mutación espontánea usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida; y 3) un método en el que se selecciona una línea celular deseada a partir de mutantes obtenidos sometiendo una línea celular progenitora a mutagénesis o mediante mutación espontánea usando, como índice, la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína en la membrana celular.

La mutagénesis se puede llevar a cabo mediante cualquier método capaz de inducir una mutación de punto, una mutación de supresión o una mutación de desplazamiento del marco en ADN de una célula de una línea celular progenitora. Los métodos adecuados incluyen el tratamiento con etil nitrosourea, nitrosoguanidina, benzopireno o un colorante de acridina e irradiación. Como mutágenos, también son útiles diversos agentes alquilantes y carcinógenos. Un mutágeno se deja actuar sobre una célula mediante los métodos descritos en Soshiki Baiyo no Gijutsu (Tissue Culture Techniques), Tercera Edición (Asakura Shoten), editado por The Japanese Tissue Culture Association (1996); Nature Genet., 24, 314 (2000); y similares.

Los ejemplos de los mutantes generados mediante mutación espontánea incluyen mutantes espontáneos obtenidos continuando el subcultivo en condiciones habituales de cultivo celular sin ningún tratamiento particular para mutagénesis.

Los métodos para medir la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen los métodos descritos en el anterior 1 (1) (a). Los métodos para determinar la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluyen los métodos descritos en 4 o 5 más abajo. Los métodos para determinar la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína en la membrana celular incluyen el método descrito en el anterior 2 (5).

(4) Técnica para suprimir la transcripción o traducción de un gen que codifica una enzima

La célula hospedadora usada para la preparación de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar suprimiendo la transcripción o traducción de un gen diana, es decir, un gen diana que codifica una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico usando técnica de ARN/ADN antisentido [Bioscience and Industry, 50, 322 (1992); Chemistry, 46, 681 (1991); Biotechnology, 9, 358 (1992); Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992); Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992); Cell Technology, 16, 1463 (1997)], la técnica de la triple hélice [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)], y similares.

Los ejemplos de las enzimas relacionadas con la síntesis del nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, incluyen GMD, Fx, y similares. Los ejemplos de las enzimas relacionadas con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen α 1,6-fucosiltransferasa, α -L-fucosidasa, y similares.

Los métodos para medir la actividad de la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena

de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico incluyen los métodos descritos en el anterior 2 (1) (a).

Los métodos para determinar la estructura de la cadena de azúcar de una glicoproteína en la membrana celular incluyen el método descrito en el anterior 2 (5). Los métodos para determinar la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo producida incluyen los métodos descritos en 4 o 5 más abajo.

(5) Técnica para seleccionar una línea celular resistente a una lectina que reconoce una estructura en la cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar unida mediante enlace N-glicosídico

La célula hospedadora usada para la preparación de la célula productora del anticuerpo con actividad ADCC elevada se puede preparar seleccionando una línea celular resistente a una lectina que reconoce a una estructura de la cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar unida mediante enlace N-glicosídico.

La selección de una línea celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar unida mediante enlace N-glicosídico se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el método que usa una lectina descrito en Somatic Cell Mol. Genet., 12, 51 (1986), y similares.

Como la lectina, se puede usar cualquier lectina en tanto que reconozca una estructura de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar unida mediante enlace N-glicosídico. Los ejemplos específicos incluyen lectina de lenteja LCA (aglutinina de lenteja derivada de *Lens culinaris*), lectina de guisante PSA (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), lectina de haba ancha VFA (aglutinina derivada de *Vicia faba*) y lectina de *Aleuria aurantia* AAL (lectina derivada de *Aleuria aurantia*).

Específicamente, la línea celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el terminal reductor a través del enlace α en una cadena de azúcar unida mediante enlace N-glicosídico se puede seleccionar cultivando células en un medio que contiene la lectina anterior a una concentración de 1 μ g/ml a 1 mg/ml durante un día a 2 semanas, preferiblemente un día a una semana, subcultivando las células que sobreviven o recogiendo una colonia y transfiriéndola a una vasija de cultivo, y continuando subsiguientemente el cultivo usando el medio que contiene la lectina.

3. Evaluación de la actividad de la composición de anticuerpo

La cantidad de proteína, actividad de unión a antígeno o actividad citotóxica de la composición de anticuerpo purificada puede medirse usando los procedimientos conocidos descritos en *Monoclonal Antibodies*, *Antibody Engineering*, o similar.

En particular, cuando la composición de anticuerpo es un anticuerpo híbrido humano o un anticuerpo humanizado, la actividad de unión a un antígeno o la actividad de unión a una línea celular cultivada que es positiva para antígeno puede medirse mediante ELISA, la técnica del anticuerpo fluorescente [*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993)].

El procedimiento de medición de la actividad ADCC incluye un procedimiento en el que una célula diana marcada con un radioisótopo, una sustancia fluorescente, y a continuación, se mide la actividad de la sustancia marcada liberada de la célula diana dañada; un procedimiento, en el que se permite que una célula diana entre en contacto con un anticuerpo y una célula efectora, y a continuación, se mide la actividad biológica de una enzima liberada de la célula diana dañada, y similar.

El procedimiento de medición de la actividad CDC incluye un procedimiento en el que se permite que una célula diana marcada con radioisótopo, una sustancia fluorescente, un colorante o similar entre en contacto con un anticuerpo y una muestra biológica tal como un suero que contiene un componente complementario, y a continuación, se mide la actividad de la sustancia marcada liberada de la célula diana dañada; un procedimiento en el que se permite que una célula diana entre en contacto con un anticuerpo y una muestra biológica tal como un suero que contiene un componente complementario, y a continuación, se mide la actividad biológica de una enzima liberada de la célula diana dañada; y similar.

La seguridad y el efecto terapéutico de la composición de anticuerpo en humanos pueden ser evaluados utilizando un modelo animal apropiado de una especie relativamente próxima a la humana, por ejemplo, mono cynomolgus.

4. Análisis de cadenas de azúcar en la composición de anticuerpo

La estructura de la cadena de azúcar de la molécula de anticuerpo expresada en diversas células se puede analizar según métodos generales de análisis de la estructura de la cadena de azúcar de glicoproteína. Por ejemplo, una

(1) Análisis de composiciones de azúcares neutros y aminoazúcares

La composición de la cadena de azúcar de una composición de anticuerpo se puede analizar llevando a cabo la hidrólisis ácida de las cadenas de azúcar con ácido trifluoroacético o similar, para liberar azúcares neutros o aminoazúcares, y analizando la relación de la composición.

Específicamente, el análisis se puede llevar a cabo mediante un método usando un dispositivo de análisis de hidratos de carbono fabricado por Dionex. BioLC es un dispositivo para analizar la composición de azúcar mediante HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia con detección amperométrica pulsada [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577 (1983)]).

La relación de composiciones también se puede analizar mediante el método de marcaje por fluorescencia usando 2-aminopiridina. Específicamente, la relación de composiciones se puede calcular marcando por fluorescencia una muestra hidrolizada con ácido mediante 2-aminopiridilación según un método conocido [Agric. Biol. Chem., 55(1), 283-284 (1991)], y analizando entonces la composición mediante HPLC.

(2) Análisis de la estructura de la cadena de azúcar

La estructura de la cadena de azúcar de una composición de anticuerpo se puede analizar mediante cartografiado de la cadena de azúcar bidimensional [Anal. Biochem., 171, 73 (1988); Seibutsukagaku Jikkenho (Biochemical Experimentation Methods) 23 - Totankakushitsu Tosa Kenkyuho (Methods of Studies on Glycoprotein Sugar Chains), Gakkai Shuppan Center, editado por Reiko Takahashi (1989)]. El cartografiado de la cadena de azúcar bidimensional es un método para deducir una estructura de la cadena de azúcar, por ejemplo representando gráficamente el tiempo de retención o la posición de elución de una cadena de azúcar mediante cromatografía de fase inversa como el eje X y el tiempo de retención o posición de elución de la cadena de azúcar mediante cromatografía en fase normal como el eje Y, respectivamente, y comparándolos con los resultados de cadenas de azúcar conocidas.

Específicamente, una cadena de azúcar se libera de un anticuerpo mediante hidrazinólisis del anticuerpo y marcaje fluorescente con 2-aminopiridina (en lo sucesivo denominada PA) [J. Biochem., 95, 197 (1984)]. Después de separarla de un reactivo en exceso de tratamiento de PA mediante filtración en gel, la cadena de azúcar se somete a cromatografía de fase inversa. Después, cada pico de la cadena de azúcar fraccionada se somete a cromatografía de fase normal. La estructura de la cadena de azúcar se puede deducir representando gráficamente los resultados obtenidos en un mapa de la cadena de azúcar bidimensional y comparándolos con las manchas de un patrón de cadenas de azúcar (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) o aquellas en la bibliografía [Anal. Biochem., 171, 73 (1988)].

La estructura deducida por el cartografiado de la cadena de azúcar bidimensional se puede confirmar llevando a cabo la espectrometría de masas, por ejemplo MALDI-TOF-MS, de cada cadena de azúcar.

5. Método para determinar la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo

Una composición de anticuerpo comprende una molécula de anticuerpo que tiene diferentes estructuras de cadena de azúcar que se unen a la región Fc del anticuerpo. Entre las composiciones de anticuerpo de la presente invención, la composición de anticuerpo recombinante que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en la región Fc, en la que la relación de cadenas de azúcar en la que fucosa no está unida a la N-acetilglucosamina en el terminal reductor a las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glicosídico totales unidas a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más, muestra actividad ADCC elevada. Tal composición de anticuerpo se puede determinar usando el método para analizar la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo descrito en el anterior 4. Además, también se puede determinar mediante inmunoensayos usando lectinas.

La determinación de la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo mediante inmunoensayos usando lectinas se puede hacer según los inmunoensayos tales como tinción Western, RIA (radioinmunoensayo), VIA (viroinmunoensayo), EIA (enzimoinmunoensayo), FIA (fluoroinmunoensayo) y MIA (metaloimunoensayo) descritos en la bibliografía [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc. (1995); Enzyme Immunoassay, 3ª Ed., Igaku Shoin (1987); Enzyme Antibody Technique, Edición Revisada, Gakusai Kikaku (1985); y

similares], por ejemplo de la siguiente manera.

Se marca una lectina que reconoce la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo que constituye una composición de anticuerpo, y la lectina marcada se somete a reacción con una composición de anticuerpo de muestra, seguido de la medida de la cantidad de un complejo de la lectina marcada con la molécula de anticuerpo.

Los ejemplos de lectinas útiles para determinar la estructura de la cadena de azúcar de una molécula de anticuerpo incluyen WGA (aglutinina de germen de trigo (derivada de *T. vulgaris*), ConA (concanavalina A derivada de *C. ensiformis*), RIC (toxina derivada de *R. communis*), L-PHA (leucoaglutinina derivada de *P. vulgaris*), LCA (aglutinina de lenteja derivada de *L. culinaris*), PSA (lectina de guisante derivada de *P. sativum*), AAL (lectina de *Aleuria aurantia*), ACL (lectina de *Amaranthus caudatus*), BPL (lectina de *Bauhinia purpurea*), DSL (lectina de *Datura stramonium*), DBA (aglutinina de *Dolichos biflorus*), EBL (lectina de corteza de saúco negro), ECL (lectina de *Erythrina cristagalli*), EEL (lectina de *Euonymus europaeus*), GNL (lectina de *Galanthus nivalis*), GSL (lectina de *Griffonia simplicifolia*), HPA (aglutinina de *Helix pomatia*), HHL (lectina de híbridos *Hippeastrum*), Jacalina, LTL (lectina de *Lotus tetragonolobus*), LEL (lectina de *Lycopersicon esculentum*), MAL (lectina de *Maackia amurensis*), MPL (lectina de *Maclura pomifera*), NPL (lectina de *Narcissus pseudonarcissus*), PNA (aglutinina de cacahuete), E-PHA (eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*), PTL (lectina de *Psophocarpus tetragonolobus*), RCA (aglutinina de *Ricinus communis*), STL (lectina de *Solanum tuberosum*), SJA (aglutinina de *Sophora japonica*), SBA (aglutinina de haba de soja), UEA (aglutinina de *Ulex europaeus*), VVL (lectina de *Vicia villosa*) y WFA (aglutinina de *Wisteria floribunda*).

Se prefiere usar lectinas que reconocen específicamente una estructura de la cadena de azúcar en la que la fucosa está unida a la N-acetilglucosamina en el terminal reductor en cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico. Los ejemplos de tales lectinas incluyen lectina de lenteja LCA (aglutinina de lenteja derivada de *Lens culinaris*), lectina de guisante PSA (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), lectina de haba ancha VFA (aglutinina derivada de *Vicia faba*) y lectina de *Aleuria aurantia* AAL (lectina derivada de *Aleuria aurantia*).

6. Utilización de la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención

Puesto que la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención tiene actividad CDC mayor que un anticuerpo IgG1 y un anticuerpo IgG3, tiene propiedad en efectos terapéuticos más excelente que las composiciones de anticuerpo convencionales. También, entre las composiciones de anticuerpo de la presente invención, puesto que la composición de anticuerpo recombinante que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico en la región Fc, en la que la relación de cadenas de azúcar en la que fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de las cadenas de azúcar entre las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico totales que se unen a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más tiene mayor actividad CDC y mayor actividad ADCC que un anticuerpo IgG1 y un anticuerpo IgG3, tiene una propiedad más excelente en efectos terapéuticos que las composiciones de anticuerpo convencionales. Además, entre las composiciones de anticuerpo recombinantes de la presente invención, es más preferida la composición de anticuerpo recombinante que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico en la región Fc, en la que la relación de cadenas de azúcar en la que fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de las cadenas de azúcar entre las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas mediante enlace N-glucosídico totales que se unen a la región Fc contenidas en la composición es 100%.

Un medicamento que comprende la composición de anticuerpo recombinante de la presente invención se puede administrar como un agente terapéutico solo. Sin embargo, preferiblemente se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y se proporciona como una preparación farmacéutica producida mediante un método arbitrario bien conocido en el campo técnico de la farmacia.

Es deseable administrar el medicamento por la vía que sea más eficaz para el tratamiento. Las vías de administración adecuadas incluyen la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración intraoral, la administración intratraqueal, la administración intrarrectal, la administración subcutánea, la administración intramuscular y la administración intravenosa. En el caso de una preparación de anticuerpo, es preferible la administración intravenosa.

El medicamento puede estar en forma de pulverización, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabe, emulsión, supositorio, inyección, ungüento, cinta, y similares.

Las preparaciones adecuadas para administración oral incluyen emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos y gránulos.

Las preparaciones líquidas tales como emulsiones y jarabes se pueden preparar usando, como aditivos, agua, azúcar (por ejemplo, sacarosa, sorbitol y fructosa), glicoles (por ejemplo, polietilenglicol y propilenglicol), aceites (por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de haba de soja), antisépticos (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos),

sabores (por ejemplo, sabor a fresas y menta piperita), y similares.

Las cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares, se pueden preparar usando, como aditivos, excipientes (por ejemplo, lactosa, glucosa, sacarosa y manitol), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón y alginato de sodio), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio y talco), aglutinantes (por ejemplo polialcohol vinílico, hidroxipropilcelulosa y gelatina), tensioactivos (por ejemplo, ésteres de ácidos grasos), plastificantes (por ejemplo, glicerina), y similares.

Las preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen inyecciones, supositorios y pulverizaciones.

Las inyecciones se pueden preparar usando vehículos que comprenden una disolución salina, una disolución de glucosa, o una mezcla de las mismas, y similares. También es posible preparar inyecciones en polvo liofilizando la composición de anticuerpo según un método convencional y añadiéndole cloruro de sodio.

Los supositorios se pueden preparar usando vehículos tales como manteca de cacao, grasa hidrogenada y ácido carboxílico.

La composición de anticuerpo se puede administrar como tal en forma de pulverización, o se pueden preparar pulverizaciones usando vehículos que no estimulen la membrana mucosa oral o de las vías respiratorias de un receptor y que puedan dispersar la composición de anticuerpo como partículas finas para facilitar su absorción.

Los vehículos adecuados incluyen lactosa y glicerina. También es posible preparar aerosoles, polvos secos, y similares, según las propiedades de la composición de anticuerpo y los vehículos usados. Al preparar estas preparaciones parenterales, también se pueden añadir los aditivos mencionados anteriormente para las preparaciones orales.

La dosis y frecuencia de administración variarán dependiendo del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración, del período de tratamiento, de la edad del paciente, peso corporal, y similar. Sin embargo, una dosis apropiada del ingrediente activo para una persona adulta es generalmente 10 µg/kg a 20 mg/kg por día.

El efecto antitumoral de la composición de anticuerpo frente a diversas células tumorales se puede examinar mediante ensayos *in vitro* tal como la medida de la actividad CDC y la medida de la actividad ADCC, y ensayos *in vivo* tales como experimentos antitumorales usando sistemas de tumores en animales experimentales (por ejemplo, ratones).

Las medidas de la actividad CDC y de la actividad ADCC y los experimentos antitumorales se pueden llevar a cabo según los métodos descritos en la bibliografía [Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373 (1993); Cancer Research, 54, 1511 (1994); y similares].

En la presente memoria se describe una composición de anticuerpo recombinante que es un anticuerpo IgG1 humano, que comprende un dominio CH2 en el que los aminoácidos en las posiciones 276 y 339 indicadas por el índice EU como en Kabat *et al.* están reemplazados por otros aminoácidos y tiene una actividad citotóxica dependiente de complemento más mejorada que un anticuerpo que comprende un dominio CH2 antes de que los aminoácidos hayan sido reemplazados; un ADN que codifica una molécula de anticuerpo o una región constante de la cadena pesada de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante; un transformante obtenible mediante la introducción del ADN en una célula hospedadora; un procedimiento para producir la composición de anticuerpo recombinante utilizando el transformante; y un medicamento que comprende la composición de anticuerpo recombinante como ingrediente activo.

La presente invención se describe a continuación en base a los Ejemplos; sin embargo, la presente invención no está limitada a ellos.

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, y anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 usando células de animal

1. Producción de un vector de expresión de anticuerpo híbrido IgG3 humano anti-CD20

Se sintetizó ADNc a partir de ARN poli A+ derivado de ganglios linfáticos humanos (fabricado por BD Biosciences Clontech) usando el kit de síntesis de ADNc (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones adjuntas en él. Se llevó a cabo la PCR usando como molde 100 ng de ADNc, y usando KOD plus (fabricado por TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos específicos de la región constante de IgG humana (fabricados por FASMAC) que comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID N°:1 y 2 según las instrucciones adjuntas de KOD plus. La PCR se llevó a cabo usando GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por

Applied Biosystems) tras la desnaturalización térmica a 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos que consisten en reacciones a 94°C durante 15 segundos, a 62°C durante 30 segundos y a 68°C durante 90 segundos. Tras llevar a cabo adicionalmente la reacción a 68°C durante 7 minutos, se le añadieron 2,5 U de Taq DNA polymerase (fabricado por Takara Shuzo) y se dejó reaccionar a 68°C durante 7 minutos a fin de añadir adenina al término 3'. La disolución de la reacción se sometió a electroforesis usando gel de agarosa al 1%, y se recuperó un fragmento amplificado de alrededor de 1,1 kpb que se considera que es un gen de la región constante de la cadena pesada de IgG3 usando el kit de extracción en gen QIAquick (fabricado por Qiagen). Se llevó a cabo una reacción de ligación con un vector plasmídico pCRII-TOPO (fabricado por Invitrogen) añadiendo disolución Ligation High (fabricada por TOYOBO), y se transformó *Escherichia coli* DH5 α (fabricada por TOYOBO) usando la disolución de la reacción. Cada ADN plasmídico se preparó a partir de los clones transformantes así obtenidos, y se dejó reaccionar usando Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (fabricado por Applied Biosystems) según las instrucciones adjuntas, y después la secuencia nucleotídica del ADN insertado en el plásmido se analizó mediante un secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 DNA Analyzer de la misma compañía, para confirmar que esta secuencia es una secuencia nucleotídica que codifica la misma secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de un IgG3 humano convencionalmente conocido (número de acceso GenBank AAH33178).

Un fragmento génico de 1,13 kpb en la región constante de cadena pesada de IgG3 se purificó a partir del plásmido descrito anteriormente en el que se insertó el gen de la región constante de cadena pesada de IgG3 humano, mediante tratamiento con enzimas de restricción *Apal* y *NruI* (ambas fabricadas por Takara Shuzo). El vector de expresión de célula de animal estable para anticuerpo híbrido IgG1 humano anti-CD20 (descrito en el documento WO03/055993), pKANTEX2B8P, que comprende una región variable idéntica a la región variable derivada de ratón de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 Rituxan, región constante de cadena ligera de tipo κ humana y región constante de cadena pesada de IgG1 humano, se digirió con *Apal* y *NruI*. El vector de expresión para el anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, pKANTEX2B8 γ 3 (figura 2), se construyó escindiendo el gen de la región constante de IgG1, purificando el fragmento que queda de alrededor de 12,6 kpb, y ligándolo con el fragmento génico de la región constante de IgG3 descrito anteriormente, usando la disolución Ligation High. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera y de la región constante de cadena ligera del anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 codificado por pKANTEX2B8 γ 3 fueron idénticas a las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera y de la región constante de cadena ligera del anticuerpo híbrido IgG1 humano anti-CD20 codificado por pKANTEX2B8P.

2. Producción de vector de expresión de anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20

Un anticuerpo de isotipo híbrido que se une a CD20, en el que las secuencias de aminoácidos de la región variable y de la región constante de cadena ligera son idénticas a las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera y de la región constante de cadena ligera del anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 codificado por pKANTEX2B8P y la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo IgG1 humano codificada por pKANTEX2B8P y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo IgG3 humano, codificada por pKANTEX2B8P, se preparó según el siguiente procedimiento. El anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 que tiene una región constante de cadena pesada en la que el CH1 y la bisagra están constituidos por secuencias de aminoácidos procedentes de un anticuerpo IgG1 humano, y la región Fc está constituida por secuencias de aminoácidos procedentes de un anticuerpo IgG3 humano, se denomina anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 que tiene una región constante de cadena pesada en la que el CH1 y la bisagra están constituidos por secuencias de aminoácidos procedentes de un anticuerpo IgG3 humano, y la región Fc está constituida por la secuencia de aminoácidos procedentes de un anticuerpo IgG1 humano, se denomina anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311. Como resultado de la búsqueda usando bases de datos de secuencias de aminoácidos, se encontró que las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de cadena pesada de estos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 son secuencias de aminoácidos nuevas.

En la Tabla 1 se muestran las subclases a partir de las cuales se derivó cada dominio del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311, y las secuencias de aminoácidos de regiones constantes de cadena pesada correspondientes. En la figura 3 se muestra una ilustración esquemática de estos anticuerpos anti-CD20.

Tabla 1

Nombre estructural	CH1	Bisagra	CH2	CH3	Secuencia de aminoácidos
1133	IgG1	IgG1	IgG3	IgG3	SEC ID NO: 3
3311	IgG3	IgG3	IgG1	IgG1	SEC ID NO: 4

(1) Construcción de vector de expresión que codifica el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133

El vector de expresión que codifica el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, se

construyó de la siguiente manera (Fig. 4).

Un fragmento de ADN de alrededor de 430 pb que codifica CH1 y la bisagra del anticuerpo IgG1 humano se escindió y purificó a partir del vector de expresión del anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, pKANTEX2B8P, usando las enzimas de restricción *Apal* (fabricada por Takara Shuzo) y *BmgBI* (fabricada por New England Biolabs). Por otro lado, un fragmento de ADN de alrededor de 13 kpb se escindió y purificó a partir del vector de expresión para anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, pKANTEX2B8γ3, descrito en el apartado 1 de este Ejemplo, mediante el tratamiento similar con enzimas de restricción. Tras mezclar estas preparaciones de ADN purificadas, se llevó a cabo una reacción de ligación usando la disolución Ligation High (fabricada por TOYOBO), y se transformó *Escherichia coli* XL1-BLUE MRF' (fabricado por Stratagene) usando la disolución de reacción. Cada ADN plasmídico se preparó a partir de los clones transformantes así obtenidos y se dejó reaccionar usando Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (fabricado por Applied Biosystems) según las instrucciones adjuntas en él, y entonces la secuencia nucleotídica del ADN insertado en el plásmido se analizó mediante un secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 DNA Analyzer de la misma compañía para confirmar que se obtuvo el plásmido pKTX93/1133 mostrado en la figura 4.

(2) Construcción de vector de expresión que codifica el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311

El vector de expresión que codifica el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311, pKTX93/3311, se construyó de la siguiente manera (Fig. 5). Un fragmento de ADN de alrededor de 570 pb que codifica CH1 y la bisagra del anticuerpo IgG3 humano se escindió y purificó a partir del vector de expresión del anticuerpo híbrido IgG3 humano anti-CD20, pKANTEX2B8γ3, descrito en el apartado 1 de este Ejemplo, usando las enzimas de restricción *Apal* (fabricada por Takara Shuzo) y *BmgBI* (fabricada por New England Biolabs). Por otro lado, un fragmento de ADN de alrededor de 13 kpb se escindió y purificó a partir del vector de expresión para el anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, pKANTEX2B8P, mediante el tratamiento similar con enzimas de restricción. Tras mezclar estas preparaciones de ADN purificadas, se llevó a cabo una reacción de ligación usando la disolución Ligation High (fabricada por TOYOBO), y se transformó *Escherichia coli* XL1-BLUE MRF' (fabricado por Stratagene) usando la disolución de reacción. Cada ADN plasmídico se preparó a partir de los clones transformantes así obtenidos y se dejó reaccionar usando Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (fabricado por Applied Biosystems) según las instrucciones adjuntas en él, y entonces la secuencia nucleotídica del ADN insertado en el plásmido se analizó mediante un secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 DNA Analyzer de la misma compañía para confirmar que se obtuvo el plásmido pKTX93/3311 mostrado en la figura 5.

3. Expresión estable de diversos anticuerpos anti-CD20 en células de animal

Las células para producir de forma estable un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 o un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20, en las que el vector de expresión para anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, pKTX93/1133, y los vectores de expresión para el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20, pKTX93/1133 y pKTX93/3311, preparados en los apartados 1 y 2 de este Ejemplo, se introdujeron en una célula CHO/DG44 [Somatic Cell Mol. Genet., 12, 555 (1986)] y la célula CHO/DG44 en la que el gen de α 1,6-fucosiltransferasa se genosuprimió (en lo sucesivo denominada CHO/FUT8^{-/-}) [Biotechnol. Bioeng., 87, 614 (2004)] como células hospedadoras, se prepararon de la siguiente manera. La célula CHO/DG44 es una célula hospedadora ampliamente usada en la producción de proteína recombinante. La CHO/FUT8^{-/-} es una célula hospedadora en la que FUT8 de la célula CHO/DG44 está genosuprimido en el genoma. Además, el vector de expresión para anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, pKANTEX2B8P, se introdujo en la célula CHO/FUT8^{-/-} sola, y se preparó de la misma manera una célula capaz de producir de forma estable un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20.

Tras introducir 8 μ g de cada vector de expresión en $1,6 \times 10^6$ células de la célula CHO/DG44 o la célula CHO/FUT8^{-/-} mediante el método de electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], las células se suspendieron en 40 ml de IMDM-(10) [medio IMDM (fabricado por GIBCO-BRL) que contiene 10% de suero fetal bovino dializado (dFBS)] y se dispensaron a 100 μ l/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Tras cultivar a 37°C durante 24 horas en una incubadora con 5% de CO₂, las células se cultivaron durante 1 a 2 semanas en el IMDM-(10) que contiene G418 a concentración de 500 μ g/ml. Tras el cultivo, el sobrenadante del cultivo se recuperó de cada pocillo, y la cantidad del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 en el sobrenadante del cultivo se midió mediante el ELISA que se describe más tarde en el apartado 4 de este Ejemplo. Con respecto a los transformantes de pocillos en los que se encontró expresión del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 en los sobrenadantes del cultivo, a fin de incrementar la cantidad de expresión de anticuerpo usando el sistema de amplificación del gen *dhfr*, las células se suspendieron en el medio IMDM-(10) que contiene G418 a concentración de 500 μ g/ml y metotrexato a concentración de 50 nM (en lo sucesivo denominado MTX: fabricado por SIGMA) como inhibidor de dihidrofolato reductasa que fue el producto del gen *dhfr*, y se cultivaron a 37°C durante alrededor de 1 semana en una incubadora con 5% de CO₂ para obtener de ese modo transformantes que tienen resistencia a 50 nM de MTX. Subsiguientemente, la concentración de MTX se elevó sucesivamente hasta 100 nM y después hasta 200 nM para obtener finalmente transformantes que pueden proliferar en el medio IMDM-(10) que contiene G418 a concentración de 500 μ g/ml y 200 nM de MTX y también pueden expresar a nivel elevado los anticuerpos codificados por los vectores de expresión respectivos.

