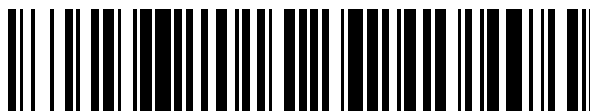


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 303**

51 Int. Cl.:

A61K 6/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2003** **E 03723038 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 1575484**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales inmunomoduladores humanizados para el tratamiento de enfermedad neoplásica o inmunodeficiencia**

30 Prioridad:

23.05.2002 IL 14982002

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

26.10.2015

73 Titular/es:

CURE TECH LTD. (50.0%)

Hayarkon Street 42

81227 Yavne, IL y

MOR-RESEARCH APPLICATIONS LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

HARDY, BRITTA;

JONES, STEVEN TARRAN y

KLAPPER, LEAH

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 549 303 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).

Anticuerpos monoclonales inmunomoduladores humanizados para el tratamiento de enfermedad neoplásica o inmunodeficiencia**Descripción**

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia, y más específicamente se refiere a anticuerpos monoclonales humanizados útiles para la terapia de una variedad de indicaciones, particularmente en el tratamiento de cáncer.

10

Antecedentes de la invención

El cáncer en sus diferentes formas es una causa importante de muerte en los seres humanos. Los tratamientos terapéuticos más ampliamente usados del cáncer son cirugía, radiación y quimioterapia. El rápido aumento de conocimiento en los últimos años sobre las bases moleculares y celulares de la regulación inmunitaria, particularmente al nivel de respuestas de linfocitos T, proporciona un nuevo arsenal de enfoques inmunoterapéuticos que incluyen el desarrollo de vacunas tumorales. Se mostró que ciertos anticuerpos monoclonales (mAb) tenían actividad inmunomoduladora que incluye la capacidad de unir determinantes sobre la superficie de linfocitos T e inducir la proliferación, activación o diferenciación de estas células.

15

20

Los anticuerpos monoclonales derivados de hibridomas de ratón contienen considerables extensiones de secuencias de aminoácidos que son inmunogénicas cuando se inyectan en un paciente humano, frecuentemente eliminando la eficacia terapéutica del anticuerpo después de un tratamiento inicial. Aunque la producción de los denominados "anticuerpos quiméricos" (es decir, regiones variables de ratón unidas a regiones constantes humanas) ha demostrado ser algo satisfactoria, sigue existiendo un significativo impedimento de inmunogenicidad.

25

Se ha utilizado la tecnología de ADN recombinante para producir inmunoglobulinas que contienen regiones estructurales (FR) humanas combinadas con regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un ratón donante o inmunoglobulina de rata. Estas nuevas proteínas se denominan inmunoglobulinas "remodeladas" o "humanizadas" y el proceso por el que la inmunoglobulina donante se convierte en una inmunoglobulina tipo humano combinando sus CDR con una región estructural humana se denomina "humanización". Los anticuerpos humanizados son importantes debido a que se unen al mismo antígeno que los anticuerpos originales, pero son menos inmunogénicos cuando se inyectan en seres humanos.

30

35

La patente de EE.UU. nº 6.294.654 desvela una molécula de inmunoglobulina modificada o fragmento funcional o parte de la misma (Ig), que tiene un péptido antigénico extraño para la Ig incorporada en uno o más bucles no CDR, y en la que se mantiene el principal contorno de la región estructural del dominio constante. Adicionalmente se desvela el uso del anticuerpo modificado para uso terapéutico o profiláctico.

40

La patente de EE.UU. nº 6.074.635 desvela un método para la activación independiente de antígeno de linfocitos T *in vitro* que comprende poner en contacto linfocitos T en ausencia de antígeno con una combinación de al menos dos citocinas seleccionadas del grupo que consiste en interleucina-2, interleucina-6 y factor de necrosis tumoral alfa, o fragmentos funcionalmente equivalentes de los mismos.

45

La patente de EE.UU. nº 5.658.741 desvela un método de inducción de la activación y proliferación de linfocitos T, comprendiendo dicho método: (a) conjugar una pluralidad de anticuerpos monoclonales específicos de linfocitos T con una molécula de aminodextrano que tiene 7-20 % en peso de grupos amina y un peso molecular de al menos 100.000 daltons, en los que la relación molar de dichos anticuerpos con dicho aminodextrano es mayor o igual a dos; y (b) hacer reaccionar dicho conjugado con una muestra que contiene dichos linfocitos T para efectuar la unión de dichos anticuerpos conjugados con dichos linfocitos T para inducir la activación y proliferación de dichos linfocitos T.

50

La patente de EE.UU. 5.585.089 de Queen et al. desvela una inmunoglobulina humanizada que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina donante y regiones estructurales de la región variable de la cadena pesada y ligera de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina aceptora humana, inmunoglobulina humanizada que se une específicamente a un antígeno con una constante de afinidad de al menos $10^7 M^{-1}$ y no superior a aproximadamente cuatro veces la de la inmunoglobulina donante, en la que dicha inmunoglobulina humanizada comprende aminoácidos de la región estructural de inmunoglobulina donante fuera de las CDR de Kabat y Chothia, en la que los aminoácidos donantes sustituyen a aminoácidos correspondientes en las regiones estructurales de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina aceptora, y cada uno de dichos aminoácidos donantes: (I) es adyacente a una CDR en la secuencia de inmunoglobulina donante, o (II) contiene un átomo dentro de una distancia de 4Å de una CDR en dicha inmunoglobulina humanizada.

55

60

La patente de EE.UU. 5.225.539, de Winter, desvela un anticuerpo alterado o fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que un dominio variable del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene las regiones

65

estructurales de un primer dominio variable de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina y las regiones determinantes de la complementariedad de un segundo dominio variable de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, en el que dicho segundo dominio variable de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina es diferente de dicho primer dominio variable de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina en especificidad de unión por antígeno, afinidad de unión al antígeno, especies, clase o subclase.

El documento US 5.225.539 y la patente de EE.UU. 5.585.089 no proporcionan herramientas suficientes y descripción completa para llevar a cabo la síntesis de un anticuerpo alterado, particularmente un anticuerpo humanizado, por un experto en la materia.

La patente de EE.UU. nº 5.897.862 de uno de los inventores de la presente invención, que se incorpora en el presente documento por referencia, desvela un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que el anticuerpo monoclonal: (i) es secretado por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el nº de acceso I-1397, o (ii) reconoce el mismo epítoto antigénico que el anticuerpo bajo (i). El anticuerpo monoclonal desvelado en el documento US5.897.862 está dirigido contra células "Daudi", una línea celular linfoblastoide B humana, y se mostró que estimulaba linfocitos murinos y linfocitos T de sangre periférica humana (Hardy et al, Cell Immunol. 118:22, 1989). Este anticuerpo murino también se denomina mBAT-1 en lo sucesivo. El anticuerpo mBAT-1 también presenta efectos antitumorales e inmunoestimulantes en diversos tipos de tumores (Hardy et al., Int. J. Oncol. 19:897, 2001) que incluyen tumores de origen humano (Hardy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5756, 1997).

La solicitud de patente internacional WO 00/58363 de uno de los inventores de la presente invención desvela un anticuerpo monoclonal que tiene una región variable que comprende la región variable de la cadena pesada y/o la región variable de la cadena ligera kappa de mBAT-1 o una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera kappa que tiene al menos el 70 % de identidad con la región variable de la cadena pesada y/o la región variable de la cadena ligera kappa de mBAT-1.

En ningún sitio en la técnica anterior se enseña o sugiere que un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende CDR de un origen murino y FR de un origen humano pueda provocar una respuesta inmunitaria y pueda adicionalmente presentar actividad anticancerígena. Además, hay una necesidad sin cumplir de métodos fiables para diseñar anticuerpos humanizados funcionales, ya que es muy conocido en la técnica que la síntesis del anticuerpo humanizado de la presente invención no puede basarse predecible o rutinariamente en la técnica anterior.

Sumario de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un anticuerpo inmunomodulador monoclonal humanizado, también denominado en lo sucesivo hBAT-1, que se une a células linfoblastoides B e induzca la proliferación y activación de linfocitos de la sangre periférica. Dicho hBAT-1 se basa en el anticuerpo inmunomodulador monoclonal murino previamente conocido, también denominado en el presente documento mBAT-1, que se une a células linfoblastoides B e induce la proliferación y activación de linfocitos de la sangre periférica y adicionalmente provoca un efecto antitumoral cuando se inyecta en un sujeto que tiene un tumor.