4. Medida de la concentración de anticuerpo en el sobrenadante del cultivo (ELISA)

El anticuerpo anti-IgG (H y L) humana de cabra (fabricado por American Qualex) se diluyó hasta 1 µg/ml con disolución salina tamponada con fosfato (en lo sucesivo denominada PBS), se dispensó a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos para ELISA (fabricado por Greiner) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para adsorción. Tras la reacción, la placa se lavó con PBS, y se le añadió a 100 µl/pocillo PBS que contiene 1% de seroalbúmina bovina (en lo sucesivo denominada BSA; fabricada por Proliant Inc) (en lo sucesivo denominada 1% BSA-PBS), y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los grupos activos que quedan. Tras eliminar la 1% BSA-PBS, los sobrenadantes del cultivo a medir se añadieron a 50 µl/pocillo y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras la reacción, cada pocillo se lavó con PBS que contiene 0,05% de Tween 20 (en lo sucesivo denominada Tween-PBS), y entonces se añadió a 50 µl/pocillo una disolución de anticuerpo anti-IgG (Fc) humana de cabra marcada con peroxidasa (fabricada por American Qualex) diluida 500 veces con PBS como la disolución de anticuerpo secundario y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con Tween-PBS, se añadió a 50 µl/pocillo disolución de sustrato ABTS [una disolución preparada disolviendo 0,55 g de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) de amonio en 1 litro de tampón de citrato 0,1 M (pH 4,2) y añadiendo 1 µl/ml de peróxido de hidrógeno justo antes del uso] para desarrollar el color, y se midió la absorbancia a 415 nm (en lo sucesivo denominada OD415).

5. Purificación de los diversos anticuerpos híbridos anti-CD20

Cada uno de los transformantes capaces de expresar diversos anticuerpos anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 de este Ejemplo se suspendió en IMDM-FCS(10) que contiene 200 nM de MTX hasta una densidad de 1×10^5 células/ml, y después se dispensó a 100 ml en matraces triples (fabricados por Nalgenunc) y se cultivó a 37°C durante 2 días en una incubadora con 5% de CO₂. El sobrenadante del cultivo se retiró de cada matraz, el interior del matraz se lavó con 50 ml de PBS, y entonces se añadieron 100 ml de medio EXCELL 301 (fabricado por JRH Biosciences) al matraz para continuar el cultivo a 37°C durante 5 días en la incubadora con 5% de CO₂. Este sobrenadante del cultivo se recuperó, se centrifugó a 3000 rpm y 4°C durante 5 minutos, y después el sobrenadante se recuperó y se sometió a esterilización por filtración usando una membrana de PES de 0,22 µm (fabricada por Iwaki). Los diversos anticuerpos anti-CD20 se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo así esterilizados usando una columna empaquetada con Prosep-A (resina de unión a Proteína-A: fabricada por Millipore) o Prosep-G (resina de unión a Proteína-G: fabricada por Millipore) según las instrucciones adjuntas en ella. El anticuerpo IgG1 anti-CD20 se purificó mediante proteína A, pero puesto que el anticuerpo IgG3 anti-CD20 no se purificó mediante proteína A, la purificación se llevó a cabo usando proteína G. Con respecto a los anticuerpos de isotipo híbrido, el tipo 3311 se purificó mediante proteína A. Por otro lado, el tipo 1133 no se purificó con proteína A, pero se pudo purificar mediante proteína G.

El vector de expresión y la célula hospedadora de cada anticuerpo, y los nombres de las muestras de anticuerpo purificadas se muestran en la Tabla 2. A este respecto, en la tabla, las muestras que tienen (+F) en el nombre indican una muestra de anticuerpo producida usando CHO/DG44 como la célula hospedadora en la que la fucosa está unida a cadenas de azúcar unidas a Fc, y las muestras que tiene (-F) en el nombre indican muestras de anticuerpo producidas utilizando CHO/FUT8^{-/-} como la célula hospedadora en la que la fucosa no está unida a cadenas de azúcar unidas a Fc.

Tabla 2

Vector de expresión	Célula hospedadora	Anticuerpo purificado (nombre)
pKANTEX2B8	CHO/FUT8 ^{-/-}	CD20-IgG1(-F)
pKANTEX2B8γ3	CHO/DG44	CD20-IgG3(+F)
pKANTEX2B8γ3	CHO/FUT8 ^{-/-}	CD20-IgG3(-F)
pKTX93/1133	CHO/DG44	1133(+F)
pKTX93/1133	CHO/FUT8 ^{-/-}	1133(-F)
pKTX93/3311	CHO/DG44	3311(+F)
pKTX93/3311	CHO/FUT8 ^{-/-}	3311(-F)

6. Evaluación del grado de purificación de diversas muestras de anticuerpo anti-CD20 purificadas mediante SDS-PAGE

A fin de evaluar el grado de purificación de las muestras purificadas de diversos anticuerpos anti-CD20 obtenidos en el apartado 5 de este Ejemplo, se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (en lo sucesivo denominada SDS-PAGE) según un método convencionalmente conocido [Nature, 227, 680 (1970)], usando alrededor de 1 µg de cada una de las muestras purificadas de diversos anticuerpos anti-CD20. Como control comparativo del grado de electroforesis, también se llevó a cabo la misma operación para un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 Rituxan. En lo sucesivo, Rituxan se denomina CD20-IgG1(+F).

Como resultado, 1133(+F) y 1133(-F) mostraron un patrón de electroforesis similar al del anticuerpo IgG1 humano CD20-IgG1(+F), y 3311(+F) y 3311(-F) mostraron un patrón de electroforesis similar al del anticuerpo IgG3 humano CD20-IgG3(+F). En el caso de CD20-IgG1(+F), CD20-IgG1(-F), 1133(+F) y 1133(-F), la banda de la cadena H se encontró a alrededor de 50 kilodaltons (en lo sucesivo denominado kDa), y la de la cadena L se encontró a alrededor de 24 kDa, y en el caso de CD20-IgG3(+F), CD20-IgG3(-F), 3311(+F) y 3311(-F), la banda de la cadena H se encontró a alrededor de 54 kDa, y la de la cadena L se encontró a alrededor de 24 kDa, de manera que se confirmó que cada uno de los anticuerpos anti-CD20 preparados está constituido por la cadena H y la cadena L deseadas.

En base a los resultados anteriores, se confirmó que las moléculas de IgG deseadas constituidas por la cadena H y la cadena L están contenidas en una relación suficiente en las muestras purificadas de anticuerpos anti-CD20 respectivos obtenidos en el apartado 5 de este Ejemplo.

Ejemplo 2

Evaluación de la actividad de diversos anticuerpos anti-CD20

Se llevó a cabo la comparación de diversas actividades para las muestras purificadas de diversos anticuerpos anti-CD20 obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1, de la siguiente manera.

1. Medida de la actividad de unión de diversos anticuerpos anti-CD20 a células positivas para CD20

La actividad de unión de los diversas muestra de purificación de anticuerpos anti-CD20 obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1 a células positivas para CD20 se midió en un sistema de inhibición competitiva con Rituxan biotinilado, mediante técnica de anticuerpo fluorescente usando un citómetro de flujo. Como controles negativos, se usó un anticuerpo IgG1 humano anti-Her2 Herceptina [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 4285 (1992)] y un anticuerpo IgG1 humano anti-CCR4 KM3060 [Cancer Res., 64, 2127 (2004)].

Se dispensó una célula Daudi de línea celular derivada de linfoma de Burkitt positiva para CD20 (ATCC: CCL-213) a 5×10^5 células por pocillo en una placa en U de 96 pocillos (fabricada por Falcon), y entonces se le añadió a 50 μ l/pocillo un tampón para FACS [IgG humana 0,2 mg/ml (fabricada por Sigma), 0,02% de EDTA, 0,05% de NaN_3 , 1% de BSA] que contiene 10 μ g/ml o 1 μ g/ml de los anticuerpos anti-CD20 respectivos obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1, o los controles negativos anticuerpo anti-Her2 Herceptina [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 4285 (1992)] y anticuerpo anti-CCR4 KM3060 (documento WO02/31140), y que contiene 0,5 μ g/ml de anticuerpo híbrido anti-CD20 Rituxan marcado con biotina [preparado biotinilando Rituxan usando EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (fabricado por Pierce)]. Tras la reacción a 4°C durante 60 minutos a la sombra, las células se lavaron dos veces con el tampón para FACS, y después se les añadió a 50 μ l/pocillo la estreptoavidina marcada con PE diluida 200 veces con el tampón para FACS. Tras la reacción a 4°C durante 60 minutos a la sombra, las células se lavaron dos veces con el tampón para FACS y se suspendieron en 1 ml del tampón para FACS, y entonces se midió la intensidad de la fluorescencia con un citómetro de flujo EPICS-XL (fabricado por Coulter).

Los resultados se muestran en la figura 6. Los controles negativos, anticuerpo anti-Her2 Herceptina y anticuerpo anti-CCR4 KM3060, no inhibieron la unión de Rituxan marcado con biotina a la célula Daudi positiva para CD20, pero todos los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20, los anticuerpos IgG1 humanos anti-CD20 y los anticuerpos IgG3 humanos anti-CD20 inhibieron la unión de forma dependiente de la concentración, y el grado fue casi el mismo. Asimismo, en todos los anticuerpos anti-CD20, la muestra de anticuerpo producida por CHO/DG44 como célula hospedadora y la muestra de anticuerpo producida en CHO/FUT8^{-/-} como célula hospedadora muestran una actividad de inhibición de unión similar, y la presencia o ausencia de fucosa en las cadenas de azúcar unidas al anticuerpo no tuvo influencia en la actividad de inhibición de unión. En base a estos resultados, se mostró que la unión al antígeno de los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 es específica para CD20, y que la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 es similar a la del anticuerpo híbrido IgG1 humano anti-CD20, y la presencia o ausencia de fucosa en las cadenas de azúcar unidas al Fc no tuvo influencia en la actividad de unión a antígeno.

2. Medida de la actividad CDC de diversos anticuerpos anti-CD20 frente a célula Daudi

La actividad CDC *in vitro* de las muestras purificada de diversos anticuerpos anti-CD20 obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1 se midió usando una célula Daudi positiva para CD20.

La reacción se llevó a cabo en una placa de fondo plano de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite), y se dispensó, a 150 μ l, un medio de dilución del complemento humano [preparado diluyendo un complemento humano (fabricado por SIGMA) 6 veces con medio RPMI 1640 (fabricado por GIBCO BRL) que contiene 10% de FBS (fabricado por JRH)] que contiene 5×10^4 células de la célula Daudi y que contiene 0,3 μ g/ml de la muestra purificada de anticuerpo, en pocillos de reacción respectivos. Además, se preparó como control, en caso de que no se indujera CDC, un pocillo de reacción que no contiene anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 (pocillo de reacción del 0%), y un pocillo de reacción que no contiene célula Daudi (pocillo de reacción del 100%) como control en el

caso de que se indujera CDC. Tras cultivar a 37°C durante 2 horas en una atmósfera de 5% de CO₂, se añadió el reactivo WST-1 (fabricado por ROCHE) a 15 µl en los pocillos de reacción respectivos y se dejó reaccionar a 37°C durante 4 horas en una atmósfera de 5% de CO₂. Tras terminar la reacción, se midió la OD450 en cada pocillo, y la actividad CDC (%) se calculó a partir de la absorbancia de cada pocillo usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad CDC (\%)} = 100 \times \{1 - (\text{absorbancia del pocillo de reacción} - \text{absorbancia del pocillo de reacción de 100}) / (\text{absorbancia del pocillo de reacción de 0\%} - \text{absorbancia del pocillo de reacción de 100\%})\}$$

Los resultados se muestran en la figura 7. Como se muestra en la figura 7, la actividad CDC del anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 fue mayor que la del anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, de manera que se confirmó que la actividad CDC de IgG3 es mayor que la de IgG1. Sin embargo, los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 mostraron una actividad CDC considerablemente mayor que la actividad CDC del anticuerpo IgG3 humano anti-CD20. Por otro lado, la actividad CDC del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311 fue baja, de forma similar a la del anticuerpo OgG1 humano anti-CD20. También, en todos los anticuerpos anti-CD20, las muestras de anticuerpo producidas por CHO/DG44 como la célula hospedadora, y las muestras de anticuerpo producidas por CHO/FUT8^{-/-} como la célula hospedadora, mostraron casi la misma actividad, y la presencia o ausencia de fucosa en las cadenas de azúcar unidas al anticuerpo no tuvo influencia en la actividad CDC. Además, se hallaron resultados similares para una concentración de anticuerpo de 1 µg/ml. En base a estos resultados, se halló que la actividad CDC del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 es más elevada que la del anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 y el anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, y que la presencia o ausencia de la fucosa en las cadenas de azúcar unidas al Fc no tiene influencia sobre la actividad CDC.

3. Medida de la actividad CDC de anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133

A fin de evaluar completamente además la actividad CDC de los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 que mostraron actividad CDC particularmente elevada en el apartado 2 de este Ejemplo, se llevó a cabo la medida de la actividad CDC de la misma manera que en el apartado 2 de este Ejemplo usando una célula ST 486 de línea celular derivada de linfoma de Burkitt positiva para CD20 (ATCC: CRL-1647) o una célula Raji de línea celular derivada de linfoma de Burkitt (ATCC: CCL-86).

Los resultados se muestran en la figura 8. Como se muestra en la figura 8, en cada una de la línea celular ST 486 (figura 8A) y de la línea celular Raji (figura 8B), la actividad CDC del anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 fue mayor que la actividad CDC del anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 mostró una actividad CDC superior al anticuerpo OgG1 humano anti-CD20 y al anticuerpo IgG3 humano anti-CD20. Además, en todos estos anticuerpos anti-CD20, las muestras de anticuerpo producidas por CHO/DG44 como la célula hospedadora y las muestras de anticuerpo producidas por CHO/FUT8^{-/-} como la célula hospedadora mostraron casi la misma actividad CDC, y se mostró que la presencia o ausencia de la fucosa en las cadenas de azúcar unidas al anticuerpo no tiene influencia sobre la actividad CDC.

4. Medida de la actividad ADCC de diversos anticuerpos anti-CD20 frente a línea celular positiva para CD20

La actividad ADCC *in vitro* de las muestras purificadas de diversos anticuerpos anti-CD20 obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1 se midió de la siguiente manera, usando como célula diana una célula Daudi positiva para CD20. En la medida se usó el Cytotox 96 Kit (fabricado por Promega).

(1) Preparación de suspensión de células efectoras humanas

Se recogieron 50 ml de sangre periférica procedente de un voluntario sano, y se mezclaron suavemente con 0,2 ml de heparina sódica (fabricada por Takeda Pharmaceutical). Se preparó una fracción monocítica a partir de esto usando Lymphoprep (fabricado por Daiichi Pure Chemicals) según las instrucciones adjuntas, y entonces se lavó mediante centrifugación una vez con medio RPMI 1640 y una vez con medio 10% FBS-RPMI 1640, y la célula se usó como la célula efectora.

(2) Medida de la actividad ADCC

La reacción se llevó a cabo en una placa de fondo plano de 96 pocillos (fabricada por Falcon), y se dispensó, a 200 µl en cada pocillo de reacción, medio 10% FBS-RPMI 1640 que contiene 2×10^5 células de la célula efectora y 1×10^4 células de la célula Daudi o de la célula ST 486 y que contiene cada anticuerpo anti-CD20 a concentración variable. Además, se prepararon respectivamente como pocillos subjetivos necesarios para calcular la actividad ADCC, un pocillo de medio sin la célula efectora, ni la célula diana ni el anticuerpo, un pocillo efector que contiene la célula efectora sola, un pocillo diana que contiene la célula diana sola, un pocillo NK que contiene la célula efectora y la célula diana sin anticuerpo, un pocillo de reacción de 100% que contiene la célula diana sola y al que se añadieron 20 µl del tampón de lisis adjunto al kit 3 horas y 15 minutos después de comenzar la reacción, y un pocillo de control de la reacción de 100% sin la célula efectora, ni la célula diana ni el anticuerpo y al que se añadieron 20 µl del tampón de lisis adjunto al kit 3 horas y 15 minutos después de comenzar las reacciones. Después de llevar a cabo la reacción a 37°C durante 4 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ en cada pocillo de reacción, la placa de

reacción se centrifugó para recuperar 50 µl de sobrenadante de cada pocillo. Los sobrenadantes de los pocillos se transfirieron respectivamente a los pocillos de una placa con fondo en U de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite), y se añadió, a 50 µl en cada pocillo, una disolución de sustrato colorante (preparada disolviendo una ampolla del sustrato adjunto al kit en 12 ml del tampón de ensayo adjunto al kit. La reacción colorante se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos, se añadió la disolución de terminación de la reacción adjunta al kit a 50 µl a cada pocillo, y entonces se midió la OD450 para calcular la actividad ADCC (%) a partir de la absorbancia de cada pocillo usando la siguiente fórmula.

$$\text{Actividad ADCC (\%)} = 100 \times (S - E - T) / (\text{Max} - T)$$

S = absorbancia del pocillo de reacción de la muestra - absorbancia del pocillo del medio

E = absorbancia del pocillo efector - absorbancia del pocillo del medio

T = absorbancia del pocillo diana - absorbancia del pocillo del medio

Max = pocillo de reacción de 100% - pocillo de control de reacción de 100%

Los resultados se muestran en la figura 9. Como se muestra en la figura 9, en todos los anticuerpos anti-CD20, las muestras de anticuerpo producidas a partir de CHO/FUT8^{-/-} mostraron mayor actividad ADCC que las muestras de anticuerpo producidas a partir de CHO/DG44. A partir de este resultado, se encontró que, también en el caso de todos los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 preparados en este Ejemplo, la actividad ADCC está incrementada en la composición de anticuerpo en la que fucosa no está unida a la N-acetilglucosamina existente en el terminal reductor en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico unida a la Fc del anticuerpo, en comparación con la composición de anticuerpo en la que la fucosa está unida a la N-acetilglucosamina existente en el terminal reductor de la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico unida a la Fc del anticuerpo. También, se confirmó que los anticuerpos IgG1 humanos anti-CD20 muestran mayor actividad ADCC que la de los anticuerpos IgG3 humanos anti-CD20, esto es, la actividad ADCC de IgG1 es mayor que la de IgG3. También, los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 mantuvieron actividad ADCC elevada similar al nivel de los anticuerpos IgG1 humanos anti-CD20. Además, se encontró que la actividad ADCC de los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 3311 es baja, de forma similar al nivel de anticuerpos IgG3 humanos anti-CD20.

5. Medida de la actividad de unión de diversos anticuerpos anti-CD20 al receptor IIIa de Fcγ recombinante

A fin de analizar el mecanismo potenciador de la actividad ADCC mediante el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 confirmado en el apartado 4 de este Ejemplo, se midió la actividad de unión de las muestras purificadas de los varios anticuerpos anti-CD20 obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1 al receptor Fcγ (de ahora en adelante denominado FcγRIIIa-) que pertenece a la familia de receptores Fc que se expresa en la superficie de las células NK, según un método convencionalmente conocido[Clin. Cancer Res., 10, 6248 (2004)].

Los resultados se muestran en la figura 10. Como se muestra en la figura 10, los anticuerpos anti-CD20 producidos por CHO/FUT8^{-/-} mostraron mayor actividad de unión para FcγRIIIa que los anticuerpos anti-CD20 producidos por CHO/DG44. En base a este resultado, se halló que el incremento de actividad ADCC del anticuerpo, debido a la presencia o ausencia de la unión de fucosa a la N-acetilglucosamina que existe en el terminal reductor de la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico que se une al Fc del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, está provocado por un incremento de la actividad de unión de la región Fc frente al receptor de Fc.

En base a lo anterior, el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 que tienen la misma región variable de cadena pesada, la misma región variable de cadena ligera y la misma región constante de cadena ligera que el anticuerpo híbrido IgG1 humano anti-CD20 Rituxan, en el que CH1 y la bisagra de la región constante de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos del anticuerpo IgG1 humano y Fc es la secuencia de aminoácidos del anticuerpo IgG3 humano, tiene una actividad ADCC que supera a la del anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 y a la del anticuerpo IgG3 humano anti-CD20, y también tiene una actividad ADCC sustancialmente equivalente a la del anticuerpo IgG1 humano anti-CD20. Además, se mostró que la actividad de unión de Fc a un receptor de Fc está incrementada y la actividad ADCC está mejorada de forma similar al caso del anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, al disminuir el contenido de la unión de fucosa a la N-acetilglucosamina en el terminal reductor en la cadena de azúcar de tipo complejo unida mediante enlace N-glucosídico unida a la Fc.

La relación entre estructuras y actividades de cada uno de los anticuerpos de isotipo híbrido se resume en la Tabla 3 en base a los resultados obtenidos en lo anterior. En la tabla, la actividad ADCC y la actividad CDC se expresaron en orden descendente como +++, ++ y +.

Tabla 3

Anticuerpo purificado (nombre)	CH1	Bisagra	CH2	CH3	ADCC	CDC	Proteína A
CD20-IgG1(+F)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	++	+	+
CD20-IgG1(-F)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	+++	+	+
CD20-IgG3(+F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	+	++	-
CD20-IgG3(-F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	++	++	-
1133(+F)	IgG1	IgG1	IgG3	IgG3	++	+++	-
1133(-F)	IgG1	IgG1	IgG3	IgG3	+++	+++	-
3311(+F)	IgG3	IgG3	IgG1	IgG1	+	+	+
3311(-F)	IgG3	IgG3	IgG1	IgG1	++	+	+

En base a lo anterior, se mostró que una molécula de anticuerpo de isotipo híbrido de tipo 1133 que tiene una región constante de cadena pesada en la que CH1 y la bisagra son secuencias de aminoácidos de anticuerpo IgG1 humano y CH2 y CH3 son secuencias de aminoácidos de anticuerpo IgG3 humano, tiene actividad CDC mayor que la del anticuerpo IgG1 humano y del anticuerpo IgG3 humano, y mantiene actividad ADCC elevada sustancialmente equivalente a la del anticuerpo IgG1 humano.

De acuerdo con los resultados anteriores, se halló que la actividad CDC de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 se ve notablemente mejorada mediante el intercambio del Fc entre la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo IgG3 humano anti-CD20.

Ejemplo 3

Producción de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 y un anticuerpo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 utilizando una célula animal:

1. Producción de un vector de expresión de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 y de un vector de expresión de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113

Después, con el fin de examinar que dominio de la región Fc debe ser intercambiado con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo IgG3 humano para potenciar la actividad CDC, se preparó el anticuerpo de isotipo híbrido en el que cada uno de los dominios CH2 o CH3 del tipo 1133 fue reemplazado con cada una de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo IgG1 humano. La actividad CDC se midió para comparar que dominio era importante para potenciar la actividad CDC: Un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 que tiene una región constante de cadena pesada en la que CH1, la bisagra y CH3 son de un anticuerpo IgG1 humano y solamente el dominio CH2 es de un anticuerpo IgG3 humano se denomina de tipo 1131, un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 que tiene una región constante de cadena pesada en la que CH1, la bisagra y CH2 son de un anticuerpo IgG1 humano y solamente el dominio CH3 es de un anticuerpo IgG3 humano se denomina de tipo 1113. En todos los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20, las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera y la región constante de la cadena ligera son las mismas que las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera y la región constante de la cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 codificado por pKANTEX2B8P. Las estructuras de dominio de la región constante de la cadena pesada y las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 se muestran en la Tabla 4. Todos estos anticuerpos de isotipo híbrido tienen una región constante de la cadena pesada nueva. Además, una ilustración esquemática de cada isotipo híbrido se muestra en la figura 11.

Tabla 4

Nombre de estructura	CH1	Bisagra	CH2	CH3	Secuencia de aminoácidos
1113	IgG1	IgG1	IgG1	IgG3	SEC ID NO: 5
1131	IgG1	IgG1	IgG3	IgG1	Sec id no: 6

(1) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131

El vector de expresión pKTX93/1131 (figura 12) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 se construyó de acuerdo con el siguiente procedimiento. En primer lugar, un fragmento de ADN de aproximadamente 700 bp que codifica CH1, la bisagra y CH2 fue escindido y purificado a partir del vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, descrito en el apartado 1 de este Ejemplo utilizando enzimas de restricción *ApaI* (producida por Takara Shuzo) y *SmaI* (producido por Takara Shuzo). Por otro lado, un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kbp fue escindido y purificado llevando a cabo el mismo tratamiento con enzimas de restricción sobre el vector de expresión para un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, pKANTEX2B8P. Después de mezclar estas preparaciones de ADN purificados, se llevó a cabo una reacción de ligación utilizando la solución de ligación High (producida por TOYOBO), y se transformó *Escherichia coli* XL1-

BLUE MRF' (producida por Stratagene) utilizando la solución de reacción. Cada plásmido de ADN fue preparado a partir de los clones transformantes obtenidos de este modo y se hizo reaccionar utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, y a continuación la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada por un secuenciador de ADN AB1 PRISM 3700 Analizador de ADN de la misma compañía para confirmar que se obtuvo el plásmido pKTX93/1131 mostrado en la figura 12.

(2) Construcción del vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113

El vector de expresión pKTX93/1113 (figura 13) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 se construyó de acuerdo con el siguiente procedimiento.

En primer lugar, un fragmento de ADN de aproximadamente 700 bp que codifica CH1, la bisagra y CH2 fue escindido y purificado a partir del vector de expresión para un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20, pKANTEX2B8P, descrito en el apartado 1 de este Ejemplo utilizando enzimas de restricción *Apal* (producida por Takara Shuzo) y *SmaI* (producido por Takara Shuzo). Por otro lado, un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kbp fue escindido y purificado llevando a cabo el mismo tratamiento con enzimas de restricción sobre el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, descrito en el apartado 1 de este Ejemplo. Después de mezclar estas preparaciones de ADN purificados, se llevó a cabo una reacción de ligación utilizando la solución de ligación High (producida por TOYOBO), y se transformó *Escherichia coli* XL1-BLUE MRF' (producida por Stratagene) utilizando la solución de reacción. Cada plásmido de ADN fue preparado a partir de los clones transformantes obtenidos de este modo y se hizo reaccionar utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, y a continuación la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada por un secuenciador de ADN AB1 PRISM 3700 Analizador de ADN de la misma compañía para confirmar que se obtuvo el plásmido pKTX93/113 mostrado en la figura 13.

2. Expresión estable de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 en célula animal

Un célula que produce de forma estable el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 fue preparada del mismo modo que el apartado 3 del Ejemplo 1 mediante la introducción del vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 preparado en el apartado 1 de este Ejemplo en la CHO/FUT8^{-/-} descrita en el apartado 3 del Ejemplo 1 como célula hospedadora.

3. Purificación de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131.

El transformante obtenido en el apartado 2 de este Ejemplo capaz de expresar el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 o el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 fue cultivado y purificado del mismo modo que en el apartado 5 del Ejemplo 1. El anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 fueron purificados utilizando una columna empaquetada con Prosep-G (resina de unión a proteína G: producida por Millipore). Además, cuando el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 fueron purificados utilizando una columna empaquetada con Prosep-A (Resina de unión a Proteína A: producida por Millipore), únicamente el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 fue capaz de ser purificado. Como células hospedadoras, se utilizaron en cada caso CHO/FUT8^{-/-}.