La presente divulgación proporciona una descripción completa del proceso de humanización de mBAT-1 junto con la exposición razonada para cada etapa de síntesis. Así, la descripción del proceso de humanización proporcionado en la presente invención es adecuada para la humanización de anticuerpos BAT distintos de mBAT-1, por un experto en la materia.

La administración del anticuerpo BAT-1 humanizado ofrece un método para la prevención terapéutica, detección o tratamiento de cáncer. El tratamiento de un sujeto en necesidad del mismo con la forma humanizada del anticuerpo BAT-1, como se proporciona por la presente invención, es considerablemente más eficaz que el tratamiento con un anticuerpo BAT-1 quimérico, y evita respuestas inmunogénicas adversas.

La presente invención se basa en parte en el hallazgo inesperado de que el anticuerpo BAT-1 humanizado parece inducir un mayor efecto antitumoral que el inducido por el anticuerpo BAT-1 murino parental. KKKKKKKKKKKKKK Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado que tiene al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de anticuerpo monoclonal murino BAT-1 (mBAT-1) y una región estructural (FR) derivada de una inmunoglobulina humana aceptora en la que el anticuerpo humanizado conserva la actividad antitumoral de anticuerpo monoclonal mBAT-1 y es menos inmunogénico en un sujeto humano que dicho anticuerpo murino.

Según una realización, el anticuerpo humanizado induce un mayor efecto antitumoral que el inducido por el anticuerpo BAT-1 murino parental.

Según otra realización, el anticuerpo humanizado comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal murino BAT-1 (mBAT-1), en el que el anticuerpo humanizado comprende:

a. regiones variables de la cadena ligera de fórmula: FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-COR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4} en la que cada FR es independientemente una región estructural de un anticuerpo humano, y cada CDR es una región determinante de la complementariedad, derivada de BAT-1;

5 b. las regiones variables de la cadena pesada de fórmula: FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4} en la que cada FR es por separado una región estructural de un anticuerpo humano, y cada CDR es una región determinante de la complementariedad, de mBAT-1.

10 Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado que tiene una región Fab genéticamente modificada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal murino BAT-1 (mBAT-1), en el que el anticuerpo genéticamente modificado conserva la actividad biológica de dicho mBAT-1 y en el que dicho anticuerpo monoclonal genéticamente modificado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

15 (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de: CDR_{H1} (SEC ID N°: 12); CDR_{H2} (SEC ID N°: 13); CDR_{H3} (SEC ID N°: 14); y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR_{L1} (SEC ID N°: 9); CDR_{L2} (SEC ID N°: 10); CDR_{L3} (SEC ID N°: 11);

20 (ii) regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos que tienen más de aproximadamente el 80 por ciento de similitud con todas o parte de las secuencias de: CDR_{H1} (SEC ID N°: 12); CDR_{H2} (SEC ID N°: 13); CDR_{H3} (SEC ID N°: 14); CDR_{L1} (SEC ID N°: 9); CDR_{L2} (SEC ID N°: 10); CDR_{L3} (SEC ID N°: 11);

25 (iii) un anticuerpo de (i) o (ii) en el que uno o más residuos de aminoácidos se han añadido, delecionado, sustituido o modificado químicamente sin afectar sustancialmente la actividad biológica o especificidad de unión del anticuerpo.

Según una realización, las regiones estructurales (FR) derivan de un anticuerpo humano.

30 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal humanizado comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal murino BAT-1 (mBAT-1), en la que dicho anticuerpo humanizado comprende:

35 a. regiones variables de la cadena ligera de fórmula: FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-CDR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4} en la que cada FR es independientemente una región estructural de un anticuerpo humano, y cada CDR es una región determinante de la complementariedad, en la que la secuencia de aminoácidos de CDR_{L1} es SARSSVSYMH (SEC ID N°: 9); CDR_{L2} es RTSNLAS (SEC ID N°: 10); CDR_{L3} es QQRSSFPLT (SEC ID N°: 11);

40 b. las regiones variables de la cadena pesada de fórmula: FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4} en la que cada FR es por separado una región estructural de un anticuerpo humano, y cada CDR es una región determinante de la complementariedad, en la que la secuencia de aminoácidos de: CDR_{H1} es NYGMN (SEC ID N°: 12); CDR_{H2} es WINTDSGESTYAEFFKG (SEC ID N°: 13); CDR_{H3} es VGYDALDY (SEC ID N°: 14).

45 Según otra realización más, dicho anticuerpo humanizado induce un mayor efecto antitumoral que el anticuerpo monoclonal BAT-1 murino; o dicho anticuerpo humanizado induce un mayor efecto antimetastásico que el anticuerpo monoclonal BAT-1 murino; o las FR de la región variable de la cadena pesada derivan de las FR de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo hsihv1295 humano; o las FR de la región variable de la cadena ligera kappa se basan en las FR de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo TEL9 humano; o tiene una región constante kappa humana; o el anticuerpo está adicionalmente marcado con una marca detectable, inmovilizado sobre una fase sólida, o conjugado con un compuesto heterólogo; o las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado están seleccionadas del grupo que consiste en: BATR_{KA} (SEC ID N°: 15), BATR_{KB} (SEC ID N°: 16), BATR_{KC} (SEC ID N°: 17), BATR_{KD} (SEC ID N°: 18), y las regiones variables de la cadena pesada están seleccionadas del grupo que consiste en: BATH_A (SEC ID N°: 20), BATH_B (SEC ID N°: 21), BATH_C (SEC ID N°: 22), BATH_D (SEC ID N°: 23) o BATH_E (SEC ID N°: 24); o las regiones variables del anticuerpo monoclonal humanizado están seleccionadas del grupo que consiste en: BATH_A/BATR_{KA} (SEC ID N°: 20/SEC ID N°: 15), BATH_B/BATR_{KA} (SEC ID N°: 21/SEC ID N°: 15), BATH_B/BATR_{KB} (SEC ID N°: 21/SEC ID N°: 16), BATH_C/BATR_{KB} (SEC ID N°: 22/SEC ID N°: 16), BATH_B/BATR_{KD} (SEC ID N°: 21/SEC ID N°: 18), o BATH_C/BATR_{KD} (SEC ID N°: 22/SEC ID N°: 18).

Según otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

60 Según otra realización más, el anticuerpo es de isotipo IgG.

Según otra realización más, dicha subclase de isotipo está seleccionada de IgG₁ o IgG₄.

65 Según un tercer aspecto, la presente invención proporciona un fragmento de anticuerpo derivado del anticuerpo humanizado como se indica anteriormente, en el que el fragmento de anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en: Fv, F(ab'), F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario.