El vector de expresión y el nombre del anticuerpo purificado para cada anticuerpo de isotipo híbrido se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Vector de expresión	Anticuerpo purificado (nombre)
pKTX93/1131	1131(-F)
pKTX93/1113	1113(-F)

4. Evaluación del grado de purificación de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 mediante SDS-PAGE.

Con el fin de medir el grado de purificación de los diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 de este Ejemplo, se llevó a cabo una SDS-PAGE del mismo modo que en el apartado 6 del Ejemplo 1. Como controles comparativos de electroforesis, la misma operación se llevó a cabo para los diversos CD20-IgG1(-F), CD20-IgG3(-F) y 1133(-F) preparados en el apartado 5 del Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la figura 14. El 1113(-F) y 1133(-F) mostraron patrones de electroforesis similares a

los de CD20-IgG1(-F) y 1133(-F) respectivamente. Los pesos moleculares deducidos de las secuencias de aminoácidos de la cadena H y la cadena L que constituyen el 1113(-F) y el 1131(-F) son similares el uno al otro, y la cadena H es de aproximadamente 50 kDa y la cadena L es de aproximadamente 24 kDa. Ya que estos pesos moleculares son similares a los pesos moleculares de la cadena H y la cadena L de CD20-IgG1(-F) y 1133(-F), y que los patrones de electroforesis también son similares entre estos, se confirmó que el 1113(-F) y el 1131(-F) están constituidos por la cadena H y la cadena L deseadas. Además, el peso molecular deducido a partir de la secuencia de aminoácidos de la cadena L que constituye el CD20-IgG3(-F) fue de aproximadamente 24 kDa, el cual es similar al de CD20-IgG1(-F), pero la cadena H que constituye el CD20-IgG3(-F) fue de aproximadamente 54 kDa el cual es mayor que el de la cadena H de CD20-IgG1(-F), de tal forma que la cadena L de CD20-IgG3(-F) apareció en una posición similar a la de la cadena L de CD20-IgG1(-F), pero el enlace de la cadena H de CD20-IgG3(-F) estuvo posicionado en un lado de peso molecular elevado que el de la cadena H de CD20-IgG1(-F). En base a los resultados arriba mencionados, se confirmó que las moléculas IgG deseadas respectivamente constituidas por cadena H y cadena L están contenidas en una proporción suficiente en los diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 de este Ejemplo.

Ejemplo 4

Evaluación de las actividades del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131:

Utilizando las muestras purificadas de los diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidas en el apartado 3 el Ejemplo 3, diversas actividades fueron comparadas de la siguientes formas.

1. Medición de la actividad CDC del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131

Utilizando el anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 CD20-IgG1(-F), el anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 CD20-IgG3(-F) y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 1133(-F) obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1, y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 1131(-F) y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 1113(-F) obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 3, se evaluaron las actividades CDC en células CD20 positivas de acuerdo con el mismo procedimiento que en el apartado 2 del Ejemplo 2 utilizando células ST486 o células Raji CD20 positivas.

Los resultados se muestran en la figura 15. Como se muestra en la figura 15, 1133(-F) mostró actividades CDC más elevada en ambos tipos celulares, línea celular ST486 (figura 15A) y línea celular Raji (figura 15B), que CD20-IgG1(-F) y CD20-IgG3(-F). 1113(-F) y 1131(-F) mostraron una actividad CDC mayor que CD20-IgG1(-F) y CD20-IgG3(-F) pero menor que 1133(-F). En estos anticuerpos, por lo tanto, se entiende que la fuerza de la actividad CDC disminuye en el siguiente orden: 1133(-F) > 1131(-F) > 1113(-F) > IgG3(-F) > IgG1(-F).

En base a estos resultados, se halló que la actividad CDC del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, que ha sido mejorada mediante el intercambio del Fc de un anticuerpo IgG1 humano por el Fc de un anticuerpo IgG3 humano, se ve ampliamente atenuada por el reemplazo del dominio CH2 en el Fc de un anticuerpo IgG3 humano con un anticuerpo IgG1 humano.

Los resultados arriba mencionados indican como es importante intercambiar la secuencia de aminoácidos del dominio CH2 en el Fc de un anticuerpo IgG1 humano con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo IgG3 humano con el fin de mejorar la actividad CDC.

2. Medición de la actividad ADCC del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 en un línea celular CD20 positiva.

Utilizando el anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 CD20-IgG1(-F), el anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 CD20-IgG3(-F) y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 1133(-F) obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1, y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 1131(-F) y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 1113(-F) obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 3, las actividades ADCC *in vitro* fueron medidas de acuerdo con el mismo procedimiento que en el apartado 5 del Ejemplo 2 utilizando células Daudi CD20 positivas como células diana. En estas mediciones se utilizó el kit Cytotox 96 (Promega).

Los resultados se muestran en la figura 16. De este modo, 1113(-F) y 1131(-F) mostraron actividades ADCC similares a CD20-IgG1(-F) y 1133(-F).

3. Medición de la actividad de unión a proteína A del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131

Utilizando el anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 CD20-IgG1(-F), el anticuerpo IgG3 humano anti-CD20 CD20-IgG3(-F) y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 1133(-F) obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 1, y el

anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 1131(-F) y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 1113(-F) obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 3, las actividades de unión a proteína A se midieron de acuerdo con los siguientes procedimientos.

- 5 Se diluyó un anticuerpo anti-cadena kappa humana (producido por Sigma) con PBS hasta 5 µg/mL, se dispensó en una placa de ELISA de 96 pocillos (producida por Grainer) a 50 µL por pocillo y se dejó reposar para la adsorción a temperatura ambiente durante toda la noche. Después de la reacción, la placa se lavó con PBS y se añadieron 100 µL/pocillo de 1% BSA-PBS y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los grupos activos remanentes. A continuación, se retiró la solución 1% BSA-PBS y se añadió 50 µL/pocillo de cada anticuerpo anti-CD20 que debía medirse y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completar la reacción, los pocillos se lavaron con Tween-PBS y se añadieron 50 µL/pocillo de proteína A marcada con peroxidasa (producida por Amersham Biosciences) diluida 5000 veces con PBS y la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas. Después de la reacción, los pocillos se lavaron con Tween-PBS y se añadieron 50 µL/pocillo de una solución de sustrato ABTS para el revelado de color. A continuación, se midió la absorbancia a 415 nm (de ahora en adelante denominada OD415).

Los resultados se muestran en la figura 17. 1133(-F) y 1113(-F) no mostraron una actividad de unión a proteína A de forma similar a CD20-IgG3(-F), mientras que 1131(-F) mostró una actividad de unión a proteína A similar a CD20-IgG1(-F).

La Tabla 6 muestra la relación entre la estructura y la actividad de cada anticuerpo de isotipo híbrido construidos de este modo, clarificada en base a estos resultados. En esta tabla, la actividad ADCC y la actividad CDC se expresan en orden descendente como +++++, +++++, +++, ++, y +. En relación con la actividad de unión a proteína A, + significa un anticuerpo que muestra actividad de unión a proteína A mientras que - significa un anticuerpo que no muestra actividad de unión a proteína A.

Tabla 6

Anticuerpo purificado (nombre)	CH1	Bisagra	CH2	CH3	ADCC	CDC	Proteína A
CD20-IgG1(-F)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	+++	+	+
CD20- IgG3(-F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	++	++	-
1133(+F)	IgG1	IgG1	IgG3	IgG3	++	+++++	-
1133(-F)	IgG1	IgG1	IgG3	IgG3	+++	+++++	-
1131(+F)	IgG1	IgG1	IgG3	IgG1	+++	+++++	+
1131(-F)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG3	+++	+++	-

En el apartado 1 del Ejemplo 4, se halló que la actividad DC del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, que fue mejorada mediante el intercambio del Fc de un anticuerpo IgG1 humano con el Fc de un anticuerpo IgG3 humano, se ve ampliamente atenuada al reemplazar el dominio CH2 en el Fc con el de un anticuerpo IgG1 humano. Este resultado indica lo importante que es intercambiar la secuencia de aminoácidos en el Fc en el dominio CH2 por la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo IgG3 humano con el fin de mejorar la actividad CDC:

También se indica que la actividad ADCC de un anticuerpo, en el que CH1 y la bisagra tienen las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo IgG1 humano y el Fc es el isotipo híbrido del anticuerpo IgG1 humano y el anticuerpo IgG3 humano, es equivalente a la de un anticuerpo IgG1 humano, y un aumento en la actividad ADCC del mismo causado por la eliminación de la fucosa unida a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de la cadena de azúcar unida al Fc también es equivalente al de un anticuerpo IgG1 humano.

Ejemplo 5

1. Construcción de diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 utilizando células animales (análisis sobre la secuencia de aminoácidos en el dominio CH2 y la actividad CDC del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133)

Para analizar qué región en el dominio CH2 del anticuerpo humano IgG3 es importante para mejorar la actividad CDC, se construyeron diversos anticuerpos que tienen el dominio CH2 de tipo 1133 parcialmente reemplazado por el del anticuerpo IgG1 humano de la siguiente manera.

En primer lugar, las secuencias de aminoácidos del dominio CH2 en el anticuerpo IgG1 humano y en el anticuerpo IgG3 humano fueron comparadas. De acuerdo con el índice EU como en Kabat *et al.* se confirmó que los residuos de aminoácidos en las posiciones 274, 276, 296, 300 y 339 fueron diferentes (figura 18). De este modo, se diseñaron anticuerpos en los que los residuos de aminoácido en estas posiciones en el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133 fueron reemplazados por los de la secuencia de aminoácidos de IgG1 humana. Un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 en el que el residuo de aminoácido en la posición 274 ha sido reemplazado por el de un anticuerpo IgG1 humano se denomina de tipo 1133(274-IgG1); un anticuerpo de isotipo híbrido anti-

CD20 en el que el residuo de aminoácido en la posición 276 ha sido reemplazado por el de un anticuerpo IgG1 humano se denomina de tipo 1133(276-IgG1); un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 en el que el residuo de aminoácido en la posición 296 ha sido reemplazado por el de un anticuerpo IgG1 humano se denomina de tipo 1133(296-IgG1); un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 en el que el residuo de aminoácido en la posición 300 ha sido reemplazado por el de un anticuerpo IgG1 humano se denomina de tipo 1133(300-IgG1); y un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 en el que el residuo de aminoácido en la posición 339 ha sido reemplazado por el de un anticuerpo IgG1 humano se denomina de tipo 1133(339-IgG1). El dominio CH3 de cada uno de estos anticuerpos es el de un anticuerpo IgG3 humano. La Tabla 7 muestra los residuos de aminoácidos en las cinco posiciones arriba mencionadas de estos anticuerpos (es decir, si son de un anticuerpo IgG1 humano o de un anticuerpo IgG3 humano).

Tabla 7

Nombre estructural	274	276	296	300	339	CH3	Secuencia de aminoácidos
1133(274-IgG1)	IgG1	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	SEC ID NO:7
1133(276-IgG1)	IgG3	IgG1	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	SEC ID NO:8
1133(296-IgG1)	IgG3	IgG3	IgG1	IgG3	IgG3	IgG3	SEC ID NO:9
1133(300-IgG1)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG1	IgG3	IgG3	SEC ID NO: 10
IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	SEC ID NO: 3
1133	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	SEC ID NO: 4
1131	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	SEC ID NO: 5
1113	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	SEC ID NO: 6

(1) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(274-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1133(274-IgG1) (figura 19) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(274-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 12 y 13 (producidos por FASMAG), se llevó a cabo una PCR utilizando el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133 como molde, tal como se describe en el Ejemplo 1, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(274-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *BspI407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, tal como se describe en el Ejemplo 1 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb se cortó y se purificó. Estos ADNs purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1133(274-IgG1) mostrado en la figura 19.

(2) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(276-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1133(276-IgG1) (figura 19) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(276-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 13 y 14 (producidos por FASMAG), se llevó a cabo una PCR utilizando el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133 como molde, tal como se describe en el Ejemplo 1, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(276-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se

sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, tal como se describe en el Ejemplo 1 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb se cortó y se purificó. Estos ADN purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1133(276-IgG1) mostrado en la figura 19.

(3) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(296-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1133(296-IgG1) (figura 19) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(296-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 15 y 16 (producidos por FASMAC), se llevó a cabo una PCR utilizando el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133 como molde, tal como se describe en el Ejemplo 1, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(296-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 96°C durante 5 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 96°C durante 30 segundos, a 55°C durante 10 segundos y a 74°C durante 15 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, tal como se describe en el Ejemplo 1 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb se cortó y se purificó. Estos ADN purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1133(296-IgG1) mostrado en la figura 19.

(4) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(300-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1133(300-IgG1) (figura 19) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(300-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 16 y 17 (producidos por FASMAC), se llevó a cabo una PCR utilizando el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133 como molde, tal como se describe en el Ejemplo 1, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(274-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 96°C durante 5 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 96°C durante 30 segundos, a 55°C durante 10 segundos y a 74°C durante 15 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, tal como se describe en el Ejemplo 1 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb se cortó y se purificó. Estos ADN purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de

Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XLI1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1133(300-IgG1) mostrado en la figura 19.

(5) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(339-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1133(339-IgG1) (figura 19) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(339-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 31 y 32 (producidos por FASMAC), se llevó a cabo una PCR utilizando el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133 como molde, tal como se describe en el Ejemplo 1, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(274-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, tal como se describe en el Ejemplo 1 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb se cortó y se purificó. Estos ADNs purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XLI1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1133(339-IgG1) mostrado en la figura 19.

2. Expresión estable de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1113 y de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131 en célula animal

Cada uno de los vectores de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 preparados en el apartado 1 de este Ejemplo fue transferido en células hospedadoras CHO/FUT8^{-/-} tal como se describe en el apartado 3 del Ejemplo 1 y de este modo células capaces de producir de forma estable un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 fueron preparadas mediante los mismos procedimientos que en el apartado 3 del Ejemplo 1 como célula hospedadora.

3. Purificación de diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20

Cada uno de los transformantes que expresan un respectivo anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 2 de este Ejemplo se cultivó y se purificó mediante los mismos procedimientos que en el apartado 5 del Ejemplo 1. Cada anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 fue purificado utilizando una columna empaquetada con Prosep-G (resina de unión a proteína G: fabricada por Millipore).

La Tabla 8 muestra los nombres de los vectores de expresión y de los anticuerpos purificados correspondientes a cada uno de los anticuerpos de isotipo híbrido. En cada caso se utilizaron CHO/FUT8^{-/-} como células hospedadoras.

Tabla 8

Vector de expresión	Anticuerpo purificado (nombre)
pKTX93/1133(274-IgG1)	1133(274-IgG1)(-F)
pKTX93/1133(276-IgG1)	1133(276-IgG1)(-F)
pKTX93/1133(296-IgG1)	1133(296-IgG1)(-F)
pKTX93/1133(300-IgG1)	1133(300-IgG1)(-F)
pKTX93/1133(339-IgG1)	1133(339-IgG1)(-F)

4. Evaluación del grado de purificación de los diversas muestras de anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 mediante SDS-PAGE.

Para evaluar los grados de purificación de las muestras de anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidas en el apartado 3 de este Ejemplo, se llevó a cabo SDS-PAGE mediante los mismos procedimientos que en el apartado 6 del Ejemplo 1. Para comparaciones de electroforesis, las muestras purificadas de CD20-IgG1(-F) y de 1133(-F) preparadas en el Ejemplo 1-5 y las muestras purificadas 1131(-F) y 1113(-F) preparadas en el Ejemplo 3 fueron tratadas de la misma forma.

Los resultados se muestran en la figura 20. 1133(274-IgG1)(-F), 1133(276-IgG1)(-F), 1133(296-IgG1)(-F), 1133(300-IgG1)(-F) y 1133(339-IgG1)(-F) obtenidos en el apartado 3 de este Ejemplo mostraron patrones de electroforesis similares a CD20-IgG1(-F), 1133(-F), 1131(-F) y 1113(-F). Los pesos moleculares de las cadenas H y las cadenas L que constituyen los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 de este Ejemplo estimados a partir de las secuencias de aminoácidos son similares los unos con los otros. Esto es, los pesos moleculares de las cadenas H y las cadenas L son de aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 24 kDa respectivamente. Es decir, estos pesos moleculares son similares a los pesos moleculares de las cadenas H y las cadenas L de CD20-IgG1(-F), 1133(-F), 1131(-F) y 1113(-F) y los patrones de electroforesis también son similares a los de estos. De estos hechos, se confirmó que los anticuerpos de isotipo híbridos anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 de este Ejemplo estaban constituidos por la cadena H y la cadena L.

En base a estos resultados, se confirmó que las moléculas IgG deseadas constituidas por las cadenas H y L están contenidas en una proporción suficiente en la muestra purificada de anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 obtenida en el apartado 3 de este Ejemplo.

Ejemplo 6

Medición de las actividades CDC de diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 (análisis sobre la secuencia de aminoácidos en el dominio CH2 y actividad CDC de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133):

Con el fin de evaluar las actividad CDC sobre una línea celular CD20 positiva de los diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 5, se siguieron los procedimientos del apartado 2 del Ejemplo 2 utilizando células Raji, una línea celular CD20 positiva.

Los resultados se muestran en la figura 21. Como se muestra en la figura 21, 1133(-F) mostró la actividad CDC más elevada, CD20-IgG1(-F) mostró la actividad CDC más baja, y la actividad de 1113(-F) fue intermedia entre ambas. Estos resultados indican que la actividad CDC, que fue mejorada intercambiando las secuencias de aminoácidos en los dominios CH2 y CH3 de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 con las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo IgG3 humano, se vio ampliamente atenuada por el reemplazo de todas las secuencias de aminoácidos de tipo IgG3 en la cinco posiciones en el dominio CH2 con las secuencias de aminoácidos de tipo IgG1. A pesar de que 1133(296-IgG1)(-F) y 1133(300-IgG1)(-F) mostraron actividades CDC equivalentes a 1133(-F), las actividades CDC de 1133(274-IgG1)(-F), 1133(276-IgG1)(-F) y 1133(339-IgG1)(-F) fueron menores que las de 1133(-F). En particular, la actividad CDC de 1133(276-IgG1)(-F) fue equivalente a la de 1113(-F). La Tabla 9 muestra la relación entre la secuencia de aminoácidos y la actividad de cada anticuerpo, en la cual las actividades CDC están expresadas en orden decreciente como +++++, +++++, +++, ++ y +.

Tabla 9

Anticuerpo purificado (nombre)	274	276	296	300	339	CH3	CDC
CD20-IgG1(-F)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	+
1133(-F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	+++++
1113(+F)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG3	++
1133(274-IgG1)(-F)	IgG1	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	++++
1133(276-IgG1)(-F)	IgG3	IgG1	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	++
1133(296-IgG1)(-F)	IgG3	IgG3	IgG1	IgG3	IgG3	IgG3	+++++
1133(300-IgG1)(-F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG1	IgG3	IgG3	+++++
1133(339-IgG1)(-F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG1	IgG3	+++

Los resultados arriba mencionados indican que, en anticuerpos compuestos de CH1 y bisagra de un anticuerpo IgG1 humano y un Fc de un isotipo híbrido de un anticuerpo IgG1 humano y un anticuerpo IgG3 humano, con el fin de mejorar la actividad CDC, los residuos de aminoácidos en las posiciones 274, 276 y 339 son preferentemente reemplazados con IgG3, y más preferentemente los residuos de aminoácidos en las posiciones 276 y 339 son reemplazados por IgG3.

Ejemplo 7**1. Construcción de diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 utilizando células animales (análisis sobre la secuencia de aminoácidos en el dominio CH2 y la actividad CDC del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131)**

Para analizar la relación entre la secuencia de aminoácidos en el dominio CH2 y la actividad CDC con más detalle, se diseñaron diversos anticuerpos como se muestra a continuación, reemplazando parcialmente el dominio CH2 de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131, que solo tienen el dominio CH2 de un anticuerpo IgG3 humano, con el dominio CH2 de un anticuerpo IgG1 humano.

En primer lugar, se diseñó el anticuerpo de isotipo híbrido anti CD20 de tipo 1131(296/300-IgG1), en el que las secuencias de aminoácidos en las posiciones 296 y 300 del anticuerpo de isotipo híbrido de tipo 1131, en las que no se observó disminución en la actividad CDC en el tipo 1133, fueron reconvertidas a las secuencias de aminoácidos del de tipo IgG1 humano. A continuación, se diseñaron diversos anticuerpos de isotipo híbrido, en los que las secuencias de aminoácidos en las posiciones 274, 276 y 339, para las que una disminución de la actividad CDC fue observada en el tipo 1133, fueron reconvertidas en las secuencias de aminoácidos del tipo IgG1 humano. Estos anticuerpos incluyen el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/296/300-IgG1), en el que la secuencia de aminoácidos en la posición 274 se reconvirtió en la secuencia del tipo IgG1 humano, adicionalmente de las posiciones 296 y 300; el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/276/296/300-IgG1), en el que la secuencia de aminoácidos en las posiciones 274 y 276 se reconvirtieron en las secuencias del tipo IgG1 humano, adicionalmente de las posiciones 296 y 300; el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(276/296/300/339-IgG1), en el que la secuencia de aminoácidos en las posiciones 276 y 339 se reconvirtieron en las secuencias del tipo IgG1 humano, adicionalmente de las posiciones 296 y 300; y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(276/296/300/339-IgG1), en el que la secuencia de aminoácidos en las posiciones 276 y 339 se reconvirtieron en las secuencias del tipo IgG1 humano, adicionalmente de las posiciones 296 y 300;

La Tabla 10 muestra los residuos de aminoácidos en las cinco posiciones en estos anticuerpos (es decir, si son de anticuerpo IgG1 humano o de anticuerpo IgG3 humano).

Tabla 10

Nombre estructural	274	276	296	300	339	Secuencia de aminoácidos
1131	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	SEC ID NO:5
1131(296/300-IgG1)	IgG1	IgG3	IgG1	IgG1	IgG3	SEC ID NO:33
1131(274/296/300-IgG1)	IgG1	IgG3	IgG1	IgG1	IgG3	SEC ID NO:34
1131(274/276/296/300-IgG1)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG3	SEC ID NO:35
1131(274/296/300/339-IgG1)	IgG3	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	SEC ID NO:36
1131(276/296/300/339-IgG1)	IgG1	IgG3	IgG1	IgG1	IgG1	SEC ID NO:37

Los diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 diseñados arriba se construyeron mediante los siguientes procedimientos.

(1) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(296/300-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1131(296/300-IgG1) (figura 22) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(296/300-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 13 y 31 (producidos por FASMAC), se llevó a cabo una PCR utilizando pKANTEX2B8P como molde, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133(296/300-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131, pKTX93/1131, tal como se describe en el Ejemplo 3 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb. Estos ADNs purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido

de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1131(296/300-IgG1) mostrado en la figura 22.

(2) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/296/300-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1131(274/296/300-IgG1) (figura 22) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/296/300-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 12 y 13 (producidos por FASMAC), se llevó a cabo una PCR utilizando pKANTEX2B8P como molde, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/296/300-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131, pKTX93/1131, tal como se describe en el Ejemplo 3 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb. Estos ADNs purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1131(274/296/300-IgG1) mostrado en la figura 22.

(3) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/276/296/300-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1131(274/276/296/300-IgG1) (figura 22) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/276/296/300-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 13 y 38 (producidos por FASMAC), se llevó a cabo una PCR utilizando pKANTEX2B8P como molde, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/276/296/300-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131, pKTX93/1131, tal como se describe en el Ejemplo 3 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb. Estos ADNs purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1131(274/276/296/300-IgG1) mostrado en la figura 22.

(4) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/296/300/339-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1131(274/296/300/339-IgG1) (figura 22) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido

anti-CD20 de tipo 1131(274/296/300/339-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 12 y 32 (producidos por FASMAC), se llevó a cabo una PCR utilizando pKANTEX2B8P como molde, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(274/296/300/339-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131, pKTX93/1131, tal como se describe en el Ejemplo 3 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb. Estos ADNs purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1131(274/296/300/339-IgG1) mostrado en la figura 22.

(5) Construcción de un vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(276/296/300/339-IgG1)

El vector de expresión pKTX93/1131(276/296/300/339-IgG1) (figura 22) que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(276/296/300/339-IgG1) fue construido de acuerdo con los siguientes procedimientos. En primer lugar, utilizando KOD plus (TOYOBO) y cebadores de ADN sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 14 y 32 (producidos por FASMAC), se llevó a cabo una PCR utilizando pKANTEX2B8P como molde, de acuerdo con las instrucciones que acompañan el KOD plus. Mediante esta PCR, se sintetizó un gen que codifica el dominio CH2 del anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131(276/296/300/339-IgG1). Utilizando GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gen que codifica el dominio CH2 utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El fragmento de ADN recuperado se digirió con enzimas de restricción *BmgBI* (producida por New England Biolabs) y *Bsp1407I* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 250 bp que contiene el gene que codifica el dominio CH2. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131, pKTX93/1131, tal como se describe en el Ejemplo 3 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb. Estos ADNs purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el plásmido pKTX93/1131(276/296/300/339-IgG1) mostrado en la figura 22.

2. Expresión estable de varios anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 en células animales

Cada uno de los vectores de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 preparados en el apartado 1 de este Ejemplo fue transferido en células hospedadoras CHO/FUT8^{-/-} tal como se describe en el apartado 3 del Ejemplo 1 y de este modo células capaces de producir de forma estable un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 fueron preparadas mediante los mismos procedimientos que en el apartado 3 del Ejemplo 1 como célula hospedadora.

3. Purificación de diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20

Cada uno de los transformantes que expresan un respectivo anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 2 de este Ejemplo se cultivó y se purificó mediante los mismos procedimientos que en el apartado 5 del Ejemplo 1. Cada anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 fue purificado utilizando una columna empaquetada con Prosep-A (resina de unión a proteína A: fabricada por Millipore).

La Tabla 11 muestra los nombres de los vectores de expresión y de los anticuerpos purificados correspondientes a cada uno de los anticuerpos de isotipo híbrido. En cada caso se utilizaron CHO/FUT8^{-/-} como células hospedadoras.

5 Tabla 11

Vector de expresión	Anticuerpo purificado (nombre)
pKTX93/1131(296/300-IgG1)	1131(296/300-IgG1)(-F)
pKTX93/1131(274/296/300-IgG1)	1131(274/296/300-IgG1)(-F)
pKTX93/1131(274/276/296/300-IgG1)	1131(274/276/296/300-IgG1)(-F)
pKTX93/1131(274/296/300/339-IgG1)	1131(274/296/300/339-IgG1)(-F)
pKTX93/1131(276/296/300/339-IgG1)	1131(276/296/300/339-IgG1)(-F)

10 4. Evaluación del grado de purificación de los diversas muestras purificadas de anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 mediante SDS-PAGE.

Para evaluar los grados de purificación de las muestras de anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidas en el apartado 3 de este Ejemplo, se llevó a cabo SDS-PAGE mediante los mismos procedimientos que en el apartado 6 del Ejemplo 1.

15 Los resultados se muestran en la figura 23. Los pesos moleculares de las cadenas H y las cadenas L que constituyen los respectivos anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 en este Ejemplo estimados a partir de las secuencias de aminoácidos con cercanos entre ellos. Esto es, los pesos moleculares de la cadena H y de la cadena L son de aproximadamente 50 kDa y de aproximadamente 24 kDa, respectivamente. Concretamente, estos pesos moleculares son cercanos a los pesos moleculares de las cadenas H y las cadenas L de CD20-IgG1(-F) y 1131(-F) y los patrones de electroforesis también son similares a los obtenidos en los Ejemplos 4 y 6. A partir de estos hechos, se confirmó que los anticuerpos de isotipo híbrido obtenidos en el apartado 3 de este Ejemplo estaban compuestos por las cadenas H y las cadenas L deseadas.

25 En base a estos resultados, se confirmó que las moléculas IgG constituidas por cadenas H y L estaban contenidas en una proporción suficiente en la muestra purificada de anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 obtenida en el apartado 3 de este Ejemplo.

Ejemplo 8

30 **Medición de las diversas actividades de diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 (análisis sobre la secuencia de aminoácidos en el dominio CH2 y actividad CDC de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131):**

35 Los anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 7 se compararon para varias actividades como sigue a continuación.