- Según una realización, el anticuerpo humanizado se genera por tecnología de ADN recombinante, utilizando injerto de CDR.
- 5 Según un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una construcción de polinucleótido aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos monoclonales que se han mencionado anteriormente o fragmentos de los mismos.
- Según una realización, la construcción de polinucleótido aislado codifica una región variable de la cadena ligera kappa seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18.
- 10 Según otra realización, la construcción de polinucleótido aislado está seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 87, SEC ID N°: 88, SEC ID N°: 89.
- Según otra realización más, la construcción de polinucleótido aislado codifica una región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24.
- 15 Según otra realización más, la construcción de polinucleótido aislado está seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 90, SEC ID N°: 91, SEC ID N°: 92.
- 20 Según un quinto aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos anteriores.
- Según una realización, el vector comprende además al menos una secuencia de polinucleótidos que codifica un componente seleccionado del grupo que consiste en: un promotor operativamente ligado al polinucleótido que codifica el anticuerpo, uno o más genes de resistencia, una secuencia de Kozak, un origen de replicación, uno o más genes marcadores de selección, un elemento potenciador, terminador de la transcripción, un péptido señal, región constante kappa humana genómica, región constante IgG humana genómica.
- 25 Según otra realización, el vector es un plásmido o un virus. Preferentemente, el vector está seleccionado del grupo que comprende: pKN110, pG1D200, pG1KD210, pUC o pBR322.
- 30 Según otra realización más, el vector comprende la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N°: 93.
- Según un sexto aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el vector anterior.
- 35 Según una realización, la célula huésped puede expresar un anticuerpo o fragmentos del mismo; o está seleccionada de eucariotas y procariotas; o está seleccionada del grupo que consiste en: células CHO, CHO*dhfr*, NSO, COS o COS7.
- 40 Según un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo el anticuerpo anterior o fragmentos de anticuerpos del mismo.
- Según una realización, la composición farmacéutica comprende además un vehículo, diluyente o estabilizador fisiológicamente aceptable.
- 45 Según un octavo aspecto, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo anterior o fragmentos de anticuerpos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.
- Según una realización, el cáncer está seleccionado de melanoma, tumores de pulmón, cáncer colorrectal o metástasis hepática.
- 50 Según un noveno aspecto, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo monoclonal humanizado anterior o fragmentos de anticuerpos para la preparación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de dicho anticuerpo o fragmentos de anticuerpos para inducir actividad proliferativa, citolítica o estimulante de linfocitos T CD4+.
- 55 Según un décimo aspecto, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo monoclonal humanizado anterior o fragmentos de anticuerpos para la preparación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de dicho anticuerpo o fragmentos de anticuerpos para aumentar la supervivencia de linfocitos T CD4+ activados.
- 60 Según una realización, la composición farmacéutica se refiere al tratamiento de una deficiencia genética o inmunitaria adquirida.
- 65 Según otra realización, la composición farmacéutica se refiere al tratamiento de las fases tempranas de infección por el VIH.

Según otra realización más, la composición farmacéutica se refiere al tratamiento de SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida).

5 Según otra realización más, la composición farmacéutica se refiere al tratamiento de pacientes que tienen un hemograma que muestra una disminución en linfocitos T CD4+.

Según un undécimo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir el anticuerpo anterior. El método comprende las etapas de (i) transfectar una célula huésped con un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica dicho anticuerpo, o co-transfectar la célula huésped con 2 vectores que comprende cada uno una secuencia de polinucleótidos que codifica las regiones de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo; (ii) cultivar la célula huésped de (i) de manera que se exprese dicho anticuerpo; y (iii) recuperar el anticuerpo del huésped. Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones adjuntas.

15 Breve descripción de los dibujos

La **FIGURA 1** muestra las secuencias de ADN y de péptidos de la región variable de la cadena ligera kappa (V_K) del anticuerpo BAT-1 murino.

20 La **FIGURA 2** representa las clases canónicas de CDR en la región V_K de BAT-1 murino. "Clases canónicas de Chothia" indica donde se usaron las clases canónicas como se definen por Chothia y sus colaboradores (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 arriba; Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175, 1990), mientras que "Clases canónicas de Martin" significa donde se usaron las clases canónicas definidas por Martin y Thornton (Martin et al., J. Mol. Biol. 263:800, 1996). Los residuos de FR están marcados en negrita.

25 La **FIGURA 3** presenta las secuencias de ADN y de péptidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo BAT-1 murino.

30 La **FIGURA 4** representa las clases canónicas de CDR en la región V_H de BAT-1 murino. "Clases canónicas de Chothia" indica donde se usaron las clases canónicas como se define por Chothia y sus colaboradores (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 arriba; Tramontano et al., arriba), mientras que "Clases canónicas de Martin" significa donde se usaron las clases canónicas definidas por Martin y Thornton (Martin et al., arriba). Los residuos de FR están marcados en negrita.

35 La **FIGURA 5** muestra las secuencias de aminoácidos de las diversas versiones de la región V_K de BAT-1 humanizado que se proponen (SEC ID N°. 15-18). Si los residuos de la región V_K de BAT-1 y la secuencia de la región V_K de TEL9 humano coinciden se muestra un punto [.]. Si no está presente aminoácido en una posición de residuo específica se muestra un guión [-]. Si se cambia un aminoácido en las FR de TEL9 en la región V_K de BAT-1 humanizado, se marca en negrita. Las CDR se describen por el uso de la nomenclatura [==L1==]. La numeración usada es según Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1991).

40 La **FIGURA 6** presenta las secuencias de aminoácidos de las diversas versiones de la región V_H de BAT-1 humanizado que se proponen (SEC ID N°. 20-24). Si los residuos de la región V_H de BAT-1 y la secuencia de la región V_H de h5ghv1295 humano coinciden se muestra un punto [.]. Si no está presente aminoácido en una posición de residuo específica se muestra un guión [-]. Si se cambia un aminoácido en las FR de h5ghv1295 en la región V_H de BAT-1 humanizado, se marca en negrita. Las CDR se describen por el uso de la nomenclatura [==H1==], mientras que [-----] indica parte del bucle estructural H1. La numeración usada es según Kabat (Kabat et al., arriba).

45 La **FIGURA 7** muestra las secuencias de ADN (SEC ID N°. 87) y de péptidos (SEC ID N°. 15) de la versión A ($BATR_{K_A}$) de la región variable de la cadena ligera kappa humana remodelada del anticuerpo BAT-1 humanizado.

50 La **FIGURA 8** muestra las secuencias de ADN (SEC ID N°. 88) y de péptidos (SEC ID N°. 16) de la versión B ($BATR_{K_B}$) de la región variable de la cadena ligera kappa humana remodelada del anticuerpo BAT-1 humanizado.

La **FIGURA 9** presenta secuencias de ADN (SEC ID N°. 89) y de péptidos (SEC ID N°. 18) de la versión D ($BATR_{K_D}$) de la región variable de la cadena ligera kappa humana remodelada del anticuerpo BAT-1 humanizado.

La **FIGURA 10** es una representación en diagrama de la construcción de vector pKN110-BATR_{KD}.

55 La **FIGURA 11** es una representación en diagrama del casete de la cadena ligera de BAT-1 insertado en vectores de expresión de la cadena ligera de BAT-1.

Las **FIGURAS 12-14** no forman parte de la presente invención.

La **FIGURA 15** es una representación en diagrama de la construcción de vector pG1D110.BAT-1.RH_C.

60 La **FIGURA 16** es una representación en diagrama del casete de la cadena pesada de BAT-1 insertado en vectores de expresión de la cadena pesada de BAT-1.

La **FIGURA 17** es una representación en diagrama del vector de expresión de mamífero de la cadena pesada de la inmunoglobulina gamma-1 pG1D200.

La **FIGURA 18** es una representación en diagrama del vector de expresión individual pG1KD210.BAT-1.RHC/RKD (SEC ID N°. 93).

65 La **FIGURA 19** es una representación en diagrama del casete de las cadenas pesadas y ligeras de $BATR_{K_D}/BATR_{H_C}$ insertado en un vector de expresión individual para la expresión del anticuerpo BAT-1

completo.

La **FIGURA 20** muestra un ELISA de células de Daudi de la variante BATH_B/BATR_{K_B} humanizada contra el anticuerpo BAT-1 quimérico.

La **FIGURA 21** muestra un ELISA de células de Daudi de las variantes BATH_B/BATR_{K_A} y BATH_A/BATR_{K_A} humanizadas contra el anticuerpo BAT-1 quimérico.

La **FIGURA 22** muestra un ELISA de células de Daudi de las variantes BATH_C/BATR_{K_B} y BATH_C/BATR_{K_D} humanizadas contra el anticuerpo BAT-1 quimérico.

La **FIGURA 23** muestra un ELISA de células de Daudi de la variante BATH_B/BATR_{K_D} humanizada contra el anticuerpo BAT-1 quimérico.

La **FIGURA 24** presenta curvas de unión de dependencia de la dosis para células de Daudi del mAb BAT-1 murino y el mAb BATH_C/BATR_{K_D} γ 1 humanizado.

La **FIGURA 25** ilustra la actividad antimetastásica dependiente de la dosis del mAb BATH_C/BATR_{K_D} γ 1 (hBAT) humanizado en tumores de pulmón B16 murinos, con respecto al control (sin tratamiento) y al tratamiento con el mAb BAT-1 murino original. Todos los tratamientos se administraron intravenosamente 14 días después de la inoculación del tumor y los pulmones se examinaron 10 días después del tratamiento.