1. Medición de las actividades CDC de diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20

40 Con el fin de evaluar las actividad CDC sobre una línea celular CD20 positiva de los diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 7, se siguieron los procedimientos del apartado 2 del Ejemplo 2 utilizando, una línea celular CD20 positiva, células Raji.

45 Los resultados se muestran en la figura 24. Como se muestra en la figura 21, 1133(-F) mostró la actividad CDC más elevada, CD20-IgG1(-F) mostró la actividad CDC más baja, y la actividad de 1131(-F) fue ligeramente inferior a la de 1133(-F). A pesar de que 1131(296/300-IgG1)(-F), 1131(274/296/300-IgG1)(-F) y 1131(274/276/296/300-IgG1)(-F) mostraron actividades CDC similares o incluso mayores que 1131(-F), 1131(274/296/300/339-IgG1)(-F) y 1131(276/296/300/339-IgG1)(-F) mostraron actividades CDC menores que 1131(-F). En particular, la actividad CDC de 1131(276/296/300/339-IgG1)(-F) fue baja y similar a IgG3(-F). La Tabla 12 muestra la relación entre la secuencia de aminoácidos y la fuerza de la actividad CDC de cada anticuerpo, en la cual las actividades CDC están expresadas en orden decreciente como +++++, +++++, +++++, +++, ++ y +.

Tabla 12

Anticuerpo purificado (nombre)	274	276	296	300	339	CDC
CD20-IgG1(-F)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	+
CD20-IgG1(-F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	++
1133(-F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	+++++
1131(-F)	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	IgG3	++++
1131(296/300-IgG1)(-F)	IgG3	IgG3	IgG1	IgG1	IgG3	++++

Anticuerpo purificado (nombre)	274	276	296	300	339	CDC
1131(274/296/300-IgG1)(-F)	IgG1	IgG3	IgG1	IgG1	IgG3	+++++
1131(274/276/296/300-IgG1)(-F)	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG3	+++
1131(274/296/300/339-IgG1)(-F)	IgG3	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	+++
1131(276/296/300/339-IgG1)(-F)	IgG1	IgG3	IgG1	IgG1	IgG1	++

Estos resultados indican que, en anticuerpos compuestos de CH1 y bisagra con secuencias de aminoácidos de un anticuerpo IgG1 humano y un Fc de un isotipo híbrido de un anticuerpo IgG1 humano y un anticuerpo IgG3 humano, con el fin de mejorar la actividad CDC, los residuos de aminoácidos en por lo menos las posiciones 276 y 339 son preferentemente residuos de aminoácidos de IgG3 humana.

2. Medición de las actividades de unión a proteína A de varios anticuerpos de isotipo híbridos anti-CD20

Las actividades de unión a proteína A de 1131(296/300-IgG1)(-F), 1131(274/296/300-IgG1)(-F) y 1131(274/276/296/300-IgG1)(-F), que muestran cada una de ellas una actividad CDC particularmente elevada en el apartado 1 en este ejemplo, fueron medidas como en el apartado 3 del Ejemplo 4.

Los resultados se muestran en la figura 25. Tal como se muestra en la figura 25, 1131(296/300-IgG1)(-F), 1131(274/296/300-IgG1)(-F) y 1131(274/276/296/300-IgG1)(-F), mostraron actividades de unión a proteína A similares a CD20-IgG1(-F) y 1131(-F). Estos resultados indican que la actividad de unión a proteína A de los anticuerpos de isotipo híbridos no se vieron afectados por las secuencias de aminoácidos en las posiciones 276 y/o 339 de los anticuerpos de isotipos de tipo IgG3.

Sobre la base de estos resultados, se descubrió que, en los anticuerpos con actividad de unión a proteína A, que se componen de CH1 y la bisagra de las secuencias de aminoácidos de anticuerpo humano IgG1 y Fc de un isotipo híbrido de anticuerpo IgG1 humano y anticuerpo IgG3 humano, con el fin de mejorar la actividad CDC, los residuos de aminoácidos en las posiciones 276 y 339 son preferentemente lisina y treonina, respectivamente, que son los residuos de aminoácidos del tipo IgG3 humano.

Ejemplo 9

Construcción de un anticuerpo IgG1 humano anti-Campath, un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1133 y un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1131 utilizando células animales:

1. Construcción de varios vectores

En base a los resultados de los Ejemplos 2 y 4, se halló que la actividad CDC se mejora intercambiando CH2 o Fc de un anticuerpo IgG1 humano anti-CD20 con la secuencia de aminoácidos de IgG humana. Con el fin de confirmar la mejora de la actividad CDC en un anticuerpo contra otro antígeno, se construyeron una IgG1 humana, y anticuerpos de tipo 1133 y de tipo 1131 de un anticuerpo anti-Campath humanizado, Campath-1H, y se compararon en actividad CDC.

(1) Construcción de un vector de expresión que codifica la secuencia génica de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1133

El vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1133, que reconoce específicamente el antígeno Campath humano (CD52) y tiene secuencias de aminoácidos IgG1 humanas en el CH1 y en la bisagra y secuencias de aminoácidos IgG3 humanas en el CH2 y el CH3, se construyó de acuerdo con los siguientes procedimientos (figura 26).

En primer lugar, las secuencias de aminoácidos y secuencias génicas de la región variable de la cadena pesada (Acceso: S79311) y región variable de cadena ligera (Acceso: S79307) de un anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H se obtuvieron a partir de la base de datos de Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La secuencia de aminoácidos y la secuencia génica de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H están representadas respectivamente por SEC ID Nos: 39 y 40, y la secuencia de aminoácidos y la secuencia génica de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H están representadas respectivamente por SEC ID Nos: 41 y 42. En base a estos datos de secuencia, se diseñaron la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1133 representada por SEC ID NO: 43, que contiene la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H y la región constante de cadena pesada de un anticuerpo de isotipo híbrido de tipo 1133, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H representada por SEC ID NO:44, que contiene la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H y la región constante de cadena ligera de un anticuerpo humano.

Después, se diseñó la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 45. En esta secuencia de

nucleótidos, se añadió un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *NotI* en el extremo terminal 5' de la secuencia génica de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H representada por SEC ID NO:40 mientras que se añadió otra secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *ApaI* al extremo terminal 3' de la misma. En base a la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID NO:45, se diseñaron las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 46, 47, 48 y 49. Estas secuencias de nucleótidos se diseñan dividiendo la secuencia de nucleótidos SED ID NO:45 en cuatro partes, de tal forma que secuencias mutuamente adyacentes tienen una secuencia superpuesta de aproximadamente 20 bp y las hebras sentido y antisentido diseñadas en ordenes recíprocos.

En la práctica, se prepararon oligo ADNs sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 46, 47, 48 y 49 (producidas por FASMAC) y se llevaron a cabo PCR utilizando las mismas. Con el fin de ajustar la concentración final de cada uno de los dos oligo ADNs sintéticos localizados en ambos terminales a 0,5 μ M y la concentración final de cada uno de los dos oligo ADNs localizados dentro a 0,1 μ M, se preparó una solución de PCR [0,02 U/ μ l KOD+ ADN Polimerasa (producida por TOYOBO), 0,2 mM dNTPs, 1 mM de sulfato de magnesio, 1/10 en volumen de tampón de PCR diluido 10 veces (producido por TOYOBO, unido a la KOD ADN Polimerasa). Utilizando un termociclador de ADN GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 480 bp utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El producto de PCR se digirió con enzimas de restricción *NotI* (producida por Takara Shuzo) y *ApaI* (producida por Takara Shuzo) y se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 450 bp. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1133, pKTX93/1133, construido en el Ejemplo 1 se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb. Estos ADNs purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el vector de expresión para un isotipo híbrido de tipo 1133, en el que la región variable de la cadena pesada se reemplazó por la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H.

A continuación, se diseñó la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID NO:50. En esta secuencia de nucleótidos, se añadió un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *EcoRI* en el extremo terminal 5' de la secuencia génica de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H representada por SEC ID NO:42 mientras que se añadió otra secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *BsiWI* al extremo terminal 3' de la misma. En base a la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID NO:50, se diseñaron las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 51, 52, 53 y 54. Estas secuencias de nucleótidos se diseñan dividiendo la secuencia de nucleótidos SED ID NO:50 en cuatro partes, de tal forma que secuencias mutuamente adyacentes tienen una secuencia superpuesta de aproximadamente 20 bp y las hebras sentido y antisentido diseñadas en ordenes recíprocos. Utilizando estos 5 oligo ADNs sintéticos, se llevó a cabo una PCR para amplificar el fragmento de ADN que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO:50.

En la práctica, se prepararon oligo ADNs sintéticos que tienen las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID Nos: 51, 52, 53 y 54 (producidas por FASMAC) y se llevaron a cabo PCR utilizando los mismos. Con el fin de ajustar la concentración final de cada uno de los dos oligo ADNs sintéticos localizados en ambos terminales a 0,5 μ M y la concentración final de cada uno de los dos oligo ADNs localizados dentro a 0,1 μ M, se preparó una solución de PCR [0,02 U/ μ l KOD+ ADN Polimerasa (producida por TOYOBO), 0,2 mM dNTPs, 1 mM de sulfato de magnesio, 1/10 en volumen de tampón de PCR diluido 10 veces (producido por TOYOBO, unido a la KOD ADN Polimerasa). Utilizando un termociclador de ADN GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems), la PCR se llevó a cabo mediante la desnaturalización térmica a 94°C durante 4 minutos, seguida de 25 ciclos con cada ciclo consistiendo en reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 50°C durante 30 segundos y a 68°C durante 60 segundos. Después de completar la PCR, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y se recuperó un producto de PCR de aproximadamente 420 bp utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen). El producto de PCR así recuperado se digirió con enzimas de restricción *EcoRI* (producida por Takara Shuzo) y *BsiWI* (producida por TOYOBO) y se sometió la mezcla de reacción a electroforesis en gel de agarosa. Utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen), se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 400 bp. Por otro lado, el vector de expresión para un isotipo híbrido de tipo 1133 construido aquí, en el que la región variable de cadena pesada se reemplazó con la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-Campath humanizado Campath-1H, se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 13 kpb. Estos fragmentos de ADN purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando

una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1133, pKTX93/Campath1H-1133.

(2) Construcción de un vector de expresión que codifica la secuencia génica de un anticuerpo IgG1 humano anti-Campath

El vector de expresión que codifica un anticuerpo IgG1 humano anti-Campath, que reconoce específicamente el antígeno Campath humano (CD52), en el que la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de una IgG1 humana, se construyó de acuerdo con los siguientes procedimientos (figura 27).

El vector de expresión para un anticuerpo anti-Campath de tipo 1133, pKTX93/Campath1H-1133, construido en este Ejemplo, se digirió con *EcoRI* (producida por Takara Shuzo) y con otra enzima de restricción *Apal* (producida por Takara Shuzo) y se sometió la mezcla de reacción a electroforesis en gel de agarosa. Utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen), se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 3300 bp. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo híbrido humanizado anti-CD20, pKANTEX2B8P, se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 10 kpb. Estos fragmentos de ADN purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el vector de expresión para un anticuerpo IgG1 humano anti-Campath, pKTX93/Campath1H-IgG1.

(3) Construcción de un vector de expresión que codifica la secuencia génica de un anticuerpo anti-Campath de tipo 1131

El vector de expresión que codifica un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1131, que reconoce específicamente el antígeno Campath humano (CD52), en el que la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, CH1 y la bisagra tienen la secuencia de aminoácidos de una IgG1 humana, el CH2 tiene la secuencia de aminoácidos de una IgG3 humana y el CH3 tiene la secuencia de aminoácidos de una IgG1 humana, se construyó de acuerdo con los siguientes procedimientos (figura 28).

El vector de expresión para un anticuerpo anti-Campath de tipo 1133, pKTX93/Campath1H-1133, construido en apartado 1 en este Ejemplo, se digirió con *EcoRI* (producida por Takara Shuzo) y con otra enzima de restricción *Apal* (producida por Takara Shuzo) y se sometió la mezcla de reacción a electroforesis en gel de agarosa. Utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (fabricado por Qiagen), se cortó y purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 3300 bp. Por otro lado, el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 de tipo 1131, pKTX93/1131, construido en el Ejemplo 3, se sometió al mismo tratamiento con enzimas de restricción, y se cortó y se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 10 kpb. Estos fragmentos de ADN purificados se mezclaron juntos y se sometieron a una reacción de ligación utilizando una Solución de Ligación High (producida por TOYOBO). Utilizando la mezcla de reacción, se transformó *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (producida por Stratagene). A partir de clones del transformante obtenido de este modo, se preparó cada plásmido de ADN. Después de la reacción utilizando el Kit de Secuenciado de Ciclo Terminador "Big Dye" v.3.1 (producido por Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones que lo acompañan, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en cada plásmido fue analizada utilizando un Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 Analizador de ADN fabricado por la misma compañía. De este modo, se confirmó que se obtuvo el vector de expresión para un anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1131, pKTX93/Campath1H-1131.

2. Expresión estable de varios anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20 en células animales

Cada uno de los vectores de expresión para un anticuerpo anti-Campath preparados en el apartado 1 de este Ejemplo fue transferido en células hospedadoras CHO/FUT8^{-/-} tal como se describe en el apartado 3 del Ejemplo 1 y de este modo células capaces de producir de forma estable un anticuerpo anti-Campath fueron preparadas mediante los mismos procedimientos que en el apartado 3 del Ejemplo 1.

3. Purificación de diversos anticuerpos de isotipo híbrido anti-CD20

Cada uno de los transformantes que expresan un respectivo anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath obtenidos en el apartado 2 de este Ejemplo se cultivó y se purificó mediante los mismos procedimientos que en el apartado 5 del

Ejemplo 1. El anticuerpo IgG1 humano anti-Campath y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1131 fueron purificados utilizando una columna empaquetada con Prosep-A (resina de unión a proteína A: fabricada por Millipore). El anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1133 fue purificado utilizando una columna empaquetada con Prosep-G (resina de unión a proteína G: fabricada por Millipore).

La Tabla 13 muestra los nombres de los vectores de expresión y de los anticuerpos purificados correspondientes a cada uno de los anticuerpos de isotipo híbrido. En cada caso se utilizaron CHO/FUT8^{-/-} como células hospedadoras.

Tabla 13

Vector de expresión	Anticuerpo purificado (nombre)
pKTX93/Campath1H-IgG1	Campath1H-IgG1(-F)
pKTX93/Campath1H-1133	Campath1H-1133(-F)
pKTX93/Campath1H-1131	Campath1H-1131(-F)

4. Evaluación del grado de purificación de los diversas muestras purificadas de anticuerpo anti-Campath mediante SDS-PAGE.

Para evaluar los grados de purificación de las muestras de los anticuerpos modificados obtenidas en el apartado 3 de este Ejemplo, se llevó a cabo SDS-PAGE mediante los mismos procedimientos que en el apartado 6 del Ejemplo 1. Como resultado, se confirmó que las moléculas IgG1 deseadas constituidas por las cadenas H y L están contenidas en la proporción suficiente en la muestra purificada de anticuerpo de isotipo híbrido anti-CD20 obtenido en el apartado 3 en este Ejemplo.

Ejemplo 10

Medidas de las actividades CDC en diversos anticuerpos anti-Campath

Con el fin de evaluar las actividad CDC sobre líneas celulares de leucemia de células B crónica humana positivas para el antígeno Campath MEC-1 (DSMZ: ACC497), MEC-2 (DSMZ: ACC500) y EHEB (DSMZ: ACC67) de las muestras purificadas del anticuerpo IgG1 humano anti-Campath y el anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1131 obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 9, se llevaron a cabo los procedimientos del apartado 2 del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la figura 29. En cada una de las líneas celulares MEC-1, MEC-2 y EHEB, Campath1H-1131(-F) mostró una actividad CDC más elevada que Campath1H-IgG1(-F). Cuando la muestra purificada del anticuerpo de isotipo híbrido anti-Campath de tipo 1133 fue probada del mismo modo, Campath1H-1133(-F) mostró una actividad CDC mayor que Campath1H-IgG1 en cada una de las líneas celulares MEC-1, MEC_2 y EHEB:

Estos resultados indican que, de forma similar a los anticuerpos anti-CD20, en los anticuerpo anti-Campath que están compuestos por CH1 y la bisagra con las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo IgG1 humano y Fc de un anticuerpo de isotipo híbrido de un anticuerpo IgG1 humano y un anticuerpo IgG3 humano, la parte en la que el intercambio de la secuencia de aminoácidos en la región Fc con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo IgG3 humano es importante para mejorar la actividad CDC reside en el dominio CH2.

Aplicabilidad Industrial

La presente divulgación se refiere a una composición de anticuerpo recombinante que es un anticuerpo IgG1 humano, que comprende un dominio CH2 en el que los aminoácidos en las posiciones 276 y 339 indicadas por el índice EU como en *Kabat et al.* están reemplazados por otros aminoácidos y tiene una actividad citotóxica dependiente de complemento más mejorada que un anticuerpo que comprende un dominio CH2 antes de que los aminoácidos hayan sido reemplazados; un ADN que codifica la molécula de anticuerpo o la región constante de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante; un transformante obtenible mediante la introducción del ADN en una célula hospedadora; un proceso para producir la composición de anticuerpo recombinante utilizando el transformante; y un medicamento que comprende la composición de anticuerpo recombinante como ingrediente activo.

Texto libre en los listados de secuencias:

- SEC ID NO:1 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético
- SEC ID NO:2 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético
- SEC ID NO:3 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
- SEC ID NO:4 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
- SEC ID NO:5 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
- SEC ID NO:6 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
- SEC ID NO:7 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
- SEC ID NO:8 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

	SEC ID NO:9 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:10 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:11 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:12 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
5	SEC ID NO:13 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:14 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:15 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:16 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:17 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
10	SEC ID NO:31 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:32 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:33 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:34 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:35 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
15	SEC ID NO:36 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:37 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:38 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:39 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:40 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
20	SEC ID NO:41 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:42 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:43 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:44 - Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético	
	SEC ID NO:45 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
25	SEC ID NO:46 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:47 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:48 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:49 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:50 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
30	SEC ID NO:51 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:52 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:53 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
	SEC ID NO:54 - Descripción de secuencia artificial: ADN Sintético	
35	LISTADO DE SECUENCIAS	
	<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.	
	<120> COMPOSICIÓN DE ANTICUERPO RECOMBINANTE CON FUNCIÓN EFECTORA MEJORADA	
40	<130>	
	<150> JP2007-013640	
	<151> 2007-01-24	
45	<160> 54	
	<170> PatentIn Ver. 2	
50	<210> 1	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético	
	<400> 1	
60	caaaggtacc caagggccca tcggtcttcc	30
	<210> 2	
	<211> 45	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 2

5 gtttgatcc tcgcgagtcg cactcattta cccggagaca gggag 45

<210> 3

<211> 330

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

15 <400> 3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55				60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75				80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130				135					140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp
145					150					155				160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195				200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235				240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275				280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Ile	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<210> 4

<211> 377

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 195 200 205
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 260 265 270
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 5

5 <211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 5

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20				25					30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40				45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
		180						185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195				200						205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	275						280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<210> 6

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

10

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<2107 7

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

10

<400> 7

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

100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Lys Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 8

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Ile	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<214> 9

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

10

<400> 9

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115				120						125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130				135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp
145					150					155				160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235				240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Ile	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

15 <210> 10

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 11

5 <211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
325 330

15

85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 12

<211> 56

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

10

<400> 12

cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtcaag ttcaagtgtg acgtgg 56

15 <210> 13

<211> 71

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 13

catctctctcc cgggatgggg gcagggtgta cacctgtggt tctcgggggt gtccttttgt 60
 ttgggatg g 71

25

<210> 14

<211> 56

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

35 <400> 14

cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaactgtg acgtgg 56

<210> 15

40 <211> 158

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 15

```

cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaagtggc acgtggacgg 60
cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gaacgttccg 120
tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggc 158

```

<210> 16
<211> 155
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 16

20

```

catctctctc cgggatgggg gcagggtgta caccgtgtgt ttctcggggt gtccttttgt 60
tttggagatg gttttctcga tgggggttgg gagggcttgg ttggagacct tgcacttgta 120
ctccttgcgg ttcagccagt cctggtgcag gacgg 155

```

210> 17
<211> 158
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

30 <400> 17

```

cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaagtggc acgtggacgg 60
cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg 120
tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggc 158

```

35 <210> 18
<211> 1504
<212> ADN
<213> Cricetulus griseus

40 <220>
<221> CDS
<222> (1).. (1119)

<400> 18

45

```

atg gct cac gct ccc gct agc tgc cgg agc tcc agg aac tot ggg gac 48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
1 5 10 15
ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gog ctc atc acg ggc atc acc 96
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
20 25 30
ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac 144
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
35 40 45
gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt toa ttt aat aca ggt cga 192
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
50 55 60
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg 240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
65 70 75 80
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc 288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
85 90 95

```

```

atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc 336
lle Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu lle Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
100 105 110
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat 384
His Val Lys lle Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
115 120 125
gga gtt gcc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt gcc ctt 432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala lle Lys Thr Cys Gly Leu
130 135 140
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga 480
lle Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
145 150 155 160
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg 528
Lys Val Gln Glu lle Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
165 170 175
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac 576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp lle Val Val Asn
180 185 190
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac gcc att ctc ttc aat 624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly lle Leu Phe Asn
195 200 205
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc 672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys lle Ser
210 215 220
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg 720
Arg Ser Val Ala Lys lle Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
225 230 235 240
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg gcc cat gcc aag gac tat gtc 768
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
245 250 255
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa coa gag gac ttt gtc 816
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
260 265 270
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca 864
lle Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
275 280 285
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat 912
Phe Met His lle Gly Lys Thr lle Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
290 295 300
gaa gtg gcc aga tgt aaa gag acc gcc aaa att cat gtg act gtg gat 960
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys lle His Val Thr Val Asp
305 310 315 320
ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc 1008
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325 330 335
tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac 1056
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
340 345 350
gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc 1104
Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
355 360 365
aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaatc gcgagacatg gactatggtg 1159
Asn Pro Asn Ala
370
cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa cctctgactg 1219
cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279
actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc totcaatgat ttigggaaat 1339
caagaagtgt aaaaacacat actcatttta cttgaaattt tgtcactaga caacttaaat 1399
ttttagtgtc tgagattgtt tttctctttt cttattaat gatctttcta tgaccagca 1459
aaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1504

```

<210> 19

<211> 372

5 <212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 19

10

```

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
1 5 10 15

```

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30
 Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45
 Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
 50 55 60
 Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65 70 75 80
 Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
 85 90 95
 Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
 100 105 110
 His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
 115 120 125
 Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
 130 135 140
 Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
 145 150 155 160
 Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
 165 170 175
 Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
 180 185 190
 Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
 195 200 205
 His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
 210 215 220
 Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
 225 230 235 240
 Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255
 Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
 260 265 270
 Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
 275 280 285
 Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 290 295 300
 Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 305 310 315 320
 Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335
 Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 340 345 350
 Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 355 360 365
 Asn Pro Asn Ala
 370

<210> 20
 <211> 1316
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus

<400> 20

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gotggagaat tgtgcacogg aagtagctct 60
 tggactggtg gaacctgog cagggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
 gatcctagt acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtoaga 180
 tggcgctggc ttaccoggag aggaatgggt gttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240
 ggatgcagca caaaccaag cctgtttcca gaaggtacag cccaccatg tcatccatct 300
 tgcagcaatg gtaggaggcc ttttcgggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360
 gaatgtgcac atcaatgaca acgtccgtga ctacagcttc gaggtgggca ctgcgaaggt 420
 ggtctctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
 aatgatccac aatgtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
 gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcacottca ctgctgtcat 600
 ccctaaccat gtotttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
 tggcctcaco cataaggtgc atotggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
 tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctactggac ctagcccgcc tcttcatctg 780
 ggtcctgogg gagtacaatg aagttgagcc catcatcoto tcagtgggcg aggaagatga 840
 agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
 cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
 tggggcctac ttgctgatt tccgtttcac accottcaag caggctgtga aggagacctg 1020
 tgcctggttc accgacaact atgagcagcc cagggaatga agcatgggac aagcgggtgc 1080
 tcagctggca atgcccagtc agtaggtgc agtotcatca tttgottgtc aagaactgag 1140
 gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctotg ccagggggct tcatgcagcc 1200
 atccagtagg gccatgttt gtccatctc gggggaaggc cagaccaaca cttgtttgt 1260
 ctgottctgc cccaacctca gtgcattccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 21
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Cricetulus griseus

5

<400> 21

```

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1      5      10      15
Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20      25      30
Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35      40      45
Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
 50      55      60
His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65      70      75      80
Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85      90      95
Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
100      105      110
Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
115      120      125
Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
130      135      140
Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
145      150      155      160
His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
165      170      175
His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
180      185      190
His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
195      200      205
Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
210      215      220
Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
225      230      235      240
Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
245      250      255
Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
260      265      270
Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
275      280      285
Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
290      295      300
Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
305      310      315      320
Lys

```

10

<210> 22
 <211> 2008
 <212> ADN
 <213> Cricetulus griseus

15

<400> 22

```

aacagaaaact taittttctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tocaattcct 60
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactgggttc 120
tggcgttgga ttatgctcat tctttttgac tgggggaact tattgtttta tatagggtgt 180
catttggttc gagataatga ccacctgac caitctagca gagaactctc caagattcct 240
gcaaagctgg agcgttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420

```

```

ctgggaaagg atcatgaaat cttaggagg aggatgaaa atggagctaa agagctctgg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actcacaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaagacc 720
agaagctgg tatgtaatat caacaaggc tgggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gittactgct tcatgattgc ttatggcacc cagogaacac tcatcttggg atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagc ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggctggag tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctcttacttt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tgcactcctg agagtcctat gtgacctgc agtgtgttg 1080
gtatcccagt ttgtcaaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg ctccaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcaat 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat ccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc ctctcttggg aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtataact ctatttcttg gtccagctga ctacacaaac gatcacaga aaattcactt 1440
cggggcgtga tccctgatat acacttctc tccaggctg acttcttgt gtgtactttt 1500
tcatccagg totgtagggt tgotatgaa atcatgcaaa cactgcattc tgatgcctct 1560
gcaaaacttc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atctcaccac acctggaact aaaggagaaa tcccatgga acctggagat 1680
atcattgggt tggctggaaa ccattggaat ggtaactcta aagggtgcaa cagaaaaacta 1740
ggaaaaacag gctgtaccc ttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatat 1800
cctacatato ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaac acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgtctga ctgggtggaac gcctctttgt 1980
gaagggtgct tgtgccctca agcccatg 2008

```

<210> 23

<211> 1728

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 23

```

atgcgggcat ggactggttc ctggcggttg attatgctca ttctttttgc ctggggggacc 60
ttgttatttt atataggttg tcatttgggt cgagataatg accaccctga tcaactcagc 120
agagaactct ccaagattct tgcaaaagott gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagotaca 240
ggaaagatgc gtgttttaga aagacagctt gtttaaggcca aagaacagat tgaatattac 300
aagaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactcacaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggcttatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaagc cagggaagctg gtgtgttaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt tcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggogctat gctactgggt gatgggagac tgtgtttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct gccctctcca ctggacactg gtcagggtga 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggctgag ctcccatggt tagacagcct ccatcctcgg 900
cctcttact taccactggc tgttccagaa gaccttgacg accgactcct aagagtccat 960
ggtgaacctg cagtgtgttg ggtgtccag ttgtcaaat acttgattog tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaac tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cagcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatactgtgc tactgatgat cctactttgt taaggagggc aaagacaaag 1260
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaa 1320
oggtacacag aaaattcact tgggggtgtg atcctggata tacactttct ctacaggct 1380
gactttctag tgtgtacttt ttoatcccag gtotgtcggg ttgottatga aatcatgcaa 1440
accotgcato ctgatgcttc tgogaacttc cattcttgg atgacatcia ctattttgga 1500
ggccaaaatg ccacaatca gattgtgttt tctcctcaca aacotcgaac tgaagaggaa 1560
attccaatgg aacotggaga tatcattgtt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620
aaaggtatca acagaaaaat tggaaaaaca ggccttatat cctcctacaa agtcogagag 1680
aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