La **FIGURA 26** representa el efecto inhibitor del mAb BATH_C/BATR_{K_D} γ 1 humanizado sobre el melanoma humano (SK-28) en ratones SCID injertados con linfocitos humanos. El efecto del BAT-1 humanizado sobre el crecimiento tumoral se compara con el control (sin tratamiento) o tratamiento con el mAb BAT-1 murino (mBAT-1).

La **FIGURA 27** demuestra la actividad antimetastásica del mAb BATH_C/BATR_{K_D} γ 1 humanizado en un modelo de tumor murino (HM7) implantado en ratones sin pelo BALB/c.

La **FIGURA 28** muestra la co-localización del mAb BATH_C/BATR_{K_D} γ 1 humanizado (hBAT) con CD4 (A) y CD8 (B) determinado por citometría de flujo en linfocitos seleccionados.

La **FIGURA 29** presenta la unión del mAb BATH_C/BATR_{K_D} γ 1 humanizado a marcadores celulares CD19 (A) y CD20 (B) de linfocitos B aislados de un donante normal.

La **FIGURA 30** representa la unión del mAb BAT humanizado a linfocitos T CD4⁺ no activados (día 0, A; día 5, C) y activados (2 días, B; 5 días, D)

La **FIGURA 31** muestra la unión del mAb BAT humanizado a linfocitos T CD69⁺ activados con perlas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 de un modo dependiente de la dosis (sin activación, A; 0,25 μ l, B; 0,5 μ l, C).

La **FIGURA 32** presenta la co-localización del mAb BATH_C/BATR_{K_D} γ 1 humanizado con el marcador de linfocitos T CD25 en un modo dependiente del tiempo: día 0, A; día 2 y día 5 de activación, B y D respectivamente; día 5 de no activación, C.

La **FIGURA 33** muestra la co-localización del mAb BATH_C/BATR_{K_D} γ 1 humanizado con marcador de ligando de CD40 de linfocitos T en un modo dependiente del tiempo: día 0, A; día 1, día 2 y día 5 de activación, B - C y E, respectivamente; día 5 de no activación, D.

La **FIGURA 34** describe el aumento inducido por hBAT en el número de células CD4⁺ viables, aisladas de dos donantes separados (A y B).

La **FIGURA 35** presenta la unión de hBAT a líneas celulares de Daudi (A) y Jurkat (B).

La **FIGURA 36** demuestra la unión de hBAT a PBL de pacientes con cáncer.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Por comodidad, se exponen ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa) y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada. "Fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención puede prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.816.567 de Cabilly et al.).

El término residuos de "región estructural" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento. El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR". Las CDR son principalmente responsables de unirse a un epítipo de un antígeno. El grado de FR y CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat et al., arriba).

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo que comprende una región estructural de un anticuerpo humano y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (normalmente un ratón o rata). Partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana naturales. Y, lo que es más importante, se espera que el anticuerpo humanizado se una al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. Para más detalles véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.225.539 asignada a Medical Research Council, RU.

La expresión “anticuerpo humano” pretende significar un anticuerpo codificado por un gen que en realidad se produce en una variante humana, o un alelo, o mutante de la misma.

Como se usa en el presente documento, el término inmunoglobulina “donante” o “parental” se refiere a la inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR.

Como se usa en el presente documento, el término inmunoglobulina “aceptora” se refiere a la inmunoglobulina humana que proporciona la región estructural.

El término “vector de expresión”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia codificante deseada y secuencias de ácidos nucleicos apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante operativamente ligada en una célula huésped particular. Se contempla que la presente invención engloba vectores de expresión que se integran en genomas de la célula huésped, además de vectores que siguen sin integrarse en el genoma huésped.

El término “células genéticamente modificadas”, como se denomina en el presente documento, se refiere a células que están transfectadas o infectadas por un vector, como se ejemplifica por un virus que codifica un polipéptido de interés, pudiendo dichas células expresar dicho polipéptido. Particularmente en el contexto de la presente invención, las células genéticamente modificadas pueden expresar y secretar el anticuerpo de la invención.

El término “transfección” se refiere a la introducción de ADN en una célula huésped. Se contempla que las secuencias codificantes pueden expresarse en células transfectadas. Numerosos métodos de transfección son conocidos para el experto habitual, por ejemplo, CaPO_4 y electroporación.

El término “efecto antitumoral”, como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, o mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados a la afección cancerosa. También puede manifestarse un “efecto antitumoral” por la capacidad del anticuerpo de la invención en la prevención de la aparición del tumor en primer lugar. Dadas sus propiedades, el anticuerpo de la invención puede usarse tanto en el tratamiento de cáncer agudo, además de en la profilaxis del cáncer.

En el presente documento, el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos adicionales.

El término “reacción en cadena de la polimerasa” (“PCR”) se refiere a los métodos desvelados en las patentes de EE.UU. N° 4.683.195; 4.683.202 y 4.965.188.

II. Modos preferidos para llevar a cabo la invención

a. Preparación de anticuerpos

Con el fin de humanizar el anticuerpo BAT-1, se prepara el material de partida del anticuerpo no humano, concretamente mBAT-1, siguiendo el diseño y la preparación de las variantes humanizadas. Algunos aspectos de la presente invención, que incluyen la selección de un dominio variable de anticuerpo no humano donante, humanizar una secuencia de genes del anticuerpo y producir un anticuerpo humanizado deseado, se describen en las siguientes secciones.

(i) Preparación del anticuerpo no humanizado

El anticuerpo monoclonal BAT-1 murino se describió previamente en la patente de EE.UU. 5.897.862. Por consiguiente, una línea celular de hibridoma representativa que produce anticuerpos BAT-1 murinos monoclonales se depositó en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), Institute Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, 75724, París, Cedex 15, bajo el acceso de depósito N° I-1397, el 28 de enero de 1994.

Alternativamente, el anticuerpo BAT-1 $\gamma 1/k$ quimérico como se produce a partir de BAT-1 murino puede usarse para la preparación de un BAT-1 humanizado. El anticuerpo BAT-1 quimérico y su producción se han descrito en la solicitud PCT N° WO 00/58363.

5 (ii) Estrategia de diseño del anticuerpo humanizado

La presente invención desvela procedimientos para la humanización del anticuerpo BAT-1 mediante un proceso en el que el anticuerpo donante, preferentemente anticuerpo de ratón, se convierte en un anticuerpo tipo humano combinando las CDR del anticuerpo donante con una región estructural humana. En ciertas realizaciones, puede desearse generar variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado, particularmente si éstas mejoran la afinidad de unión u otras propiedades del anticuerpo humanizado. Se describen en detalle los métodos aplicados para seleccionar sitios para la sustitución, inserción o delección, de tanto el anticuerpo BAT-1 donante como el anticuerpo aceptor humano seleccionado, que incluyen la selección de anticuerpos humanos aceptores. El amplio análisis y pautas para la humanización de anticuerpos que se proporcionan en el presente documento más adelante no se desvela en la técnica anterior y es crucial para la preparación de un anticuerpo alterado activo.

El diseño de un anticuerpo humanizado se inicia preferentemente por el análisis de secuencias de las cadenas pesadas y ligeras de la región variable del anticuerpo no humano, también denominadas en lo sucesivo V_H y V_L , respectivamente. Tal análisis incluye una comparación entre la secuencia de aminoácidos de V_L y V_H del anticuerpo no humanizado y otras regiones variables de ratón. En una realización preferida, la comparación puede realizarse adicionalmente con secuencias consenso de los subgrupos en los que las regiones variables se subdividieron en la base de datos de Kabat (Kabat et al., arriba). La clasificación de los diferentes elementos de la región variable facilita la selección de regiones variables de inmunoglobulina que son similares a V_L y V_H del anticuerpo no humanizado de la presente invención y se resuelven estructuralmente.

La selección de la región variable de la cadena ligera kappa humana, también denominada en lo sucesivo V_k , y de V_H que servirían de base de la región variable del anticuerpo humanizado, también denominado un anticuerpo aceptor, se inicia preferentemente clasificando V_L y V_H del anticuerpo no humano según secuencias consenso de inmunoglobulinas humanas. Particularmente, V_L del anticuerpo no humanizado se compara con y, por consiguiente, se clasifica según las secuencias consenso de los cuatro subgrupos de la región variable de la cadena ligera kappa humana como se definen por Kabat (Kabat et al., arriba). Similarmente, V_H del anticuerpo no humanizado se compara y se clasifica según las secuencias consenso de los tres subgrupos de la región variable de la cadena pesada humana.

La selección de V_k y V_H humanas aceptoras avanza preferentemente realizando una comparación entre V_L y V_H del anticuerpo no humano parental de la invención y todos los ejemplos registrados de secuencias individuales de regiones variables humanas públicamente disponibles. Una V_k y V_H humana apropiada se selecciona basándose en la coincidencia más próxima con el anticuerpo no humano parental.

El análisis de las secuencias de los anticuerpos donantes y humanizados y la referencia a modelos moleculares apropiados puede ayudar a distinguir qué residuos podrían estar implicados en la unión al antígeno o mantenimiento de la estructura del anticuerpo apropiada y qué residuos deben eliminarse o sustituirse con el fin de mejorar la estructura del anticuerpo humanizado.

Así, se preparan modelos moleculares de las regiones variables de tanto los anticuerpos no humanos como humanizados para ayudar en el diseño del anticuerpo humanizado. El modelado de estas estructuras se basa en las clasificaciones de elementos de la región variable que se determinaron en el procedimiento de análisis y pueden obtenerse, por ejemplo, usando homología y técnicas desde el principio. Las estructuras cristalográficas de rayos X correspondientes pueden obtenerse de las base de datos de Brookhaven.

Los elementos dentro de la región variable del anticuerpo no humano de la invención, tales como FR, CDR y estructuras de bucle, se modelan en elementos de regiones variables de inmunoglobulina, similares, estructuralmente resueltas. Se identifican choques estéricos en los modelos y, por consiguiente, se seleccionan cadenas laterales desapareadas para la sustitución. Un enfoque particularmente preferido para la conformación estructural incluye la clasificación de los elementos estructurales según clases canónicas basadas en aquellas descritas por Chothia y sus colaboradores (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 arriba; Tramontano et al., arriba). Un enfoque preferido para la predicción de estructura incluye una búsqueda en bases de datos o búsqueda CONGEN (Brucoleri, R.E. et al., Biopolymers 26:137, 1987). Las V_k y V_H humanas seleccionadas que servirían de base del anticuerpo humanizado se modelan similarmente y sus secuencias de aminoácidos se estudian para determinar si es probable que cualquiera de sus residuos influya adversamente en la especificidad de unión.

La minimización de energía se aplica preferentemente después de ajustar los modelos para choques estéricos obvios. La minimización de energía se implementa aquí tanto para aliviar contactos atómicos desfavorables como para optimizar la interacción de van der Waals y electrostática.

65

Como resultado del procedimiento de diseño anterior, las variantes del anticuerpo humanizado de BAT-1 pueden comprender residuos de aminoácidos adicionales, o conservativos sustituidos, que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. También puede aplicarse la delección de residuos de aminoácidos incluidos en los anticuerpos aceptores u originales donantes. Estas modificaciones se hacen para refinar el rendimiento de los anticuerpos y sustancialmente no tienen efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Los sitios de mayor interés para las modificaciones incluyen los bucles hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Los residuos de la región hipervariable o residuos de FR implicados en la unión al antígeno generalmente están sustituidos de una forma relativamente conservativa. Las sustituciones conservativas que pueden aplicarse en la presente invención comprenden las siguientes opciones: Val, Ile; Ser, Thr; Lys, Arg; Phe, Tyr; Trp, Leu; Asp, Ser; Cys, Thr; Gln, Lys; Val, Ala; Asn, Ser; Thr, Asn.

(iii) Construcción de variantes de anticuerpos humanizados

Generalmente, las variantes del anticuerpo BAT-1 se preparan convencionalmente en cultivo celular recombinante, como se describe en más detalle más adelante. Se prefiere la síntesis recombinante aquí, pero se conoce preparar péptidos por síntesis química o purificarlos a partir de fuentes naturales.

Los expertos en la materia conocen técnicas de biología molecular y protocolos de injerto de CDR adecuados para llevar a cabo la invención como se describe en el presente documento. En numerosos manuales y publicaciones primarias, que incluyen, entre otros, Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); Ausubel et al., (Protocols In Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York 1987, 1988, 1989); patentes de EE.UU. n° 5.225.539 y 5.585.089, se describen enseñanzas adecuadas.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera y pesada de BAT-1 se identifican e ilustran en el presente documento en las FIG. 5 y 6: CDR_{L1} (SEC ID N° 9 y SEC L1 en FIG. 5): SARSS VSYMH; CDR_{L2} (SEC ID N° 10 y SEC L2 en FIG. 5): RTSNL AS; CDR_{L3} (SEC ID N° 11 y SEC L3 en FIG. 5): QQRSS FPLT; CDR_{H1} (SEC ID N° 12 y SEC H1 en FIG.6): NYGMN; CDR_{H2} (SEC ID N° 13 y SEC H2 en FIG. 6): WINTD SGEST YAEFF KG; CDR_{H3} (SEC ID N° 14 y SEC H3 en FIG. 6): VGYDA LDY.

Usando estas secuencias de aminoácidos, los oligonucleótidos que codifican estas CDR pueden sintetizarse para su uso en la presente invención. Por tanto, los oligonucleótidos pueden contener nucleótidos, además de aquellos de CDR de BAT-1, para, por ejemplo, facilitar la clonación o para introducir sitios de restricción. Técnicas de síntesis de oligonucleótidos adecuadas para este aspecto de la invención son muy conocidas para el experto y pueden llevarse a cabo usando cualquiera de varios sintetizadores automatizados comercialmente disponibles. Además, los ADN que codifican las CDR expuestas en el presente documento pueden obtenerse mediante los servicios de proveedores de síntesis de ADN comercial. Así, no es necesario reclonar CDR de BAT-1 de una fuente natural.

Las CDR de mBAT-1 se injertan en un anticuerpo humano para producir las variantes de BAT-1 humanizado. Se entenderá que anticuerpo humano en este contexto se refiere a cualquier anticuerpo que se produzca en un anticuerpo humano o manipulado que se ha diseñado, en algún respecto, para ser compatible con el sistema inmunitario humano. Particularmente preferidos para este fin son los anticuerpos que, ampliamente, no generan una respuesta inmunitaria adversa en un paciente.

Para construir anticuerpos BAT-1 humanizados con CDR injertadas, los oligonucleótidos que codifican las CDR de BAT-1 pueden integrarse en otros ADN que codifican cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y fragmentos del mismo, usando técnicas recombinantes muy conocidas tales como aquellas descritas en las referencias anteriores. Particularmente, las CDR de BAT-1 pueden introducirse en prácticamente cualquier conjunto de FR según la presente invención. Está disponible una variedad de genes de anticuerpos humanos en forma de depósitos públicamente accesibles y pueden sintetizarse genes de anticuerpos adecuados a partir de estas secuencias de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Técnicas preferidas empleadas a este respecto, para clonar y manipular polinucleótidos, se ilustran por los métodos y ejemplos expuestos.

Las secuencias de aminoácidos de mBAT-1 y FR de la cadena ligera (FIG. 5) y pesada (FIG. 6) de BAT-1 remodelado y FR modificadas se identifican en el presente documento: FR_{L1} (SEC ID N° 1): EIVLT QSPSS LSASV GDRVT ITC; FR_{L2} (SEC ID N° 2): WXaaQQK PGKAP KLXbbI Y, en la que Xaa = F, Y y Xbb = W, L; FR_{L3} (SEC ID N° 3): GVPSR FSGSG SGT XaaXbb XccLTIN SLQPE DFATY YC, en la que Xaa = D, S; Xbb = Y, F y Xcc = C, T; FR_{L4} (SEC ID N° 4): FGGGT KLEIK; FR_{H1} (SEC ID N° 5): QXaaQLV QSGSE LKKPG ASVKI SCKAS GYXbbFXcc, en la que Xaa = I, V; Xbb = T, S; Xcc = T, S; FR_{H2} (SEC ID N° 6): WVXaaQA PGQGL XbbWMG, en la que Xaa = R,K; Xbb = Q, K; FR_{H3} (SEC ID N° 7): RFXaaFS LDTSV XbbTAIL QITSL XccAEDT GMYFC XddXee, en la que Xaa = V, A; Xbb = N, S; Xcc = T, N; Xdd = V, A; Xee = R, K; FR_{H4} (SEC ID N° 8): WGQGT LVTVS S.