```

<210> 24

<211> 575

<212> PRT

15 <213> Cricetulus griseus

<400> 24

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
1 5 10 15
Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
20 25 30
Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
35 40 45
Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
50 55 60
Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
65 70 75 80
Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
85 90 95
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His
100 105 110
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
115 120 125
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu
130 135 140
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
145 150 155 160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
165 170 175
Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
180 185 190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
195 200 205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
210 215 220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
225 230 235 240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
245 250 255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
260 265 270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
275 280 285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
290 295 300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
305 310 315 320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
325 330 335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
340 345 350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
355 360 365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
370 375 380
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
385 390 395 400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
405 410 415
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
420 425 430
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
435 440 445
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
450 455 460
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495
Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510
His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
530 535 540
Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545 550 555 560
Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
565 570 575

<210> 25
<211> 575
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 25

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30
 Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45
 Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60
 Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80
 Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95
 Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110
 Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125
 Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140
 Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175
 Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380
 His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 Tyr Tyr Phe Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510
 His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
 530 535 540
 Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

- 5 <210> 26
 <211> 383
 <212> ADN
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 26

```
gttaactggg gctcttttaa accctgaatt tttctaaatc cccacctcca agagtttggt 60
ttaaactgat ttttttaatg aatacctttt gaagaataga gcattgtctc atcatgcaaa 120
gcttctcagg gattcagcta gcatgttgaa gaaacataag ggtgttaaat tgtttgtcac 180
aagtgtctgaa taaatattga cgtagtcttc agctattota tactggaagt agatgatatt 240
ctcattggaa attctgttag gaagtaacco ttcttgtctt cttacctgca tagaatocca 300
ggatataaaa ctttgtcctg tcgcccctgc cattgtctct cactggtggc ctttattgca 360
tctcatactt gccttctctt tcc
```

5

<210> 27

<211> 504

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

10

<400>27

```
taagaattcc tgtgcccagc tgtatgtgag gctctctgca ggigttagga tgtttctgct 60
ttctttctgc acatgcttca cagctgaagt cctttgggtg tgagattgac attcagatag 120
actaaagtga ctggaacttg tgggaacat actgtatgca ttattgccgt tgcctccagg 180
tgaaattaac acctcattca ccaatccctg ttcattccaa ctttctaccc acatcacctt 240
aaatagaat tagacccaat atgactcctt ttttcctaag ctgtttatag agattgigct 320
ggagcagtg gcttttgtgt ttgtttgttt gttttgtaat ttcccccattg aaaatttctc 300
taaaactcaa cctaagaggg aaaaaaaaaa aacagactta tatgtgccac acttgtaaaa 360
aaaaatcatg aaagatgtat atgatatttt taaacagtgt gaattattaag atcacatttt 420
ctatttttaa aacaatcttg ttttacatat caatcaccca attcccttgc cttcccatcc 480
tcccatcccc cccactgato cccc
```

15

<210> 28

<211> 120

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

20

<400> 28

```
atgaatgttc attctttggg tatatgccc agagtagaat tgctaaatat tgaggtagac 60
tgattcccat ttctctgagg agtcgccata ttgatttcca aagtactgtt acaagttaac 120
```

25

<210> 29

<211> 274

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

30

<400> 29

```
aggcactagg taaatatttt tgaagaaga atgagtatct cctatttcag aaaaactttt 60
attgacttaa atttaggata tcagaattag aaaacagtaa aaatttatag gagagttttt 120
aatgaatgtt attttaagg tccatacaaa tagtaattaa aacttacaca aactatttgt 180
agtaatgatt cagtctggt taccctgatg agcattatag acttttaaat tctttttgta 240
aattttttta ttagtcaaa ttaggaacaa gctt
```

35

<210> 30

<211> 9196

<212> ADN

<213> Cricetulus griseus

<400> 30

tctagaccag gctggtctcg aaotacaga gaaccacotg cctctgccac ctgagtgtg 60
 ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca taittttgaa taitgtgata 120
 atttaccatt taattgtaag taaaaatttt cagccctattt tgttatacat ttttgcgtaa 180
 attattcttt tttgaaagt ttgtgttcca taatagtota gggaaacata aagttataat 240
 ttttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
 ggtatgtaat agcttcaaca tgttgatga tagaattttt cagtgtata taagtgtta 360
 cagcaaaagg ttattaatto atatgtccat atttcaattt titatgaatt attaaattga 420
 atccttaagc tggcagaact agaattttat tttaatcagg aagcccaaaa tctgttcatt 480
 ctttctatat atgtgaaaag gtaggcccca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540
 ggtccaagaa tggagttag taagggggat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaaaaa 600
 gatgagtctt gtgaccttag tttctttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatt 660
 ttcttcccag gtggatagga gtgagtttat ttccagattat ttattacaac tggctgttgt 720
 tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca taittttttt gccacatgca gcttgcctt 780
 atgattttat acttgtgtga ctttcaactc tcagagtata aattgtctga tgcattgaat 840
 aaagtgtggt attgtatgag acttccagcc acttcaatta ttggcttcatt tctctcagat 900
 cccaccacct ccagagtgtt aaacaacttg aaccttaaaa cagactttag tctttatttg 960
 aatgatagat ggggatatac gatttatagg cacagggttt tgagaagggt agaaggtaaa 1020
 cagttagagt taaccaaac aaaaagtata ctttgaatac gtataaactat ttattaaagt 1080
 agtagacaag acattaaata ttcttggga ttagtgttt ttgaatttt cttcaaaa 1140
 atagtcatg agtatcccc tccccattc tatatttttag cagaaatcag aataaatggt 1200
 gtttctggt cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttgt catttaaagt 1260
 caataaaaaa taagggtcac taatagaaaa aaaactctga ttttggaaat cccctttt 1320
 cagcttttct atttaattct ttaatgataa ttttaattgt ggccatgttg tcaaaagtata 1380
 tagccttgta tatgtaaat ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
 tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagtgtc ccagtcactt taagttacat 1500
 tttcataat gtcttttggt ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
 tgattgagaa atggcaacaa aaacacataa ttaagactga taaagaacga acatttgag 1620
 tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgtgttta gccttctttt ggaattttta 1680
 ttagttcata tagaaaaatg gattttatog tgacatttcc atatatgtat ataataatt 1740
 tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataattgtct 1800
 ggtttgatcc atttgaacct tttagtgttt ggtgtggttg ccaattggtt gatggttatg 1860
 ataacctttg cttctctaag gttcaagtc gtttgagaat atgtctcta aaaaagacag 1920
 gttgcaagt aagtgtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
 ttcaattata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040
 tagccgaatt gatttaattt tcaaaagata aatcttttaa tccctataaa agaggatta 2100
 cacaacaatt caagaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
 aggtagaacc ctaactgtgt tgggtgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
 agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcactt acgttgtatt 2280
 ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
 gcacaggaca agaaagtgc ctccttgtat caccagggaag atctttttgt aagagtcac 2400
 acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaacaa acagaaactt 2460
 attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
 aagacagaag ggagtgtaaa ctctgaaaaa ggggcatgg actggttctt ggcgttggt 2580
 tatgtcatt cttttgcctt gggggacott attgtttat atagggtgtt atttgggtog 2640
 agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
 gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggot gagtctctcc ggtaggttg 2760
 aaataactca ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagctg 2820
 ctgttgaaaa atataatttc tacaacccgt ctttgtaaaa ttttaagtat ttagcagac 2880
 tttttaaaag tcagtgtatg atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcattotta 2940
 ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
 attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgcctatt aaatttttt 3060
 attctatgga ctacaacaga gacataaait ttgaaaggot tagttactct taaattotta 3120
 tgaatgaaaag caaaaattca ttgttaata gaacagtga tccggaatgt ggttaattat 3180
 tgcataattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaaagcat cagttgttg 3240
 gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctgataacct 3300
 ttaacttgca gtiactgagt ttacaagtgt tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
 tctaagaatg atcatgtga cagtgttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
 tgcagatag aagacttga catttaggtt gtaattggc actaccagca agtggatata 3480
 agatagagct gaatatatta cttttgagg aacataatc atgaatggaa agtggagcat 3540
 tagagaggat gccttctggt tctcccacac cactgtttgc atccattgca ttccacactg 3600
 cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac taccatcag ttttatcttt 3660
 aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720

```

tctctgggtg gagggtgtat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
agtcaggggac aagaagtggt cgaatccttg ttggattaaa tcatittact ggaagttcat 3840
caggggagggt tatgaaagt gtggtccttg aactgaaatt atatgtgatt cattattcct 3900
gatttagggc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa ttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatggggc agacacgctg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020
tgttttcagc ctttttaccg atgaagaatc ttaaaaaatg ttaataaatt tagtttgccc 4080
aagattatac gtttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttccca agctgaaaac agaaaaagca atgaccocaga aaattttatt 4200
taaaagtcct agggagagac tcccaicctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
gtctctgaat aatcaactga tttctcccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tctttttt ttaccacaaa gtatcttgtt tttgtgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc caatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggg cagtggcta gggcttotta ttggctagot 4500
ctgtcttaat tattaacoca taactactat tgaagtatt tccatgttgt cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccaggagc ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtgaa gaggagagag 4620
cgatttctta ttgtctctg cttattttot gattctgtct agctatgtca cttctgtcot 4680
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttccccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtot gtgtgtcgt 4860
ttgtgtctat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatcttttt taaggacaaa 4920
agagitttat cagattacat ttaagggtga taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980
cagaatgtg aagaagctgg tcaacttaca tccagagtoa agagtagaga gcaatgaatt 5040
gaigcatgca ttctgtgtct cagotcactt tctctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100
tcatgtcttt gctgggaact aactcaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataago 5160
catctctcca gtccotcata tggctctotia agacacttct ttatattct tgatataaga 5220
aatgaatto ctacaacatg catccaatt acaaaatagt ttttaaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggitat ttctctgtct taggzaagta tgtctcccca gctgttctc tagattctac 5400
tagtaaatgt gttgttacac catccacagg gtttttatt taaagctaa acatgaatga 5460
tggacatgtt tgttagcatt tagacttttt tcttactat aattgagcta gttttttgt 5520
gctcagtttg atctctgtct atctagata atgtaatagt aggttaattc ttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaaacaaa gctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
caataatttt caaagcaggt taccacaact tccaaatata atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttaact ttgatttttt 5760
tttcaaatit aggtagttc actagttgtg tgaagggtta tggctgcaaa catctttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttggcca aaactgtgtt ccattctggg 5880
tttctctctc atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg gtagtattg gaagctctc 5940
aggatataat ttctatattc tgtatttttt tctctgtcta tatatttgt ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctgttagttt gatacttact ttcttacct ttctttggga ttattttgc 6060
tgtcttaaga atttttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgcctcttat ttgaaatgct tgggacaga aaactcagat tgaacttttc 6180
tttttataa ttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgottt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaa ttaatttggt 6300
ttctatattt ttgacaatg tcaacotttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
attttttgt ttgactgttt atattttgat ctgacatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttact atctttatta ttatttttgc ttattttcta gcaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttacttttg gotttagtao tgccttttgt 6540
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtgtct actgatattg gttctaact tatatagcat 6600
ggtgtttgtt aggtagttag ttatgttgt cagattgtct tgaatttatg caaatgtaaa 6660
atatttagat gctgtttttg ttgtctaaga acaagtatg cttgtgtct cctatcggtt 6720
ctggtttttc catctactc tcaagctgt tttgtgtgt gaatactaac tccgtactat 6780
cttgtttttc ttgaattaac ccttttcaa aggtttcttt totttttttt ttaagggaac 6840
aacaagttta ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgoaagg ttatcaaat 6900
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
tgaattaatg catgcatctc tgtgtcagc tcaattttcc taitcttaga tagtctagga 7020
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatact cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaaat gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacactcgaa gocatcacta 7200
gtaaaataaa tgaanaatgt gattatcaac ataattctat tgaatccctt ttttattgta 7260
gattttgtga agttctctat caagtccctg tctctctctt aaaaacctgt tttttagtta 7320
aataggtttt ctagtgttcc tgtctgttaa aggttagata ttattttcaa 7380
gtatgttctc cagttgtttt gcttgtatt tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440
ttattttttt tatttaaat agaaaacaaag ctgcttttac atgtcagttc cagttccctc 7500
tccctccctc cctccctgc tccccacct agccccaat ccaactcctt tcttctccc 7560
aggaagggtg agggocctca tgggggaaat ctcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctcccagtg tctctaggct gagagagtat coctctatgt ggagagggt 7680
cccaaaagtc atttgttac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtg ccccatagat 7740
tgtccggacc tcaaaactg cttctcctt caggaggtct ggaacagttc tatgtgtgtt 7800
tccagatat cagttctggg tccatgagca acccttgtt caggtcagtt gtttctgtg 7860
gtttcccccag cccgtcttg accctttgc tcaactctc tccctctct caactggatt 7920

```

```

ccagagttca gctcagtggt tagctgtggg tgtctgcato tgcctccato agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagtcoto attatcagag aagggtcttt 8040
aaggtagcct ctgtattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctcttg 8100
acagtgcagc aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtgttggtg tcccttttct 8160
tgctctcato cgttctctcc ctgactagat ctctctgctc cctcatgtcc tctctctccc 8220
tccctctctc cctctctctt tctcttaact cctctctccc tccacctcag atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaa taattaatit 8340
aatatgctta tctcaggttt attttggcta gtatttgat gtgtttggtt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatatttag acacagattt aaatatitga agtttttttt 8460
tttttttttt ttaaagattt attttttttt tatgtcttct gctgcatgc cagaagaggg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa cgcctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttctttta aagaggatag cagtgcatca tttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttaccg ggtttacatt tctttttatc 8760
ttgctaaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gctgttggtg ttatatagcc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagttaa atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgto tgtgcacat gtgtgacct ggtcttgccc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaactgg taitgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaacccagc tctcttgga aagcagccac tgcctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060
caggigatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcctgtatc tctagcacc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggct gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180
aggatcccaa gactc 9196

```

<210> 31

<211> 56

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

10

<400> 31

cggtgtgtgtg gactgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaagtgtt acgtgg 56

15 <210> 32

<211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético,

<400> 32

25 catctcctat gggggcaggg cctgtggttc tcggggctgt ccttggctt tggagatgg 59

<210> 33

<211> 330

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

35 <400> 33

```

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

```

```

      100      105      110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115      120
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130      135      140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
      145      150      155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165      170      175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180      185      190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195      200      205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
      210      215      220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      225      230      235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245      250      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260      265      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275      280      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290      295      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305      310      315      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325      330

```

<210> 34

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 34

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Lys Trp
145 150 155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

```

Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295				300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<210> 35

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

10

<400> 35

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75				80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155				160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
		165							170				175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
		180						185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	195						200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235				240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

15 <210> 36

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Lys Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 37

5 <211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 37

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

15

85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 38

<211> 50

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 38

cggtggtggtg agccacgaag accccgaggt caagttcaac tggtagctgg 50

15 <210> 39

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 39

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

25

<210> 40

<211> 363

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 40

```
cagggtccaac tgcaggagag cgggtccaggt cttgtgagac ctagccagac cctgagcctg 60
acctgcaccg tgtctggcct caocttcacc gatttctaca tgaactgggt gagacagcca 120
cctggacgag gtccttgagt gatitgattt attagagaca aagctaaagg ttacacaaca 180
gagtacaatc catctgtgaa ggggagagtg acaatgctgg tagacaccag caagaaccag 240
ttcagcctga gactcagcag cgtgacagcc gccgacaccg cggctctatta ttgtgcaaga 300
gagggccaca ctgtgtctcc ttttgattac tgggggtcaag gcagcctcgt cacagtctcc 360
tca 363
```

10

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 41

20

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

<210> 42
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

30

<400> 42

```
gacatccaga tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60
atcacctgta aagcaagtca gaatattgac aaatacttaa actgggtacca gcagaagcca 120
ggtaaggctc caaagctgct gatctacaat acaaacatt tgcaaacggg tgtgccaagc 180
agattcagcg gtacggtag cggtaocgac ttcaccttca ccacagcag cctccagcca 240
gaggacatcg ccacotacta ctgcttgtag catataagta ggccgogcao gttoggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321
```

35

<210> 43
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 43

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Phe Ile Arg Asp Lys Ala Lys Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
65 70 75 80
Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 44

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

10

<400> 44

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 Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 45

<211> 476

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

10

<400> 45

```

cccacaagct ggggcccgcga cccctcacca tgggatggag ctgtatcacc ctctttcttgg 60
tagcaacagc tacagggtgc cactcccagg tccaactgca ggagagcggt ccaggctttg 120
tgagacctag ccagaccctg agcctgacct gcaaccgtgc tggcttcacc ttcaccgatt 180
tctacatgaa ctgggtgaga cagccacctg gacgaggtgt tgagtggatt ggatttatta 240
gagacaaagc taaaggttac acaacagagt acaatccatc tgtgaagggg agagtgaaca 300
tgctggtaga caccagcaag aaccagttca gcctgagact cagcagcgtg acagccgcgg 360
acaccgcggt ctattattgt gcaagagagg gccacactgc tgcctctttt gattactggg 420
gtcaaggcag cctcgtcaca gtctctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttc 476

```

15 <210> 46

<211> 131

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 46

```

cccacaagct ggggcccgcga cccctcacca tgggatggag ctgtatcacc ctctttcttgg 60
tagcaacagc tacagggtgc cactcccagg tccaactgca ggagagcggt ccaggctttg 120
tgagacctag c

```

25

<210> 47

<211> 140

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

35 <400> 47

gctttgtctc taataaatcc aatccactca agacctcgtc caggtggctg totcaccag 60
 ttcatgtaga aatcgggtga ggtgaagcca gacacgggtc aggtcaggct cagggtctgg 120
 ctaggtctca caagacctgg 140

<210> 48
 <211> 140
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

10 <400> 48

ggattggatt tattagagac aaagctaaag gttacacaac agagtacaat ccatctgtga 60
 aggggagagt gacaatgctg gtagacacca gcaagaacca gttcagcctg agactcagca 120
 gcgtgacago cgccgacacc 140

15 <210> 49
 <211> 131
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 49

25 gaagaccgat gggcccttgg tggaggctga ggagactgtg acgaggctgc cttgacccca 60
 gtaatcaaaa ggagcagcag tgtggccctc tcttgacaca taatagaccg cgggtgtcggc 120
 ggctgtcacg c 131

<210> 50
 <211> 421
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

35 <400> 50

cccacaagct gaattcgcct cctcaaaatg ggatggagct gtatcatcct cttcttggtgta 60
 gcaacagcta cagggtgtcca ctccgacatc cagatgacct agagcccaag cagcctgagc 120
 gccagcgtgg gtgacagagt gacctcacc tgtaaagcaa gtcagaatat tgacaaatac 180
 ttaactggt accagcagaa gccaggtaag gctccaaagc tgcgtatcta caatagaaac 240
 aatttgcaaa cgggtgtgco aagcagattc agcggtagog gttagcggtag cgaactcacc 300
 ttaccatca gcagcctcca gccagaggac atgccacct actactgctt gcagcatata 360
 agtaggcgc gcacgttcgg ccaagggacc aagggtgaaa tcaaacgtac ggtggctgca 420
 c 421

<210> 51
 40 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 51

cccacaagct gaattcgcct cctcaaaatg ggatggagct gtatcatcct cttcttggtgta 60
 gcaacagcta cagggtgtcca ctccgacatc cagatgacct agagcccaag cagcctgagc 120

50 <210> 52
 <211> 117
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

5 <400> 52

```
ggagccttac ctggcttctg ctggtaccag ttttaagtatt tgtcaatatt ctgacttgct 60
ttacaggtga tggtaactct gtaccccacg ctggcgctca ggctgcttgg gctctgg 117
```

<210> 53

10 <211> 125

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 53

```
gcagaagcca ggtaaggctc caaagctgct gatctacaat acaaacgaatt tgcaaacggg 60
tgtccaagc agattcagcg gtagcggtag cggtaaccgac ttacacctca ccatcagcag 120
cctcc 125
```

20

<210> 54

<211> 123

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: ADN Sintético

<400> 54

30

```
gtgcagccac cgtacgtttg atttccacct tggtccttgg gcggaacgtg cgcggccctac 60
ttatatgtg caagcagtag taggtggoga tgcctcttgg ctggaggctg ctgatgggtga 120
agg 123
```

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 34 o 33.
- 5 2. Composición de anticuerpo recombinante, que contiene el anticuerpo según la reivindicación 1.
3. Composición de anticuerpo recombinante según la reivindicación 2 o un anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una molécula de anticuerpo IgG1 humano que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico a la región Fc,
- 10 (A) en la que la proporción de cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de las cadenas de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico que se unen al Fc contenidas en la composición es 20% o más, o
- 15 (B) en la que las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico, unidas a la región Fc del anticuerpo, son cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en las cadenas de azúcar.
4. ADN, que codifica
- 20 (A) una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante según la reivindicación 2 o el anticuerpo según la reivindicación 1, o
- 25 (B) una región constante de la cadena pesada humana de una molécula de anticuerpo contenida en la composición de anticuerpo recombinante según la reivindicación 2 o el anticuerpo según la reivindicación 1.
5. Transformante obtenible mediante la introducción de ADN según la reivindicación 4 en una célula hospedadora aislada.
- 30 6. Transformante según la reivindicación 5, en el que la célula hospedadora es una célula resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar, en la que la posición 1 de una fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar unida por enlace N-glicosídico.
- 35 7. Transformante según la reivindicación 5, en el que cuando un gen que codifica una molécula de anticuerpo se introduce en la célula hospedadora, dicha célula hospedadora es capaz de producir una composición de anticuerpo que comprende una molécula de anticuerpo que tiene cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico en la región Fc, y
- 40 (A) en el que la proporción de cadenas de azúcar, en las que una fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor de las cadenas de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar unidas por enlace N-glicosídico que se unen a la región Fc contenidas en la composición es 20% o más, o
- 45 (B) en el que las cadenas de azúcar de tipo complejo unidas por enlace N-glicosídico que están unidas a la región Fc del anticuerpo son cadenas de azúcar, en las que una fucosa no está unida a N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor en las cadenas de azúcar.
8. Transformante según la reivindicación 7, en el que las cadenas de azúcar, en las que una fucosa no está unida a las cadenas de azúcar son cadenas de azúcar, en las que la posición 1 de una fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico.
- 50 9. Transformante según la reivindicación 5,
- 55 (A) en el que la célula hospedadora es una célula, en la que un genoma está modificado de tal forma que se tenga una actividad reducida o suprimida de una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intranuclear, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar, en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico,
- 60 o
- 65 (B) en el que la célula hospedadora es una célula, en la que todos los alelos en un genoma que codifican una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, o una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a

la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico están desactivados.

10. Transformante según la reivindicación 9,

en el que la enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, es una enzima seleccionada de entre GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) y GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa (Fx),

o

en el que la enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar, en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo terminal reductor a través de un enlace α en la cadena de azúcar de tipo complejo unida por enlace N-glicosídico es α -1,6-fucosiltransferasa.

11. Transformante según la reivindicación 10,

(A) en el que la GDP-manosa 4,6-deshidratasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los siguientes a) y b) o es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes c) a e):