Pueden usarse oligonucleótidos que codifican las CDR de BAT-1 y/o residuos de FR específicos originados a partir de anticuerpos humanos para introducir codones en el ADN que codifica V_k o V_H de las variantes de BAT-1 humanizado. Según este aspecto de la invención, los codones adicionales pueden incluir aquellos no derivados de CDR de BAT-1, además de aquellos que constituyen la CDR. Estas bases adicionales pueden incluirse para facilitar

la unión de la CDR a las FR de una fuente heteróloga. Pueden comprender sitios de restricción o regiones complementarias que se solapan para este fin. Los moldes de ADN normalmente son vectores de ADN monocatenario (ADNmc).

5 Las CDR de las cadenas pesadas y ligeras de BAT-1 también pueden modificarse particularmente después de la incorporación en un anticuerpo humanizado usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas para delecionar, insertar y alterar bases en un ADN o ARN clonado o sintético. Técnicas de mutagénesis específicas de sitio adecuadas para este fin son muy conocidas para aquellos expertos en la materia, y se ilustran en las anteriores referencias sobre técnicas de ADN recombinante. Estos métodos pueden usarse para introducir prácticamente cualquier alteración deseada en polinucleótidos que codifican las CDR de BAT-1 o en otras regiones de un gen de la cadena pesada o ligera cerrada.

15 La síntesis de ADN bicatenarios más largos a partir de ADN monocatenarios más cortos que se solapan, es muy conocida para los expertos en la materia. Asimismo, es muy conocida la unión extremo a extremo de ADN, que incluye ADN de extremos romos y aquellos con extremos complementarios que se solapan al menos parcialmente. Estas técnicas se ilustran en las anteriores referencias, por ejemplo, sobre técnicas de ADN recombinante.

20 La construcción de todas las versiones de la región variable de BAT-1 humano se lleva a cabo preferentemente como se describe por Stemmer (Stemmer et al., GENE 164:49, 1995). Esencialmente, este método se vio favorecido por la síntesis de secuencias de ADN largo a partir de grandes números de oligodesoxirribonucleótidos (oligos). El método se basa en ADN polimerasa usando técnica de PCR convencional, para construir fragmentos de ADN cada vez mayores durante el proceso de ensamblaje. Una vez se sintetiza el nuevo gen de la región variable, se subclona preferencialmente en un vector que se transforma en células competentes como se ha descrito en las referencias anteriores. Pueden identificarse clones positivos putativos por cribado por PCR usando cebadores apropiados y/o por digestión con restricción. Clones individuales seleccionados de los clones positivos confirmados pueden secuenciarse en ADN bicatenario (ADNbc). Preferentemente, los ADNbc resultantes pueden volver a comprobarse para errores inducidos por PCR, por secuenciación, y corregirse subclonando fragmentos correctos de otros clones.

30 El ADN de clones seleccionados, del clon positivo confirmado, que contiene V_k o V_H humanizadas de la variante de BAT-1 puede insertarse directamente en vectores de expresión que comprenden regiones constantes ligeras y pesadas humanas, respectivamente. Una vez se ha ensamblado el ADN que codifica la variante de anticuerpo completa con CDR injertadas de BAT-1 humanizado, o las regiones de la cadena ligera o pesada del anticuerpo BAT-1 humanizado con CDR injertadas, puede insertarse en un vector para la propagación y expresión por técnicas convencionales. De este modo pueden obtenerse cantidades deseadas del anticuerpo.

35 (iv) Expresión de variantes del anticuerpo BAT-1 humanizado

La invención también proporciona secuencias de polinucleótidos aisladas que codifican el anticuerpo BAT-1 humanizado completo, la cadena ligera completa o región variable, cadena pesada completa o secuencia de la región variable, además de vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico codificante.

45 Para la producción recombinante del anticuerpo BAT-1, la secuencia de polinucleótidos que codifica dicho anticuerpo, o sus fragmentos, se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional, amplificación o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores que generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

50 Para la expresión, el polinucleótido que codifica el anticuerpo BAT-1 humanizado, o fragmentos del mismo, puede clonarse en un vector de expresión. Tales vectores son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Una secuencia de control de la expresión, tal como una inmunoglobulina o promotor viral, se introduce en la dirección 5' del polinucleótido. Marcadores de selección tales como el gen *dhfr*, u otro marcador de selección adecuado muy conocido para aquellos expertos en la materia, están incluidos en el vector para permitir la selección de células huésped que están expresando dicho polinucleótido incluido en el vector.

60 La célula huésped puede producir endógenamente anticuerpos, mientras que en una alternativa, la célula se modifica genéticamente para producir anticuerpos. Ejemplos de células que producen endógenamente anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, hibridomas, linfomas, plasmacitomas y células transformadas en VEB. Una célula puede modificarse genéticamente para producir anticuerpos por métodos convencionales, tales como por transfección con un vector que codifica una molécula de anticuerpo.

65 En uso, el vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el anticuerpo BAT-1 humanizado, o fragmentos del mismo, se transfecta en células. Los métodos de transfección son muy conocidos en la técnica y tales métodos son adecuados para empleo en la presente invención. Las células que expresan el vector de expresión se seleccionan usando el marcador de selección incorporado en el vector de expresión o un vector usado

para la co-transfección. Las células que expresan el anticuerpo pueden cribarse por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otros métodos adecuados muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

5 Las variantes del anticuerpo BAT-1 humanizado se introducen en una célula huésped por transfección de un vector que comprende polinucleótido que codifica el fragmento completo o Fv del anticuerpo. Las variantes del anticuerpo BAT-1 humanizado también se introducen en células huésped por co-transfección de: (i) un vector que comprende polinucleótido que codifica la región variable o completa de la cadena ligera del anticuerpo y (ii) un vector que comprende polinucleótido que codifica la región variable o completa de la cadena pesada del anticuerpo.

10 El anticuerpo de la invención puede producirse por una transfección de un único vector que comprende secuencias de polinucleótidos que codifican las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo. Este vector puede comprender además dos promotores, cada uno operativamente ligado a la secuencia de polinucleótidos que codifica las regiones de la cadena ligera y de la cadena pesada de BAT-1 remodelado. La expresión resultante del anticuerpo BAT-1 es superior a su expresión tras la co-transfección con dos vectores, que codifica cada uno las regiones de la cadena ligera o de la cadena pesada, del anticuerpo, mientras que la transfección y co-transfección se realizan en una célula huésped similar.

15 Las variantes del anticuerpo BAT-1 humanizado pueden expresarse en cualquier tipo de célula adecuado, que incluye, pero no se limita a, células de mamífero, aves, de insecto, bacterianas o de levadura. Ejemplos de células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células humanas, de conejo, de roedor (por ejemplo, ratón, rata) y bovinas. La célula puede ser una célula de mieloma, una célula de ovario de hámster chino (CHO), célula COS, célula COS7 o fibroblasto.

20 Pueden cultivarse líneas celulares productoras de anticuerpo usando técnicas muy conocidas para el experto. Tales técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. Por ejemplo, técnicas adecuadas para su uso en la invención como se describe más adelante se describen en Current Protocols in Immunology, Coligan et al., (Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, N.Y. 1991).

25 Los anticuerpos monoclonales humanizados de la invención pueden congelarse o liofilizarse para el almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de uso. Se ha mostrado que esta técnica es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la materia. Se apreciará por aquellos expertos en la materia que la liofilización y reconstitución puede conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse para compensarse.

30 (v) Purificación del anticuerpo BAT-1 humanizado

35 Usando técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se elimina el residuo en partículas, tanto células huésped como fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al. (Biotechnology 10:163, 1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela pasta de células en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares pueden eliminarse por centrifugación.

40 El anticuerpo de la invención puede secretarse en el medio, sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran generalmente primero usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore. Puede incluirse un inhibidor de la proteasa en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

45 La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía en hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad particularmente con proteína A una técnica de purificación preferida. La matriz a la que el ligando de afinidad está unida es casi siempre agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo a recuperar.

50

55

60

65

(vi) Depósito de línea celular

Los anticuerpos monoclonales BAT humanizados pueden ser idénticos en su función o actividad a aquellos producidos por células depositadas bajo ATCC n° (PTA-5189), el 9 de mayo de 2003.

III. Farmacología

(i) Composiciones farmacéuticas

La invención también proporciona una composición que comprende el anticuerpo de la invención.

Según otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo el anticuerpo de la invención. Dichas composiciones pueden estar en cualquier forma farmacéutica adecuada para administración a un paciente, que incluye, pero no se limitan a, disoluciones, suspensiones, polvos liofilizados para reconstitución con un vehículo adecuado o dilución antes de uso, cápsulas y comprimidos. Las composiciones farmacéuticas desveladas en la presente invención pueden comprender además cualquier diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar un conjugado fisiológicamente aceptable que comprende los anticuerpos con agentes terapéuticos para diagnóstico, pronóstico y terapia, entre otros.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse por procesos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, molienda, pulverización, preparación de comprimidos recubiertos de azúcar, trituración, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención pueden así formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para inyección, los compuestos de la invención pueden formularse en disoluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que va a atravesarse. Tales penetrantes, por ejemplo polietilenglicol, son generalmente conocidos en la técnica. Composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras.

Para administración por inhalación, las moléculas para su uso según la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de spray en aerosol de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla en polvo del polipéptido y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los principios activos en forma soluble acuosa. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones para inyección acuosas apropiadas. Vehículos naturales o sintéticos adecuados son muy conocidos en la técnica. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados, que aumentan la solubilidad de los compuestos, para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. Todas las formulaciones para administración deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida. Más específicamente, una dosis "terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad del sujeto que está tratándose. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está perfectamente dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones descritas en el presente documento puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la CI_{50} (la concentración que proporciona el 50 % de inhibición) y la dosis tolerada máxima para un compuesto objeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en el ser humano. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden elegirse por el médico individual en vista de la afección del paciente.

Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección que va a tratarse, la dosificación también puede ser una administración única de una composición de liberación lenta, durante el ciclo de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que la cura se efectúe o se logre la disminución del estado de enfermedad. La cantidad de una composición que va a administrarse dependerá, por supuesto, del sujeto que está tratándose, la gravedad de la afección, el modo de administración, el criterio del médico que receta, y todos los otros factores relevantes.

(ii) Aspectos terapéuticos

Se ha encontrado que un anticuerpo monoclonal según la invención provoca efectos antitumorales en una variedad de tumores. Dentro del alcance de la presente invención, el novedoso hBAT-1 puede usarse en el tratamiento de tumor. Debe entenderse que el término "cantidad eficaz" significa una cantidad de un anticuerpo requerida para lograr un efecto terapéutico. La cantidad eficaz requerida para lograr el resultado final terapéutico puede depender de varios factores que incluyen, por ejemplo, el tipo de tumor y la gravedad de la afección del paciente (es decir, el estado canceroso), y si el anticuerpo se co-administra junto con otro agente que actúa junto con el anticuerpo en una manera aditiva o sinérgica. El anticuerpo puede administrarse o bien tras la detección de tumores primarios o secundarios en el sujeto, o bien como terapia preventiva de un sujeto que tiene un alto riesgo de desarrollar cánceres, tal como un individuo expuesto a radiación o aquel que tiene una predisposición genética.

La administración de dichas composiciones puede lograrse normalmente por medio de administración parenteral, por ejemplo, intravenosamente (i.v.), intraperitonealmente (i.p.) o intramuscularmente (i.m.). Los métodos de tratamiento pueden comprender composiciones farmacéuticas de los anticuerpos según la invención. Alternativamente o adicionalmente, los métodos de tratamiento pueden incluir terapia celular, *ex vivo* o *in vivo*, en la que las células son autólogas o alogenas.

Con el fin de reforzar la actividad antitumoral del anticuerpo, es a veces ventajoso administrar el anticuerpo de la invención junto con, antes de, o tras, la administración de otros agentes, que pueden actuar en modo aditivo o sinérgico con él. Ejemplos comprenden diversas citocinas, que incluyen, pero no se limitan a, IL-1 (interleucina-1), IL-2, IL-6 y IFN- α (interferón- α), además de vacunas de células o anticuerpos adicionales que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos estimulantes de linfocitos T, o anticuerpos terapéuticos antitumorales.

El anticuerpo de la invención puede ser útil en la terapia de una variedad de enfermedades distintas de cáncer en las que la activación u otros efectos del anticuerpo sobre la actividad proliferativa, citolítica o estimulante del sistema inmunitario puede tener un efecto terapéutico, tal como, por ejemplo, en fases tempranas de la infección por el VIH o en pacientes cuyo hemograma muestre una disminución en linfocitos T CD4+ (el virus causante del SIDA, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida), en diversos trastornos autoinmunitarios, o en algunos casos de inmunodeficiencias genéticas o adquiridas. En pacientes con SIDA, el anticuerpo puede administrarse a individuos infectados, pero que todavía no han desarrollado ningún síntoma de la enfermedad, o en individuos en fases tempranas del proceso de infección por el VIH.

La dosis del anticuerpo o composición que va a administrarse a un sujeto debe ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica beneficiosa en el sujeto con el tiempo, o para inhibir el crecimiento tumoral. Así, el anticuerpo o composición puede administrarse a un sujeto en una cantidad suficiente para aliviar, reducir, curar o al menos detener parcialmente la enfermedad.

La dosis se determinará por la actividad de la composición terapéutica producida y la afección del sujeto, además del peso corporal o área superficial del sujeto que va a tratarse. El tamaño de la dosis y la pauta de dosificación también se determinarán por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de una composición terapéutica particular en un sujeto particular. En la determinación de la cantidad eficaz de la composición terapéutica que va a administrarse, el médico necesita evaluar los niveles de plasma en circulación, toxicidad y progresión de la enfermedad.

Habiendo ahora descrito generalmente la invención, lo mismo será más fácilmente entendido mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis de secuencias de la región variable de la cadena ligera kappa (V_k) de BAT-1 de ratón

Las secuencias de ADN y de aminoácidos de la región V_k de BAT-1 se muestran en la FIG. 1. Se compararon las secuencias de aminoácidos con otras regiones variables de ratón y también con las secuencias consenso de los subgrupos en las que las regiones variables se subdividieron en la base de datos de Kabat (Kabat et al., arriba). A partir de este análisis, se encontró que la región V_k de BAT-1 coincidía más estrechamente con las secuencias consenso de tanto el subgrupo IV de kappa de ratón (identidad = 88,38 %; similitud = 92,45) y el subgrupo VI de

kappa de ratón (identidad = 87,74 %; similitud = 89,62). Cuando solo las FR de la región variable de la cadena ligera kappa de BAT-1 (es decir, sin los aminoácidos en las CDR) se compararon con los subgrupos IV y VI de ratón, el porcentaje de identidad aumentó a exactamente el 90,00 % para ambas, mientras que el porcentaje de similitud ascendió al 92,50 %, de nuevo para ambas secuencias consenso. Sin embargo, a pesar de las estrechas similitudes con ambos subgrupos de Kabat, se decidió que la región Vk de BAT-1 murina debía clasificarse como el subgrupo VI de ratón.

El motivo para la selección del subgrupo VI de ratón se relacionó con las clases canónicas de los bucles hipervariables de la región Vk de BAT-1, como se define por Chothia y sus colaboradores (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901, 1987; Nature 34:877, 1989; J. Mol. Biol. 227:799, 1992; Tramontano et al., arriba). Según Chothia, cada una de las CDR: CDR1 (L1), CDR2 (L2) y CDR3 (L3), fueron la clase 1 canónica (FIG. 2). Crucialmente, el bucle hipervariable L1 de la clase 1 canónica de 10 aminoácidos solo se observó en regiones Vk de ratón que se ajustaron al subgrupo VI de Kabat.