a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 18;

b) un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:18 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa;

c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 19;

d) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 19 y que tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa;

e) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 19 y que tiene una actividad GDP-manosa 4,6-deshidratasa.

(B) en el que la GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los siguientes a) y b) o es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes c) a e):

a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representados por la SEC ID NO: 20;

b) un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 20 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa;

c) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:21;

d) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos, en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:21 y que tiene una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa.

e) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:21 y tiene una actividad GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa; o

(C) en el que la α -1,6-fucosiltransferasa es una proteína codificada por un ADN seleccionado de entre el grupo que consiste en los siguientes a) a d) o es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes e) a j):

a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:22;

b) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:23;

c) un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC

ID NO:22 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

d) un ADN que se hibrida con el ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO:23 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

e) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:24;

f) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:25;

g) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos, en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:24 y que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

h) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:25 y que tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

i) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:24 y tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa;

j) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:25 y tiene una actividad α -1,6-fucosiltransferasa.

12. Transformante según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que la célula hospedadora es una célula seleccionada de entre el grupo que consiste en los siguientes (a) a (i):

(a) una célula CHO derivada de tejido de ovario de hámster chino;

(b) una célula de línea celular de mieloma de rata, YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20;

(c) una célula de línea celular de mieloma de ratón, NS0;

(d) una célula de línea celular de mieloma de ratón, SP2/0-Ag14;

(e) una célula BHK derivada de tejido de riñón de hámster sirio;

(f) una célula de hibridoma productora de anticuerpos;

(g) una célula de línea celular de leucemia humana, Namalwa;

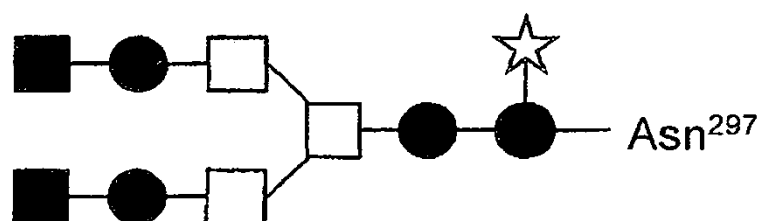
(h) una célula madre embrionaria no humana;

(i) un óvulo fecundado no humano.

13. Procedimiento para producir una composición de anticuerpo recombinante o un anticuerpo, que comprende cultivar el transformante según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 en un medio para formar y acumular la composición de anticuerpo o anticuerpo en el cultivo; y recuperar y purificar la composición de anticuerpo o anticuerpo a partir del cultivo.

14. Composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpo recombinante o el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como ingrediente activo.

FIG. 1



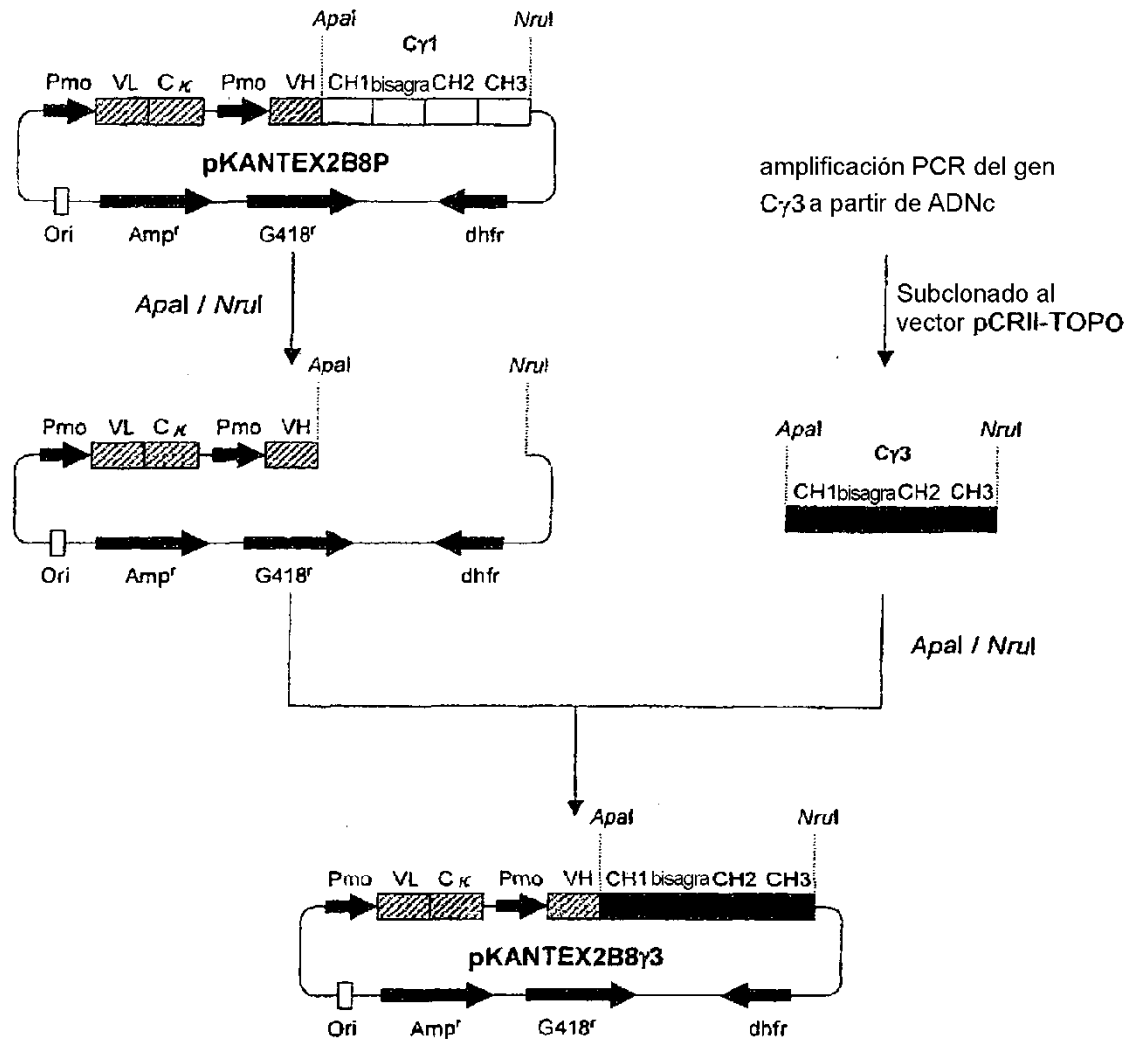
● : N- Acetilglucosamina (GlcNAc)

□ : Manosa

■ : Galactosa

☆ : Fucosa

FIG. 2



Pmo: Promotor

VL: gen de la región variable de la cadena ligera

Cκ: gen de la región constante de la cadena ligera humana

VH: gen de la región variable de la cadena pesada

CH1: gen del dominio CH1

Bisagra: gen del dominio bisagra

CH2: gen del dominio CH2

CH3: gen del dominio CH3

□ Cγ1: gen de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana

■ Cγ3: gen de la región constante de la cadena ligera de IgG3 humana

FIG. 3

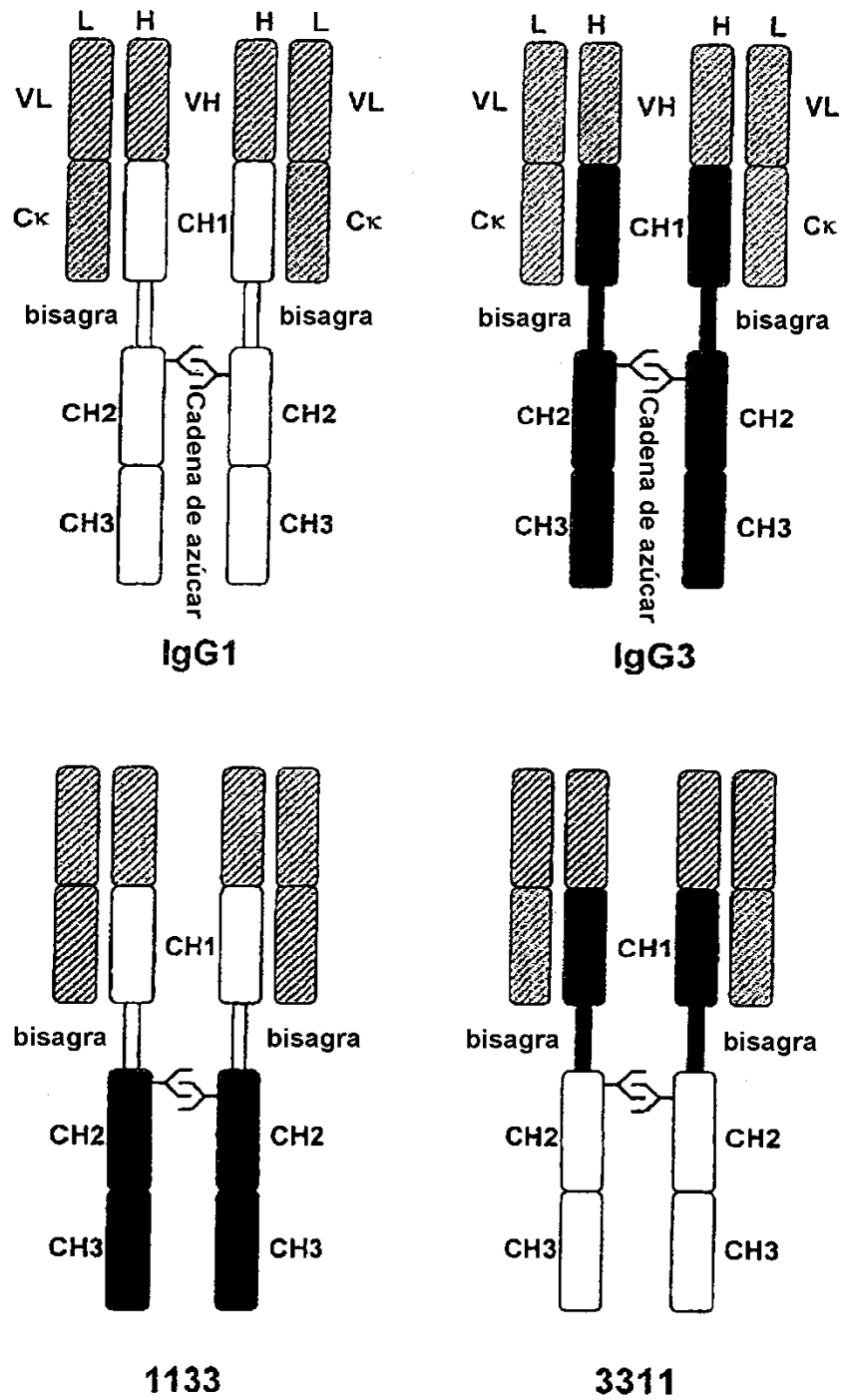
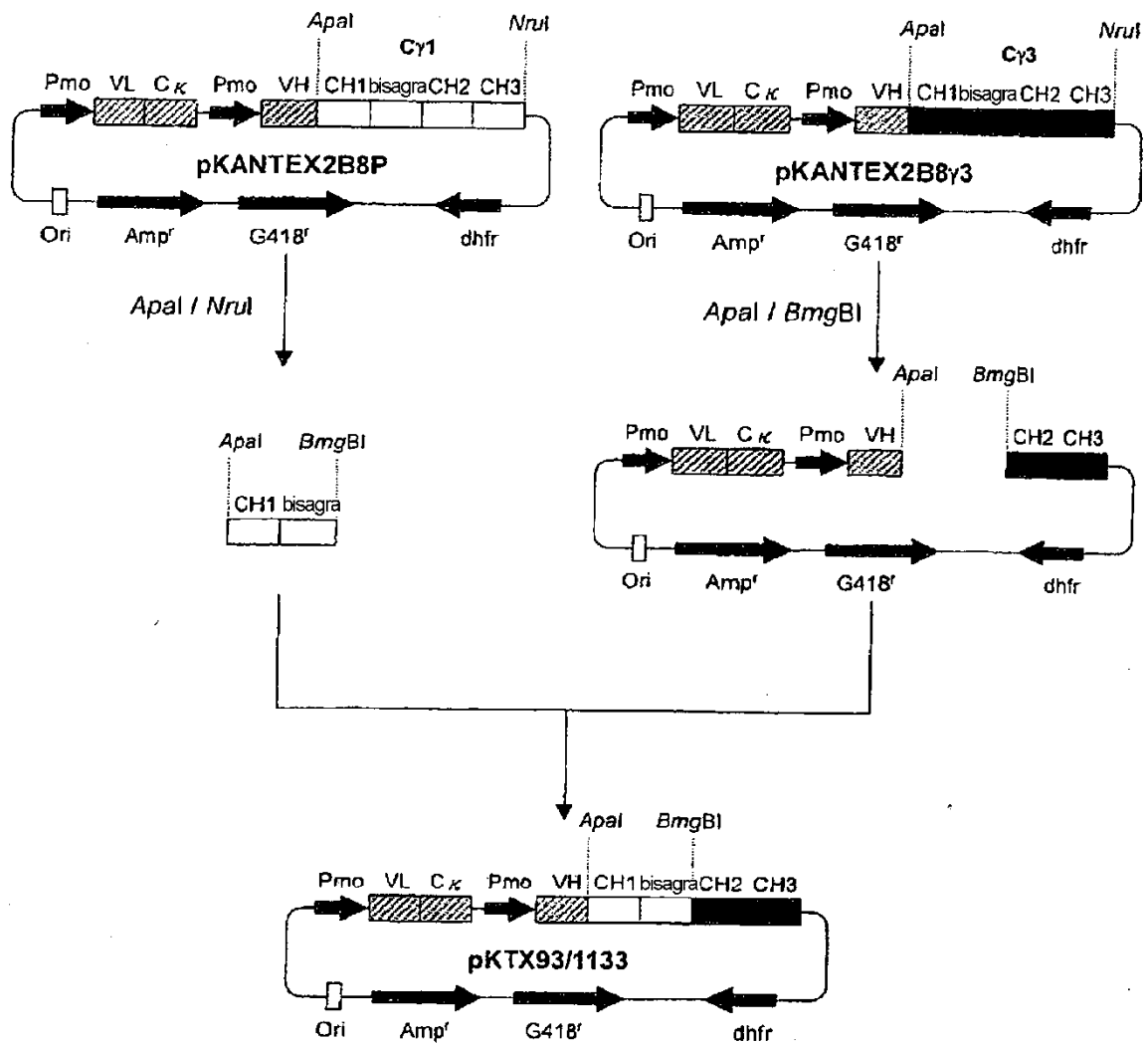


FIG. 4



Pmo: Promotor

VL: gen de la región variable de la cadena ligera

C_κ: gen de la región constante de la cadena ligera humana

VH: gen de la región variable de la cadena pesada

CH1: gen del dominio CH1

Bisagra: gen del dominio bisagra

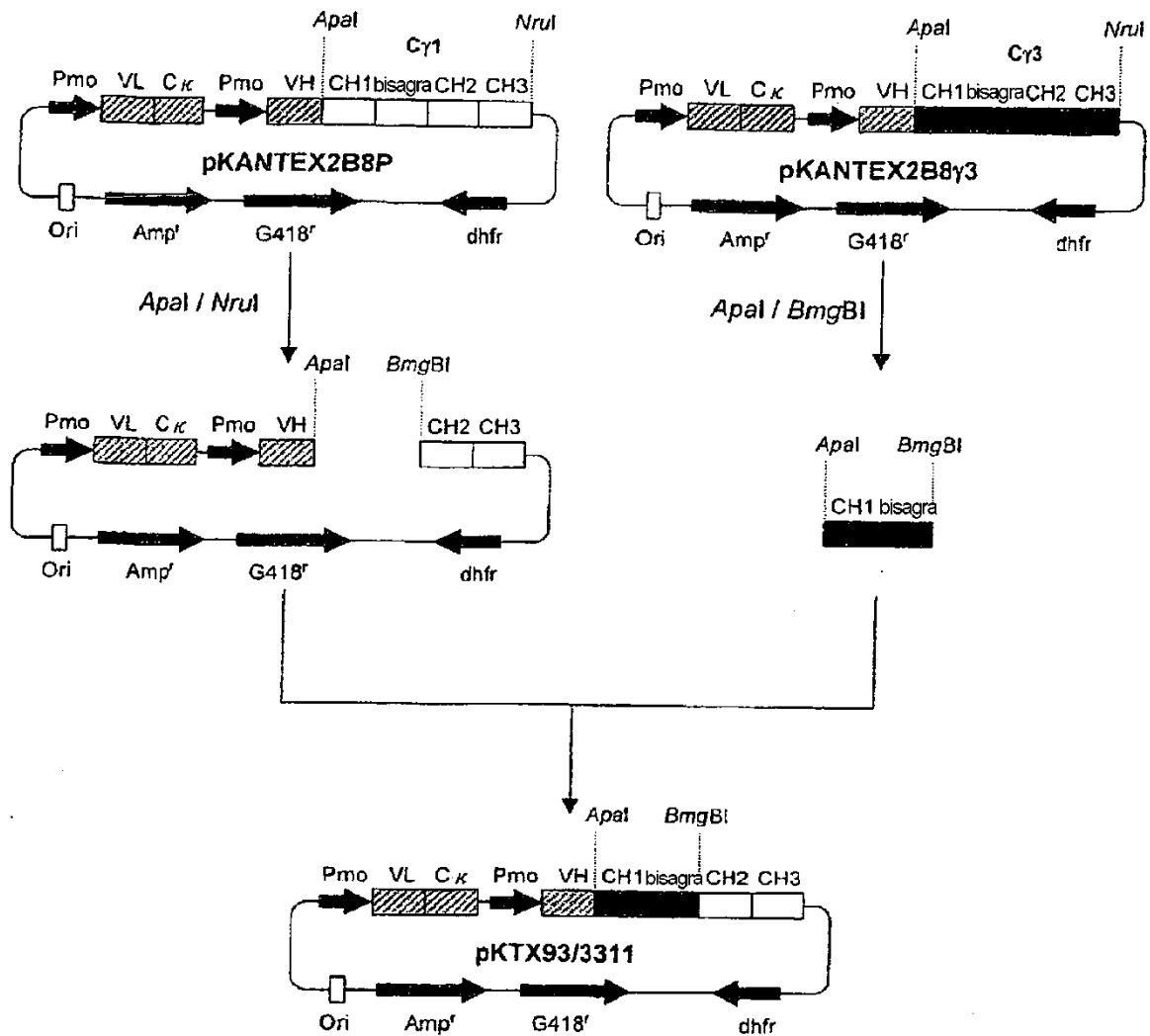
CH2: gen del dominio CH2

CH3: gen del dominio CH3

□ Cy1: gen de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana

■ Cy3: gen de la región constante de la cadena ligera de IgG3 humana

FIG. 5



Pmo: Promotor

VL: gen de la región variable de la cadena ligera

C_K: gen de la región constante de la cadena ligera humana

VH: gen de la región variable de la cadena pesada

CH1: gen del dominio CH1

Bisagra: gen del dominio bisagra

CH2: gen del dominio CH2

CH3: gen del dominio CH3

Cy1: gen de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana

Cy3: gen de la región constante de la cadena ligera de IgG3 humana

FIG. 6

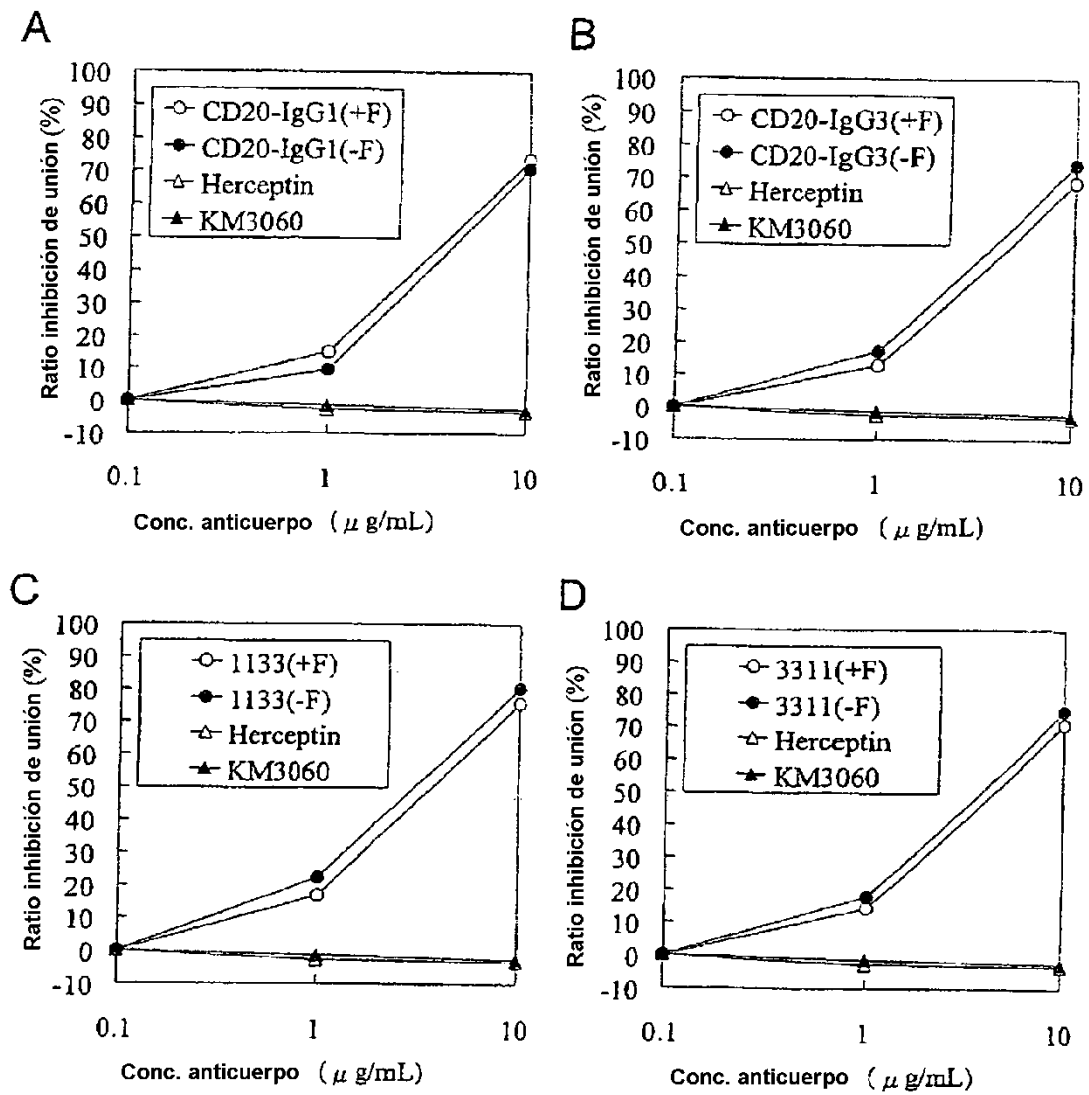


FIG. 7

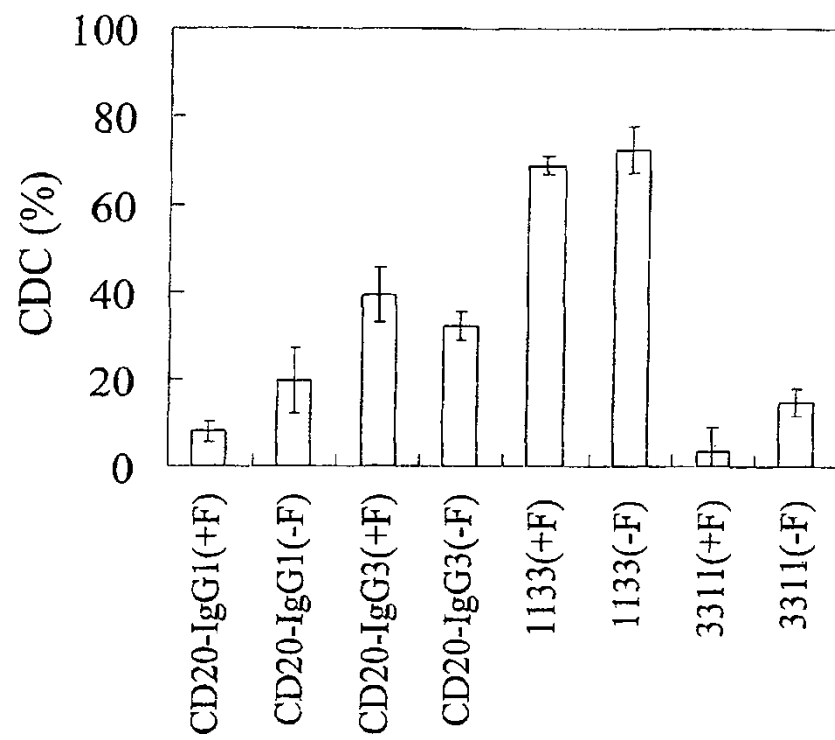


FIG. 8

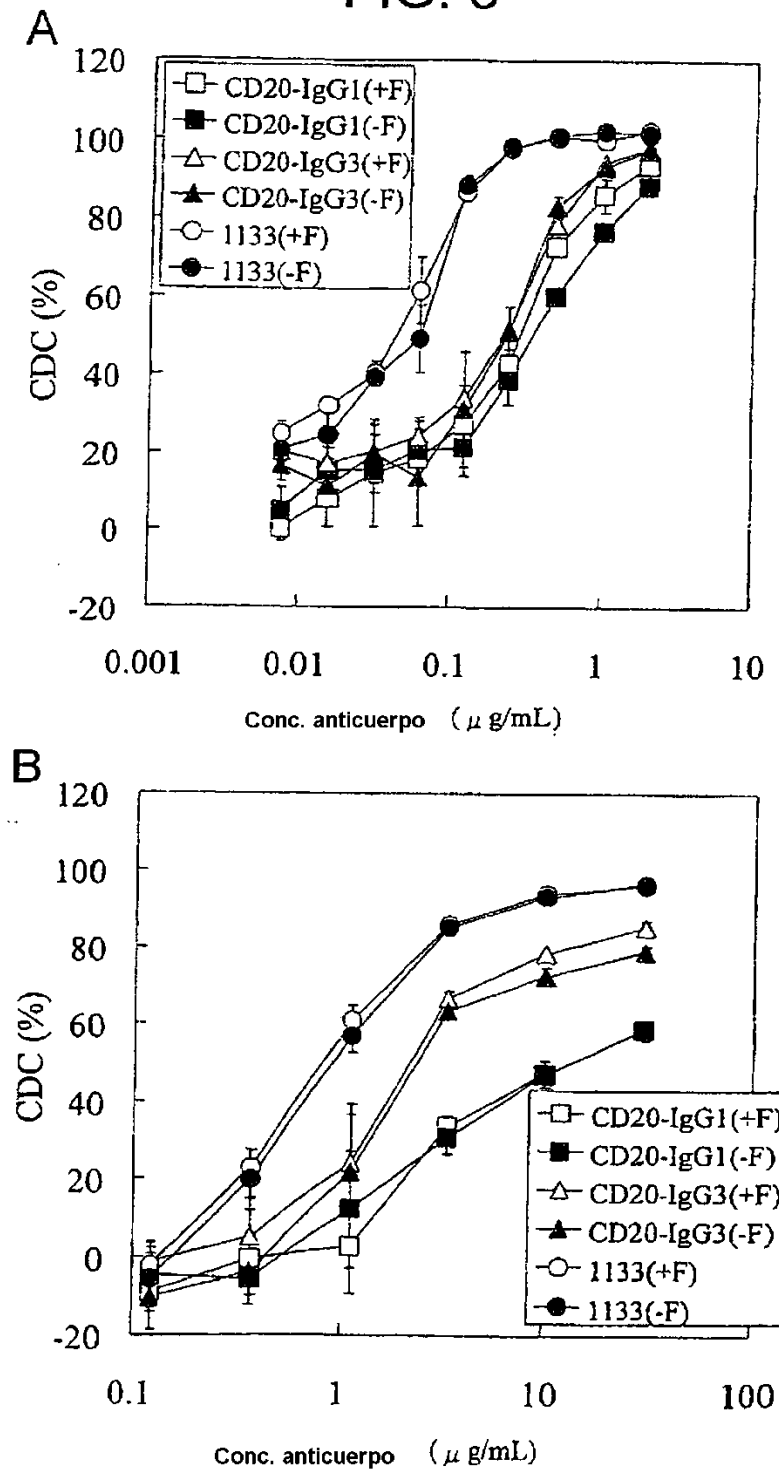


FIG. 9

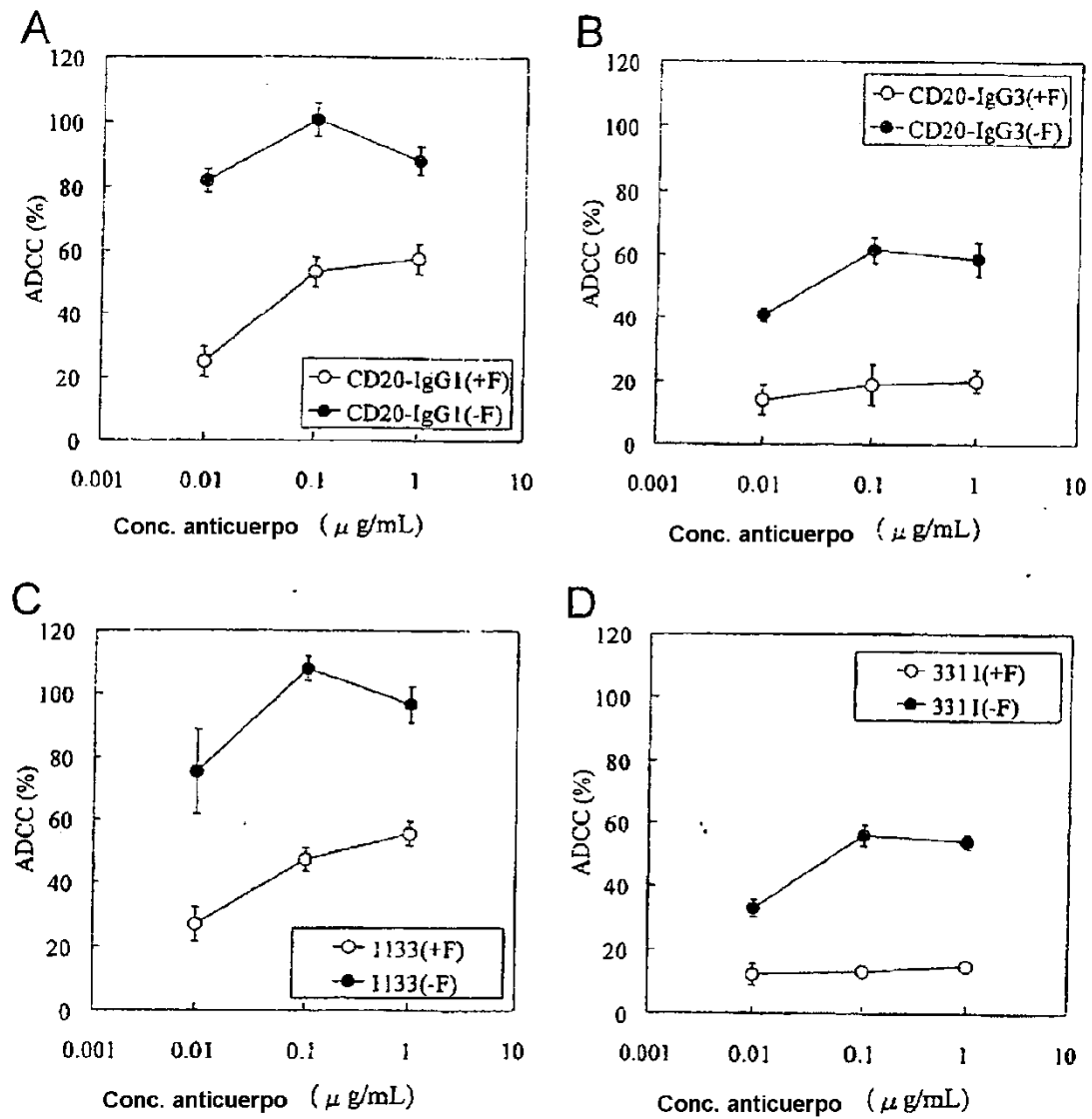


FIG. 10

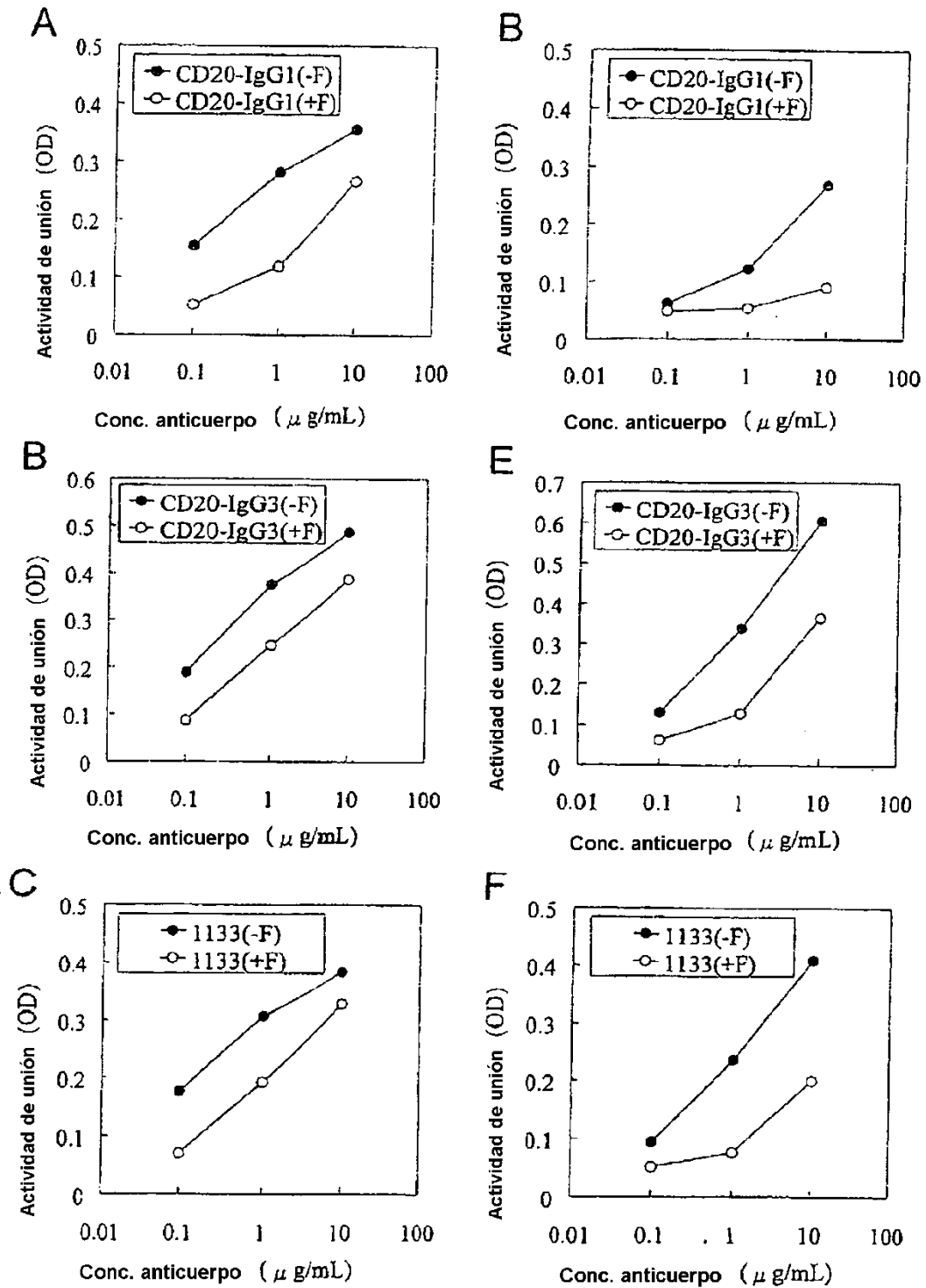


FIG. 11

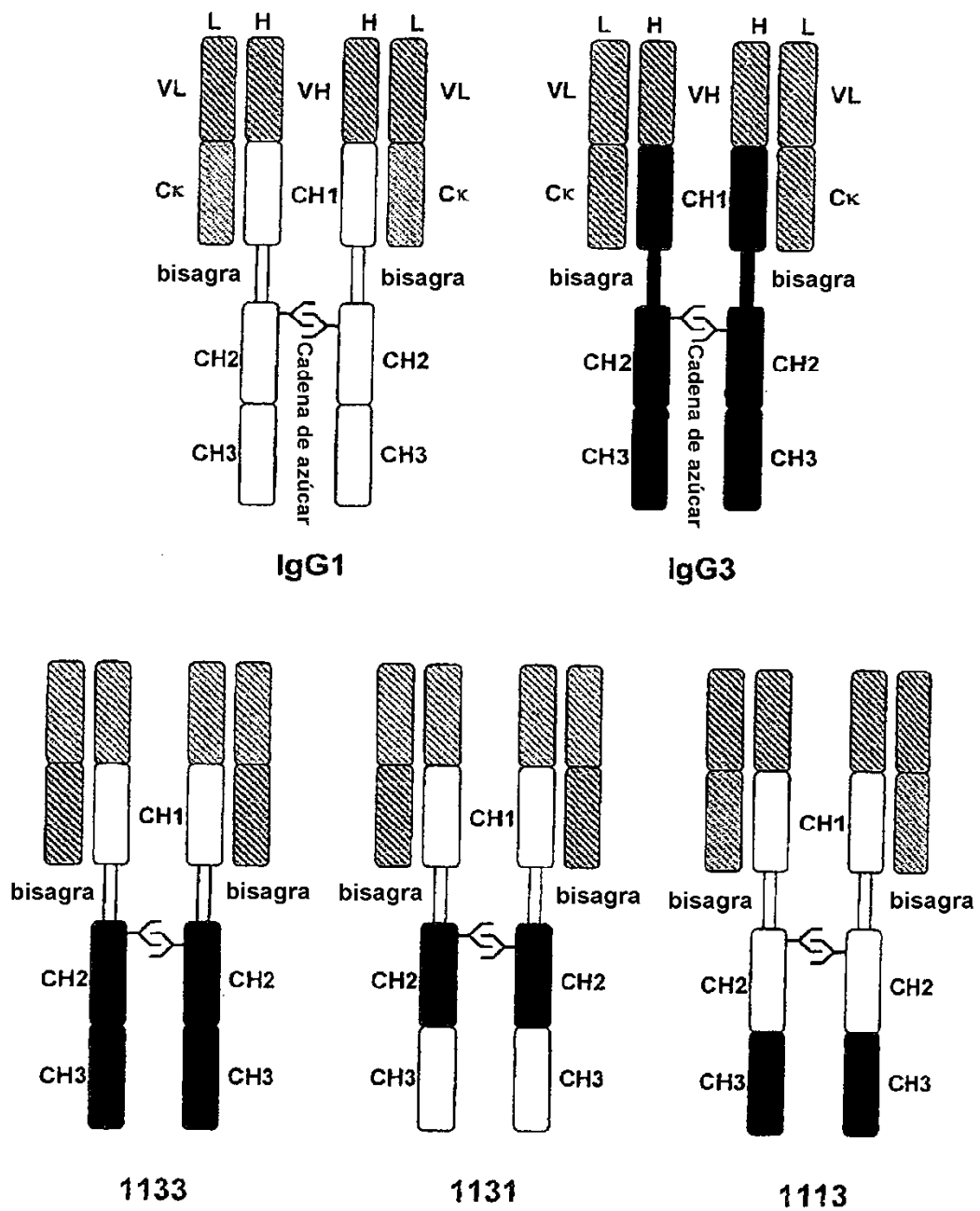
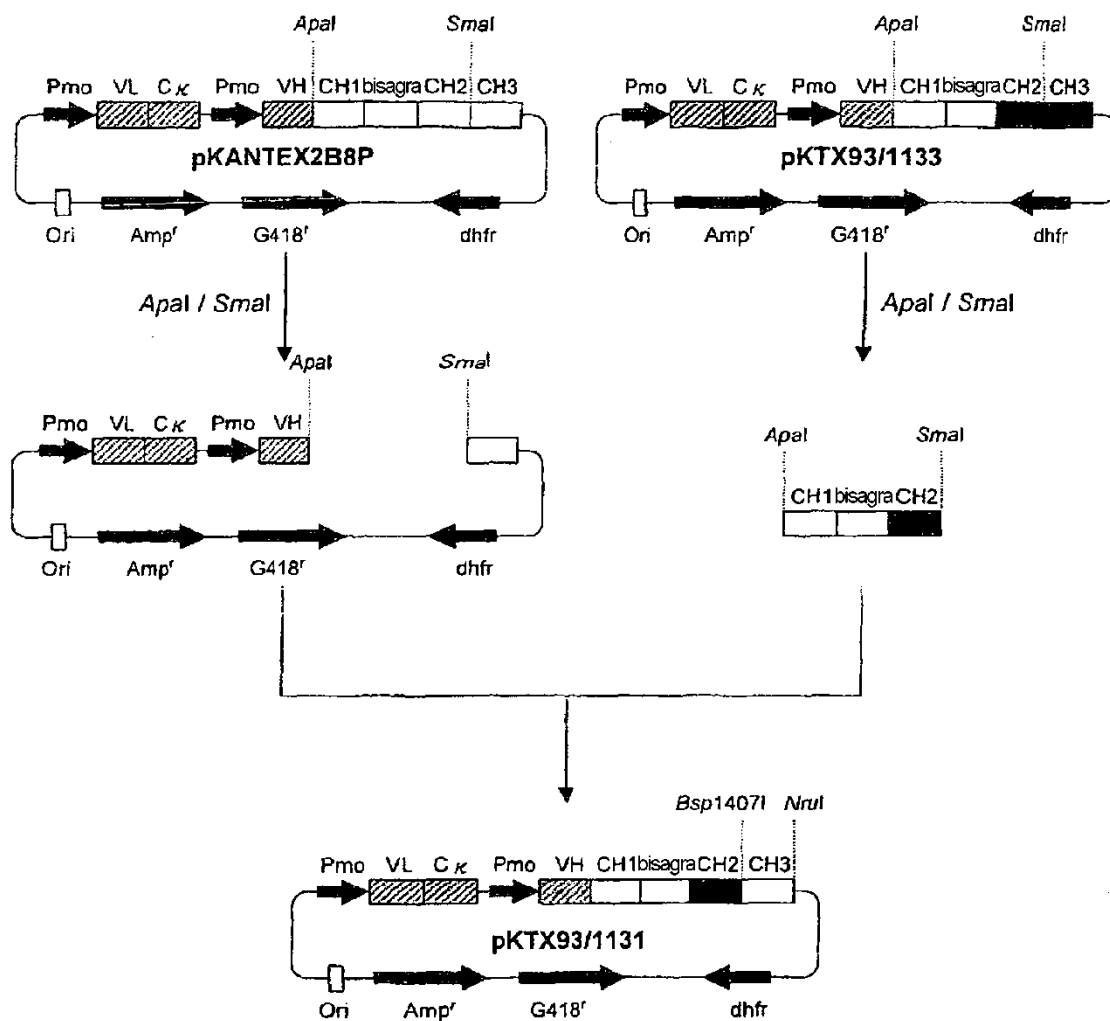


FIG. 12



Pmo: Promotor

VL: gen de la región variable de la cadena ligera

Cκ: gen de la región constante de la cadena ligera humana

VH: gen de la región variable de la cadena pesada

CH1: gen del dominio CH1

Bisagra: gen del dominio bisagra

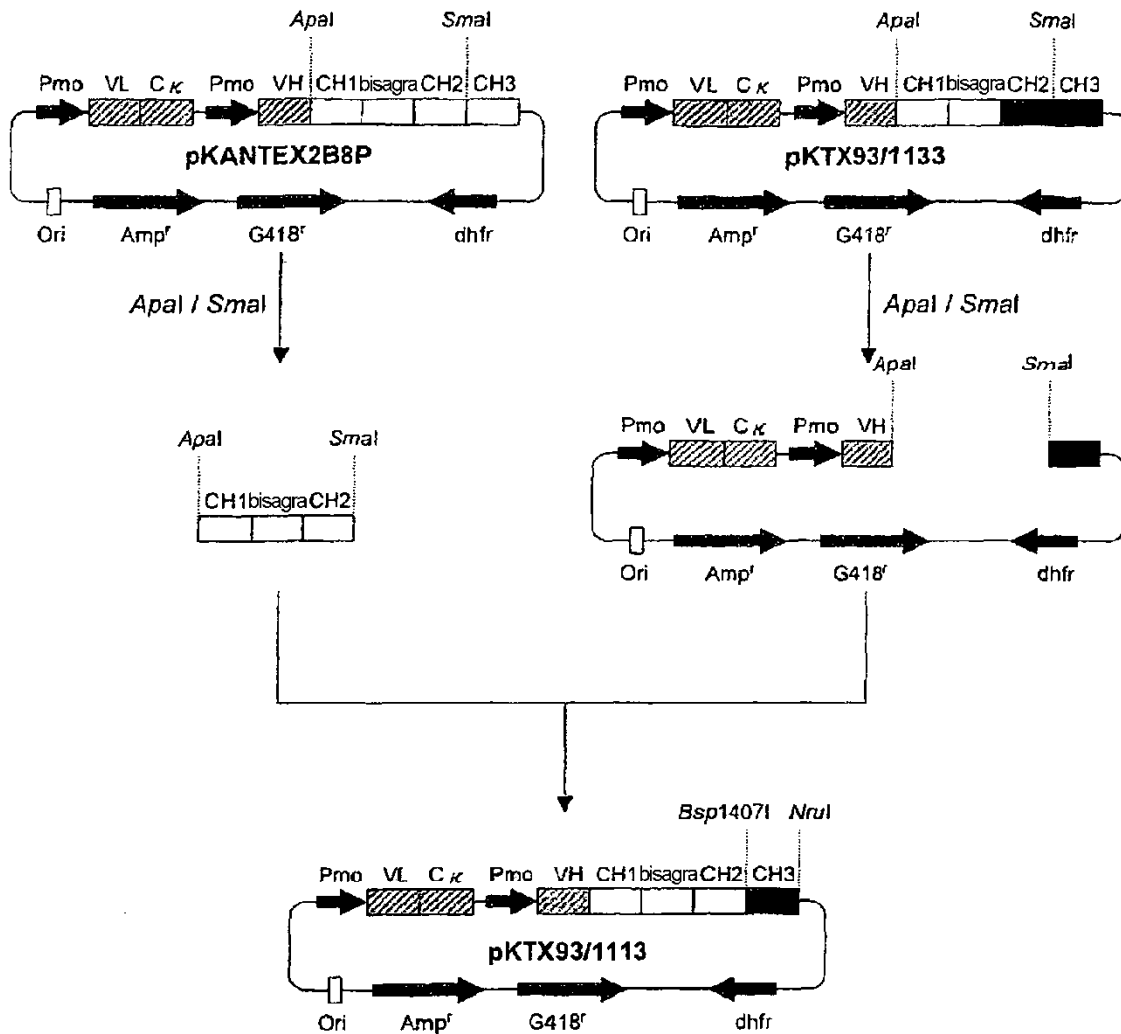
CH2: gen del dominio CH2

CH3: gen del dominio CH3

□ Cy1: gen de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana

■ Cy3: gen de la región constante de la cadena ligera de IgG3 humana

FIG. 13



Pmo: Promotor

VL: gen de la región variable de la cadena ligera

C_K: gen de la región constante de la cadena ligera humana

VH: gen de la región variable de la cadena pesada

CH1: gen del dominio CH1

Bisagra: gen del dominio bisagra

CH2: gen del dominio CH2

CH3: gen del dominio CH3

□ Cy1: gen de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana

■ Cy3: gen de la región constante de la cadena ligera de IgG3 humana

FIG. 14

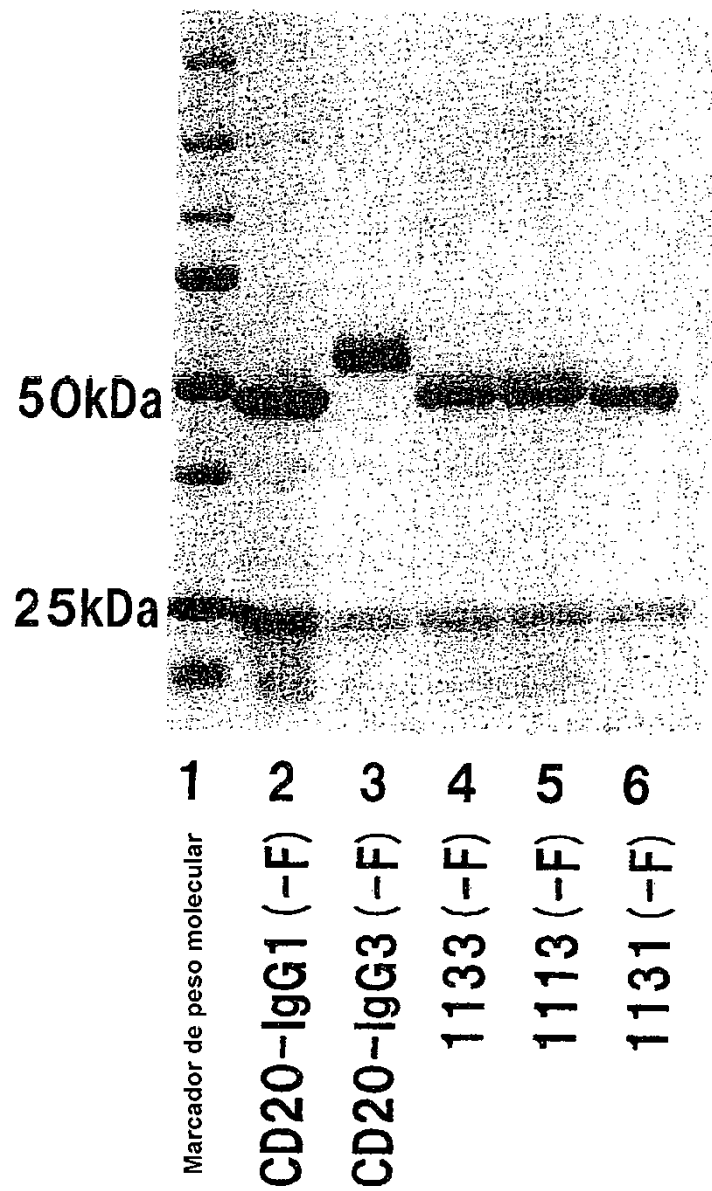


FIG. 15

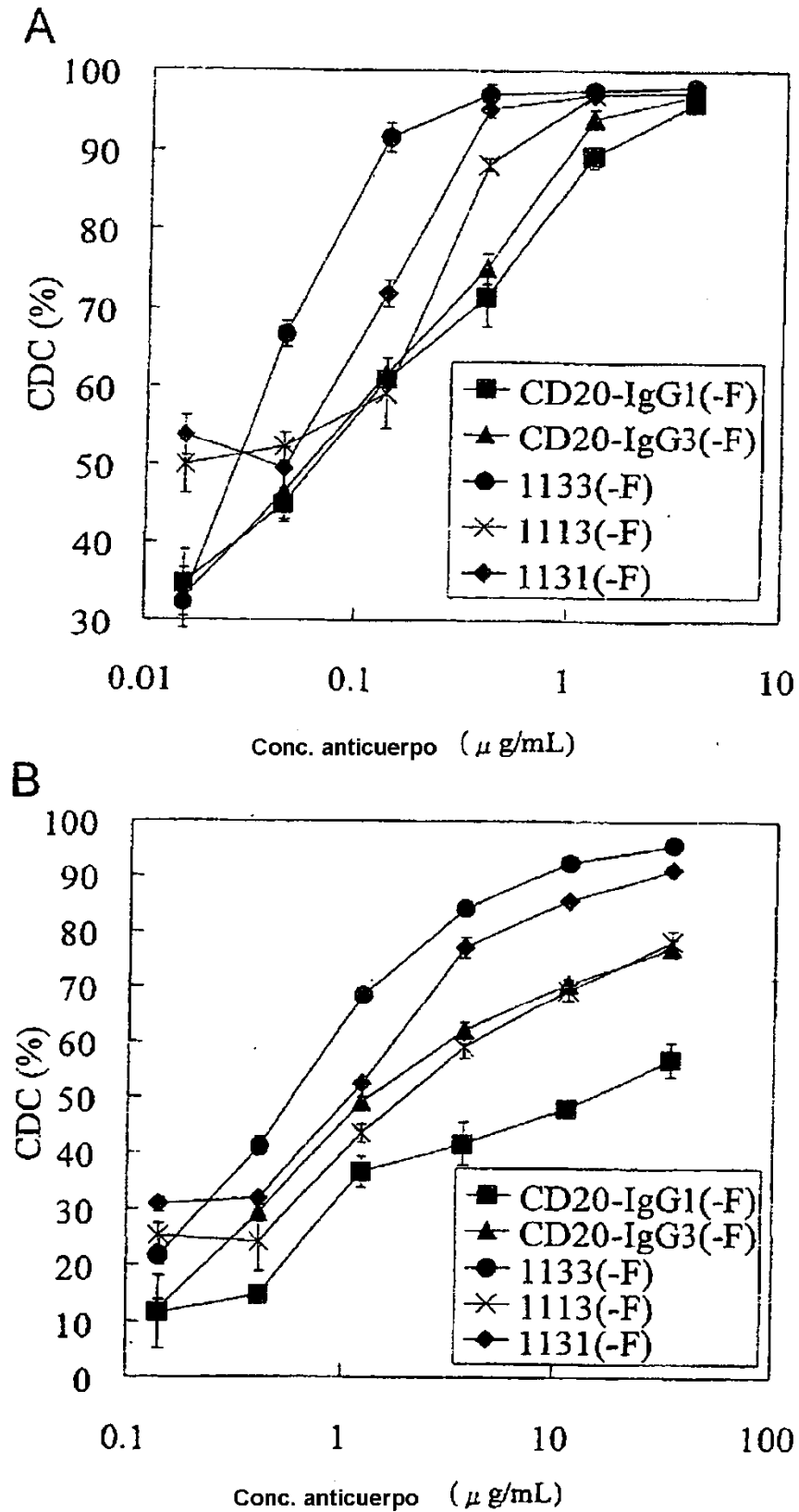


FIG. 16

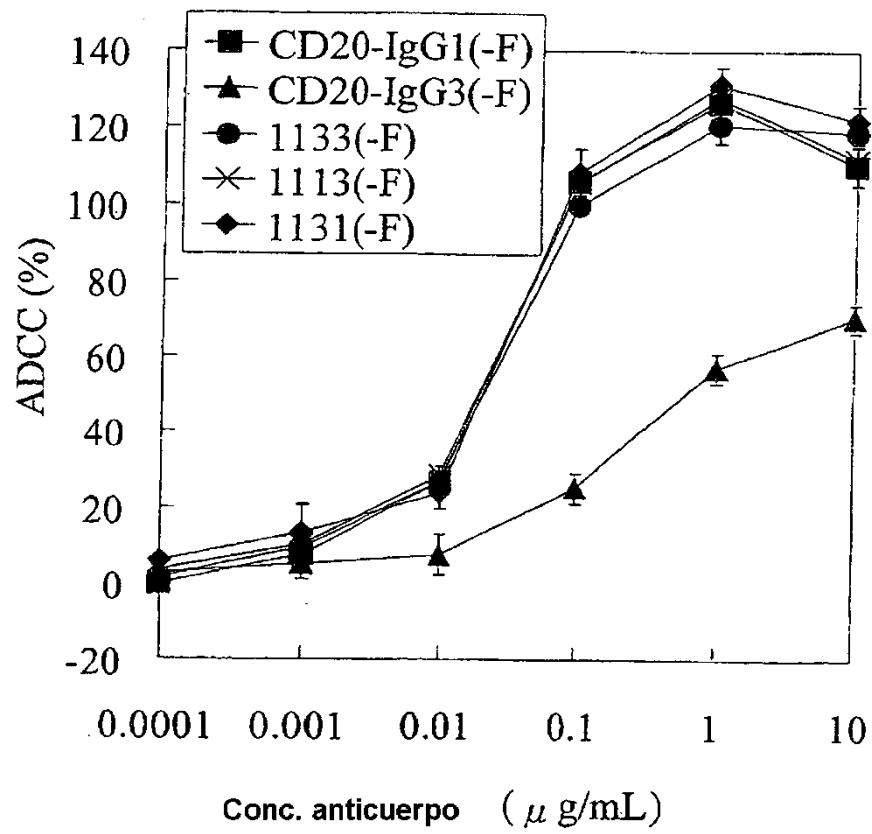


FIG. 17

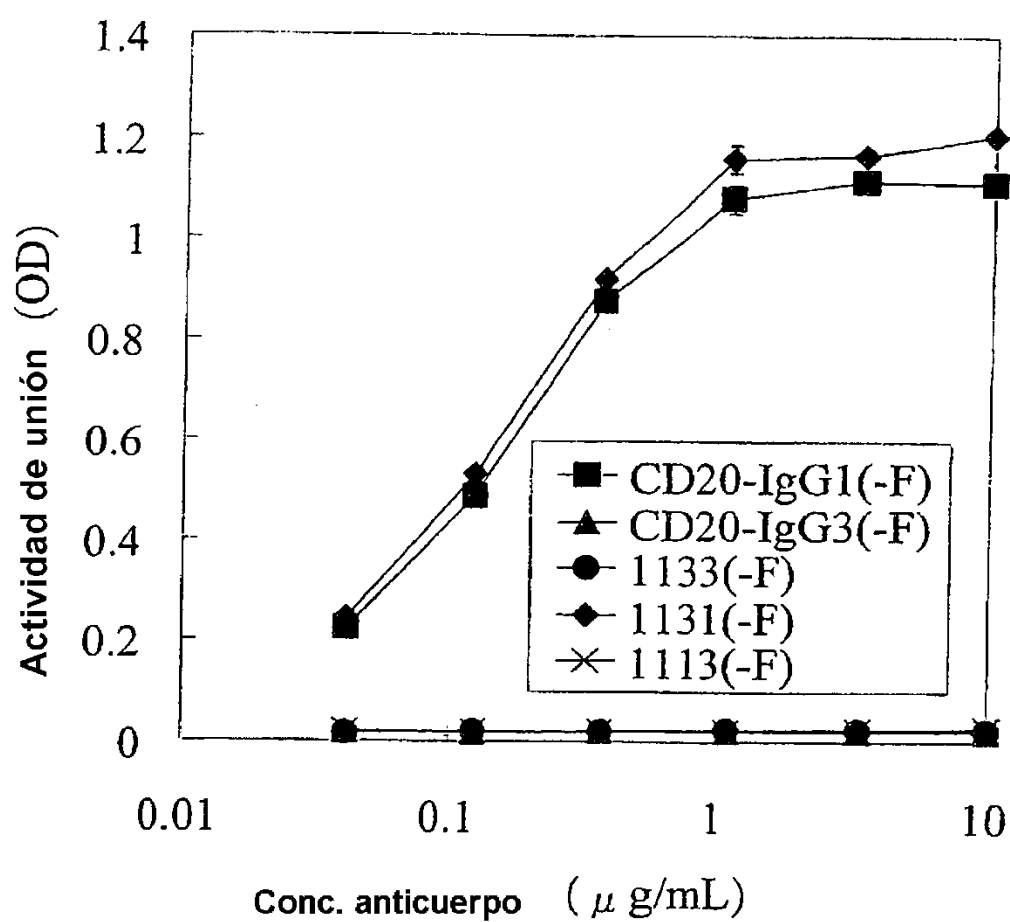
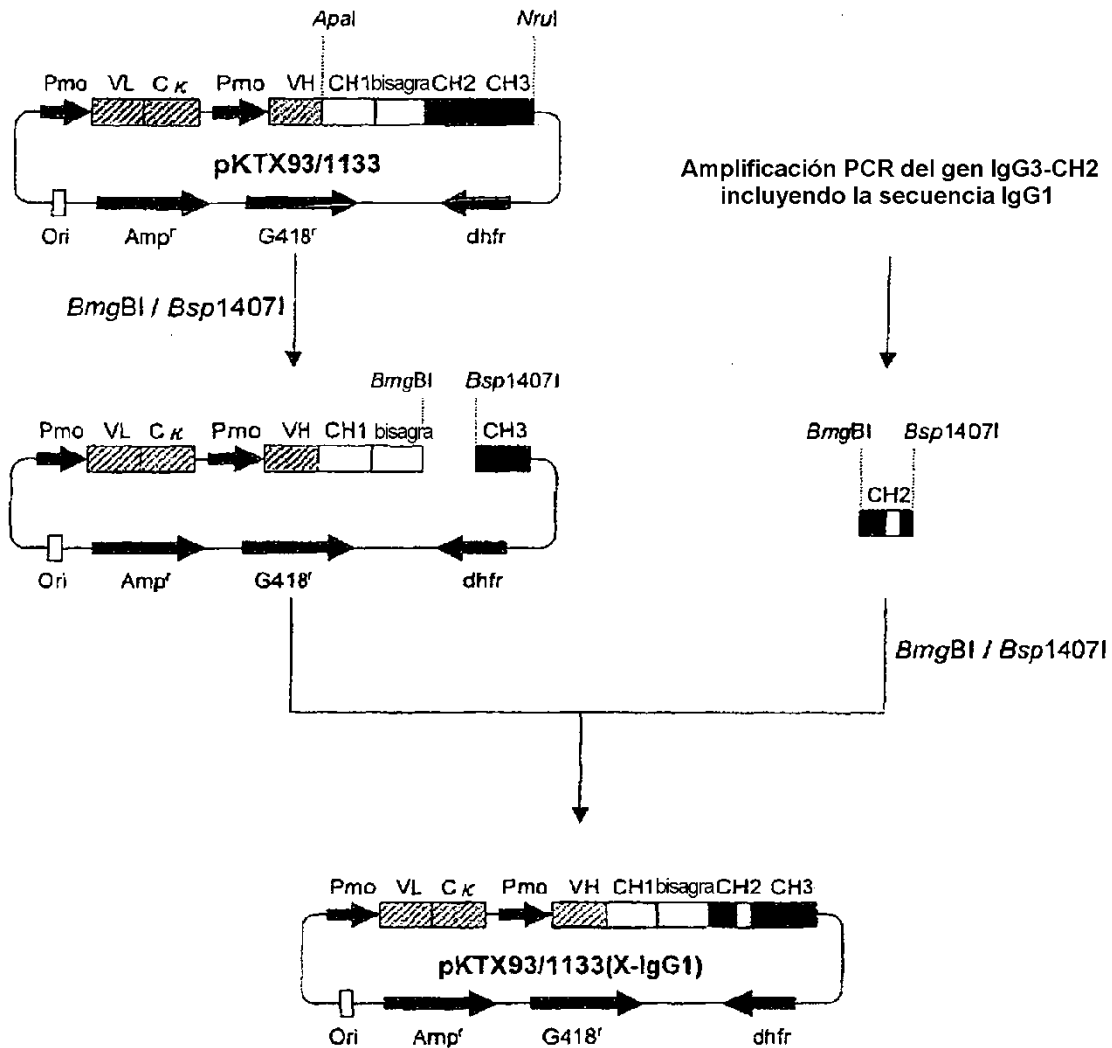


FIG. 18

	231	240	250	260	270	280	290
IgG1	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK						
						*	*
IgG3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTK						
	291	300	310	320	330	340	
IgG1	PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK						
		*	*				*
IgG3	PREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK						

FIG. 19



Pmo: Promotor

VL: gen de la región variable de la cadena ligera

C_K: gen de la región constante de la cadena ligera humana

VH: gen de la región variable de la cadena pesada

CH1: gen del dominio CH1

Bisagra: gen del dominio bisagra

CH2: gen del dominio CH2

CH3: gen del dominio CH3

X: 274, 276, 296, 300, 339

□ Cy1: gen de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana

■ Cy3: gen de la región constante de la cadena ligera de IgG3 humana

FIG. 20

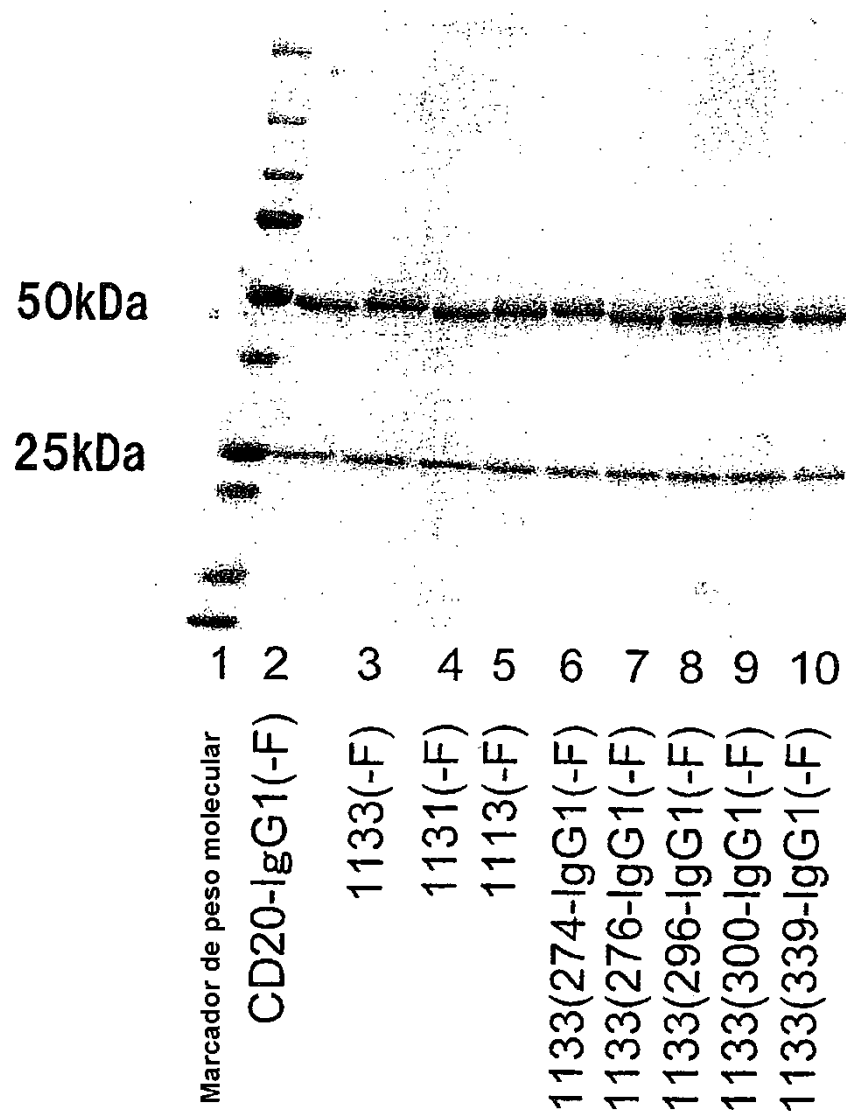


FIG. 21

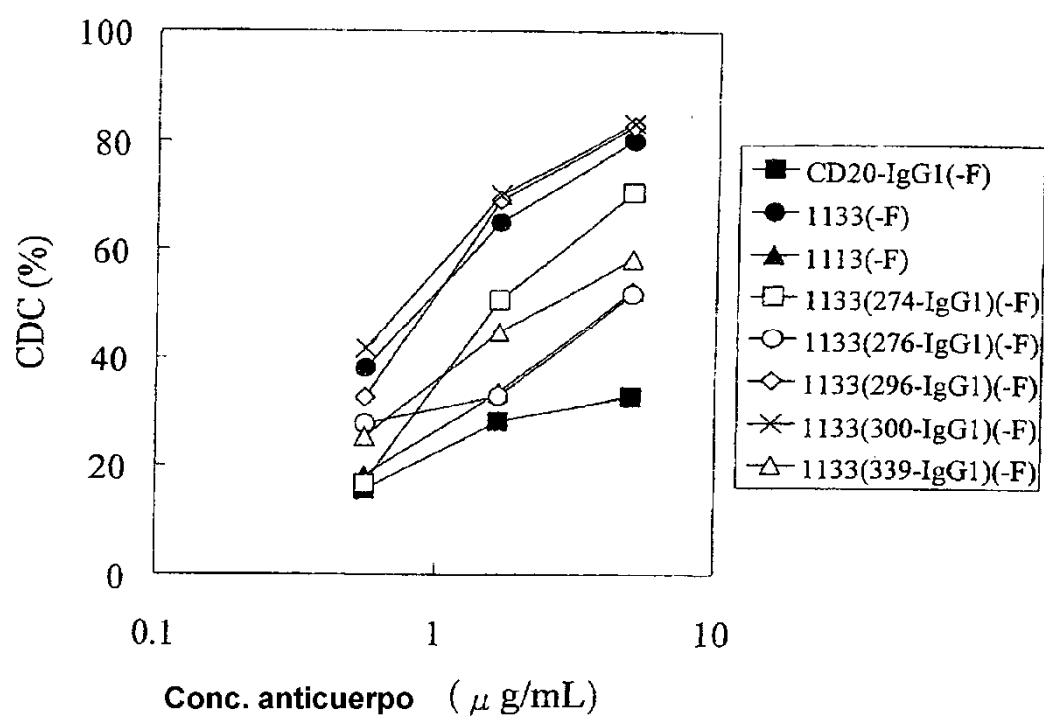
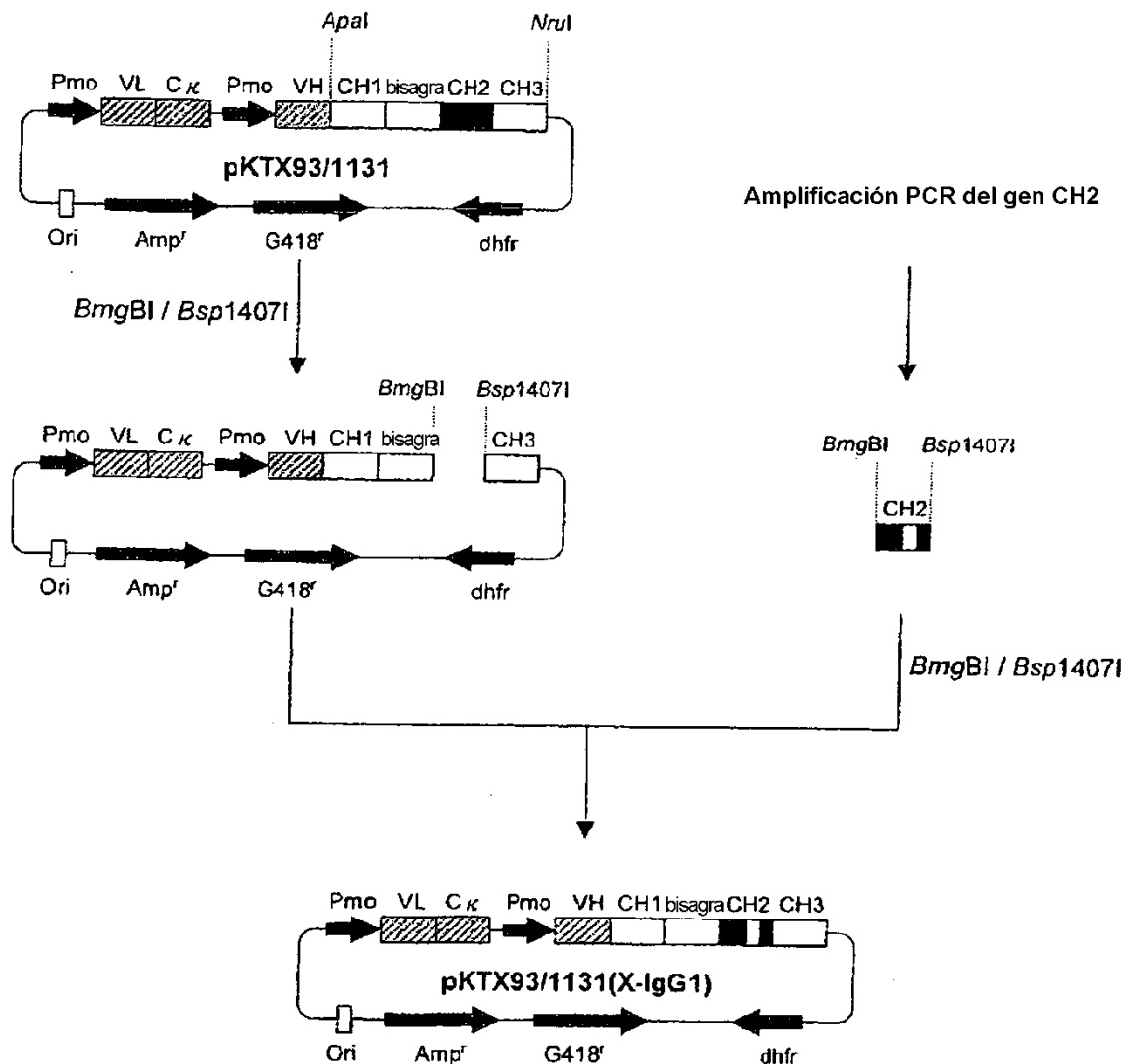


FIG. 22



Pmo: Promotor
 VL: gen de la región variable de la cadena ligera
 Cκ: gen de la región constante de la cadena ligera humana
 VH: gen de la región variable de la cadena pesada
 CH1: gen del dominio CH1
 Bisagra: gen del dominio bisagra
 CH2: gen del dominio CH2
 CH3: gen del dominio CH3

X: 296/300, 274/296/300,
 274/276/296/300
 274/296/300/339
 276/296/300/339

□ Cy1: gen de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana
 ■ Cy3: gen de la región constante de la cadena ligera de IgG3 humana

FIG. 23

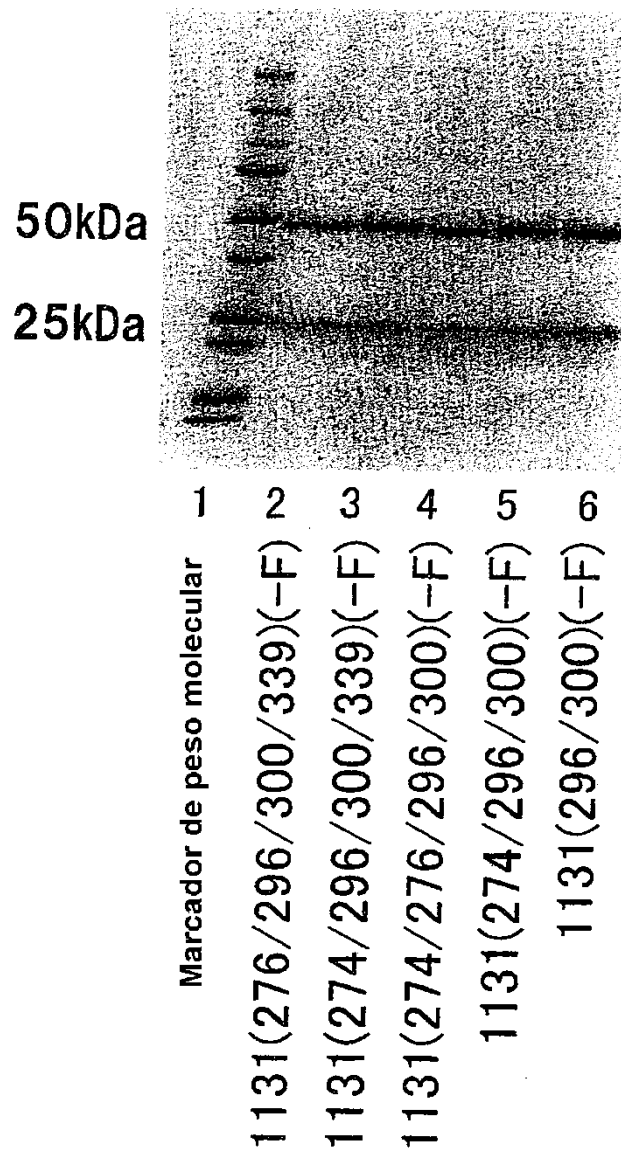


FIG. 24

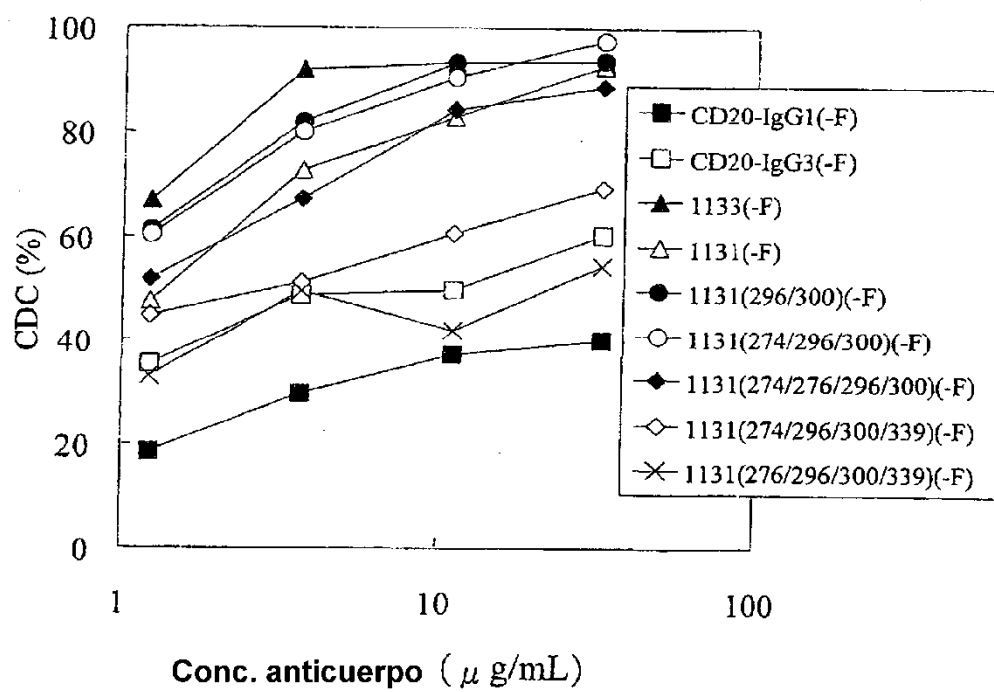


FIG. 25

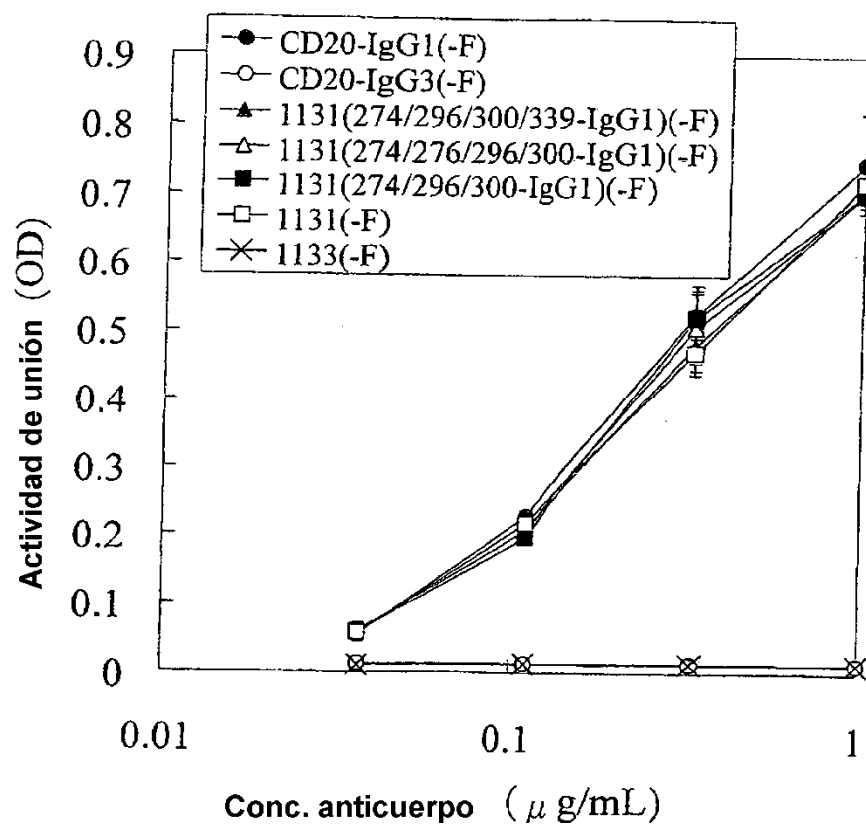


FIG. 26

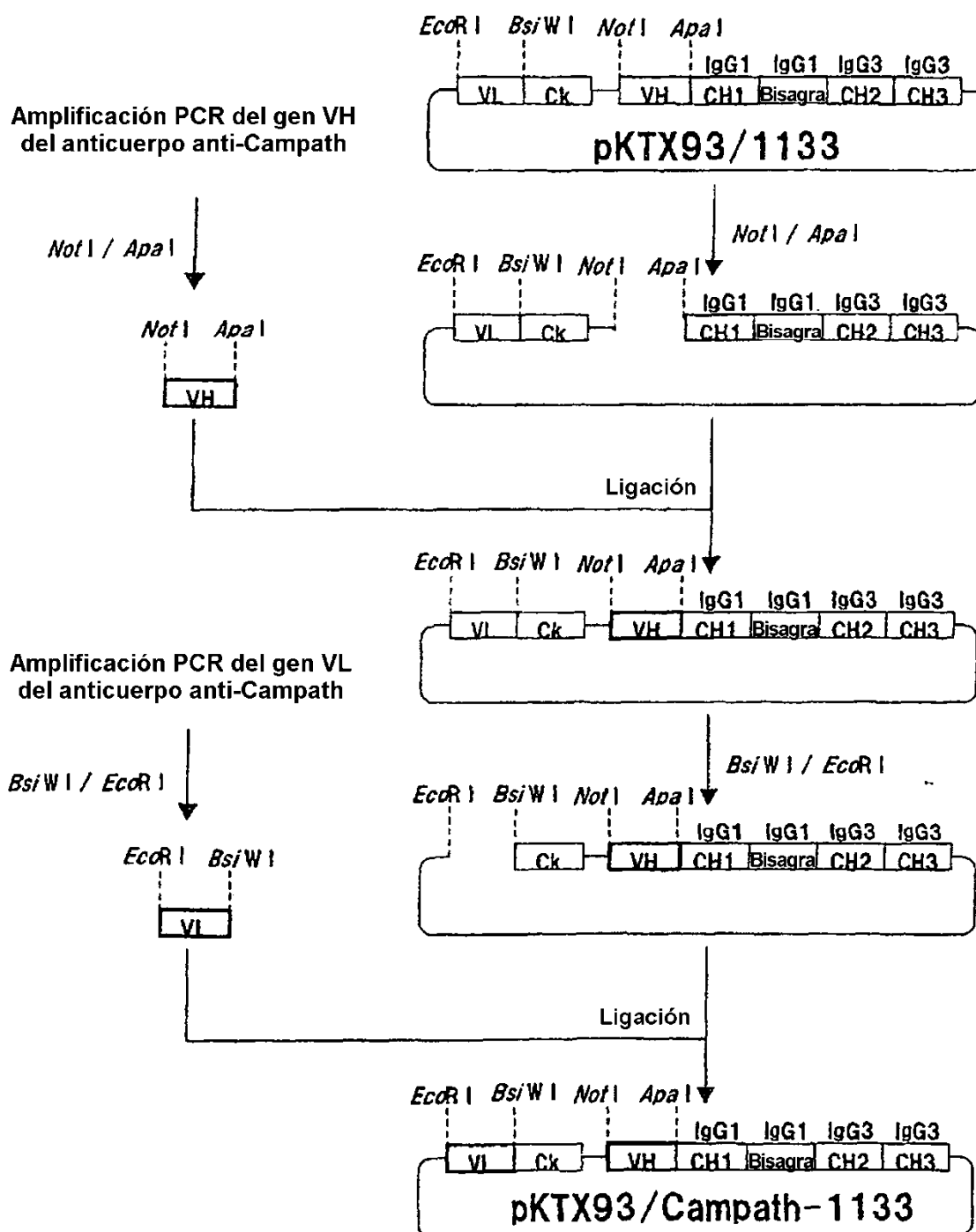


FIG. 27

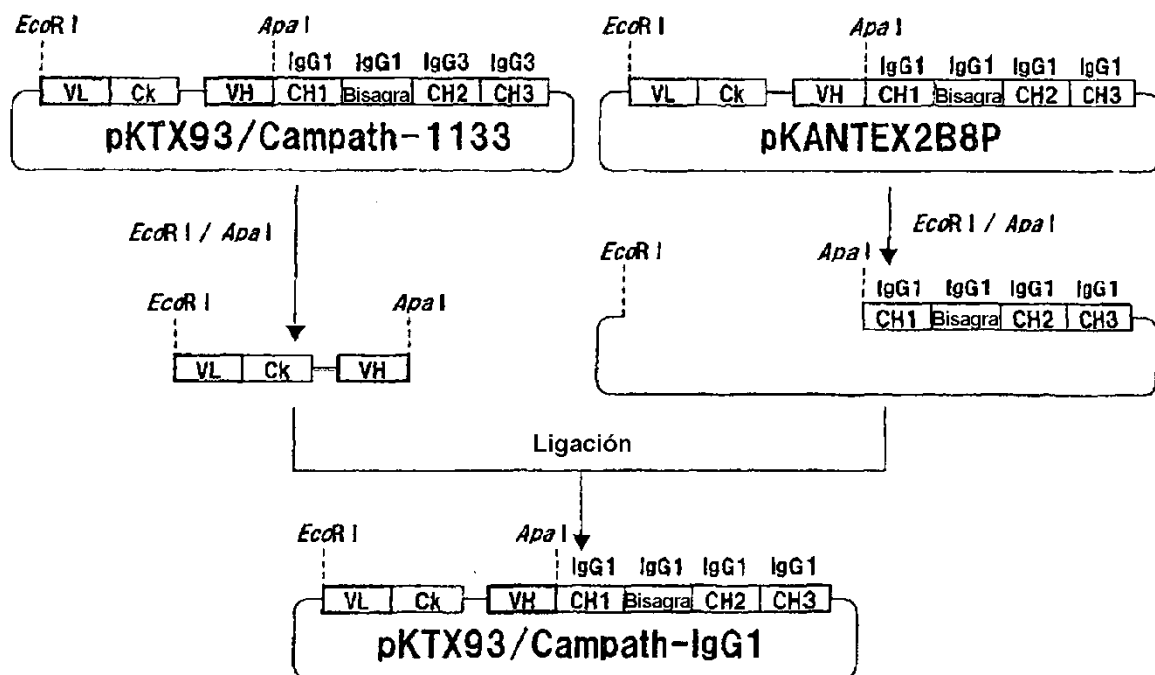


FIG. 28

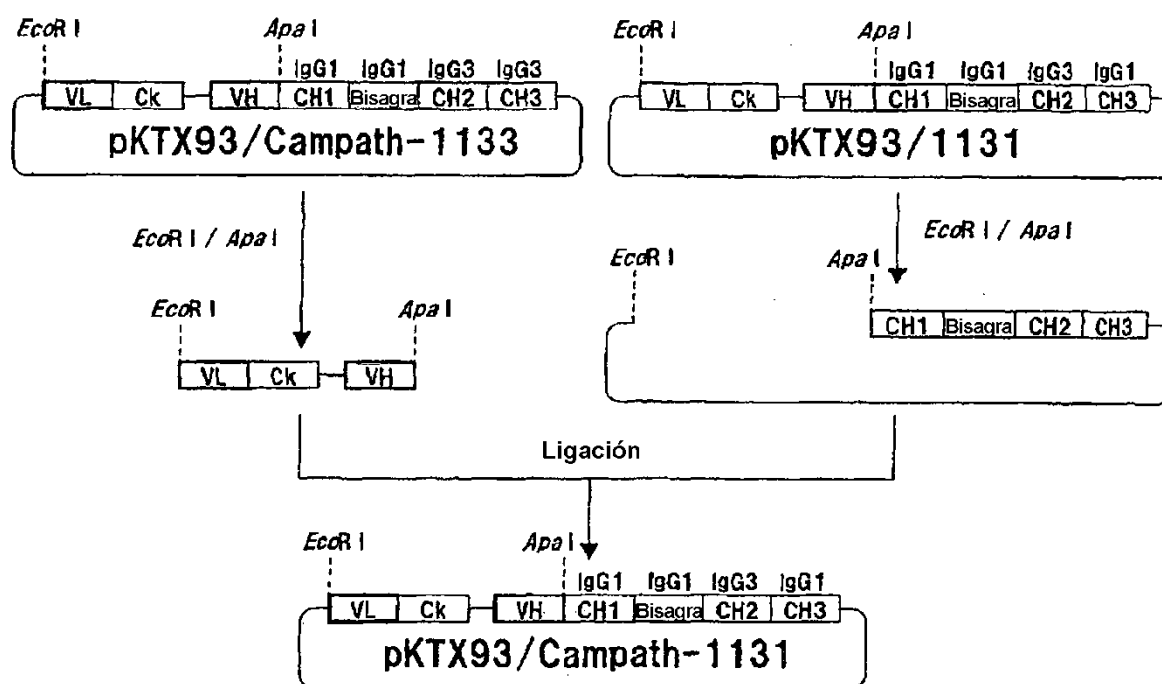


FIG. 29