Las clases canónicas más restrictivas para las estructuras de bucles relacionados con CDR han sido definidas más recientemente por Martin y Thornton (Martin et al, arriba) y éstas también se describen en la FIG. 2. La utilidad de estas nuevas definiciones de clase canónica se basa en su rigurosidad, que a su vez está relacionada con la presencia de un mayor número de los denominados residuos canónicos de la región estructural en cada clase. La importancia de estos residuos "adicionales", posiblemente clave, se consideró después cuando se diseñó el anticuerpo BAT-1 humanizado. Los bucles L1 y L2 se asignaron fácilmente a clases canónicas de Martin 1/10A y 1/7A, respectivamente, sin embargo, el bucle L3 no coincidió perfectamente con ninguna de las clases disponibles para él. La clase que coincidía más estrechamente era la clase 1/9A, sin embargo, para ajustarse a esta clase el residuo tenía que estar en la posición 28 en la región Vk de BAT-1, que en realidad no está presente. El gen de la línea germinal de la región variable de la cadena ligera kappa más próxima de ratón para Vk de BAT-1 era H4, que también contuvo un bucle L1 de 10 aminoácidos (Tabla 1). Solo se encontraron 12 desapareamientos entre la secuencia de la línea germinal H4 y la región Vk de BAT-1. La mayoría de estos desapareamientos se posicionaron en las CDR con solo cuatro diferencias localizadas en las FR. La mayoría de estos desapareamientos fueron cambios altamente conservativos, excepto por la cisteína en la posición 72 (numeración de Kabat) en FR3. Su localización inmediatamente adyacente a un residuo canónico importante (posición 71) sugirió que la cisteína podía tener una función clave en la unión al antígeno. Sin embargo, tomados conjuntamente, el ejemplo anterior sugirió claramente que la secuencia de BAT-1 era típica de una región Vk variable de ratón.

TABLA 1

Nombre de sec.	¹ Id. Res.	² Residuos 1 – 50 de Vk de BAT murino frente a Vk de la línea germinal de ratón
5	BAT 106	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSARS-----SVSYMHWQKPGTSPKL
	H4 83S...S.....Y.Y....S...
	H3/Ox 83M...S.....Y...S....
	1	
10	R9 83M...S.....I....Y.....
	H13 81L.....M...S.....Y.Y...RS...
	H8 81L.....M...S.....X.....S...
	H1 81M...S.....V.S..LY.Y....S...
	H9 81	..L.....M...S.....Y.....S...
15	R2 76	E.L.....IA.....S.....N.Y....S...
	T3B 75	---.....A..L.....M...S.S....V.S..L..Y...S....
	R11 74	EN.....A.....M...S.S....V.S.NL..Y...S...T.
	H6/X2 74	E.....TA..L.Q.....S.....Y...S....
	4	
20	L8 74	EN.....A..L....M...S.S....V.S..L..Y...S.....
	R1/s1 72	EN.....A..L.Q...M...S.S....V.S..L..Y...S.A...
	07b	
25	R13 72	EN.....L....MS.R.S.....N..Y.Y...SDA...
	H2 67	G.....TT.T.F...N.....S.....IN.I..Y...S.NT..

Nombre de sec.	¹ Id. Res.	² Residuos 51 – 99 de Vk de BAT murino frente a Vk de la línea germinal de ratón
30	BAT 106	WIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYCLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFP
	H4 83	P.....S...S.....YH.Y.
	H3/Ox 83	R...D..K.....S...S.....W..N.
	1	
35	R9 83	R...D..K.....S...S.....H...Y.
	H13 81	P...L.....S...S.....W..N.
	H8 81	...SI.....S...SVK.....W..S.
40	H1 81	...S.....S...S.....F...Y.QY.
	H9 81	P...D.....F.....S.I.S.....H...Y.
	R2 76	I...GI.....FSF..NS....V.....Y.
	T3B 75	P...G.....V.....S...S.....W..Y.
	R11 74	F.....E..P.....S...SV.....W.GY.
45	H6/X2 74	P...EI.K.....S...S.....I.....WNYPL
	4	
	L8 74	...G.....A.I..S...S...ND.....W.GY.
	R1/s1 72	PL.H.....S...SV...D.....W.GY.
	07b	
50	R13 72	...Y...P.....N..S...S..G.....FT.S.
	H2 67	QX..K..D.P...TL.....S...SV.....W.GY.

¹Nº de residuos idénticos a la secuencia de BAT

²Un punto [.] se refiere a una coincidencia entre Vk de BAT y Vk de la línea germinal de ratón y una línea [-] se refiere a la ausencia de aminoácido

Ejemplo 2

Análisis de secuencias de la región variable de la cadena pesada de BAT-1 de ratón

Las secuencias de ADN y de aminoácidos de la región V_H de BAT-1 se muestran en la FIG. 3. Se realizó un análisis similar al dado en el Ejemplo 1 para la región V_H de BAT-1, que se determinó que presentó el apareamiento más próximo a la secuencia consenso de los diversos subgrupos de la cadena pesada de ratón en la base de datos de Kabat (Kabat et al., arriba). La identidad entre la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena

5 pesada de ratón de mBAT-1 y las secuencias consenso de los diversos subgrupos se midió al 60,64 %, mientras que se calculó que la similitud era del 69,23 %, siendo las siguientes secuencias consenso del subgrupo de Kabat más próximas el subgrupo IIa (identidad = 59,83 %; similitud = 66,67 %). Sin embargo, cuando solo las FR de la región V_H de BAT-1 se compararon con el subgrupo IIa de ratón, el porcentaje de identidad disminuyó al 54,02 % mientras que la similitud cayó al 62,06 %. En cambio, las mismas comparaciones llevadas a cabo contra los diversos subgrupos de ratón encontraron que las FR de la región V_H de BAT-1 presentaron el 65,52 % de identidad y el 74,71 % de similitud.

10 Cuando se analizaron las clases canónicas de los bucles hipervariables de la región V_H de BAT-1, como se define por Chothia y sus colaboradores (FIG. 4), los bucles CDR1 y CDR2 (H1) coincidieron con los bucles de la clase 1 canónica de Chothia. Sin embargo, no se asignó clase a la estructura de bucle CDR3 (H3) debido al amplio intervalo de tamaño y la constitución de aminoácidos que los bucles H3 pueden mostrar.

15 Usando las clases canónicas más rigurosas para las estructuras de bucle de CDR definidas por Martin y Thornton (Martin et al., arriba), fue una cuestión directa determinar que el bucle H1 coincidió con la clase canónica de Martin 1/10A. Sin embargo, para el bucle H2 fue más difícil asignar la clase, aunque la clase canónica de Martin más próxima fue la clase 2/10A. Desafortunadamente, como el aminoácido Asp53 en el bucle H2 no coincidió con los residuos esperados para esta posición (es decir, Ala, Gly, Tyr, Ser, Lys, Thr o Asn), el apareamiento tampoco fue perfecto.

20 El gen de la línea germinal de la región variable de la cadena pesada de ratón más próximo para V_H de mBAT-1 se identificó como VMS2/VGK4 (Tabla 2). Así, el ejemplo anterior sugirió claramente que la secuencia de mBAT-1 fue típica de una región variable V_H de ratón.

TABLA 2

Nombre de sec./ ¹ Id. Res.	² Residuos 1 – 50 de V _H de BAT murino frente a V _H de la línea germinal de ratón
BAT / 117	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF ¹ TNYGMN–WVKQAPGKGLKWMG
VMS2/VGK4 / 92
VMS9/VGK1A / 251 / 90
VGK6 / 89
VFM11/VGK1 B / 89
264 / 88T...S.....
VFM1/281/VG K7 / 87D.S.H.....
VMS1/141/VG K3 / 84A.H.....
161 / 84
45 VGK5 / 79	---.....TA..Q.....QKM.....I.
VGK2 / 77	---.....R.....TA..Q.....QKM.....I.
V104A/VAR10 4A / 57	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XM..Q..E.I.
50 VH105 / 57	.V..Q.....V..AS.....S.YIH.....R..Q..E.I.
VAR104 / 56	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XR.AQ..E.I.
J558-43y / 56	.V..Q.....V..AS.R.....S.NIH.....R..Q..E.I.
J558-122B / 55	.V..Q.....VR..TS.....IT.W.....XR..Q.XE.I.
55 37A11 / 55	.V..L..A..M..AS.....T...SS.WIE.....R..H..E.I.
VH104A / 55	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XM..Q..E.I.
VAR100 / 54	.V..Q.....VR..LS..L.....I.IT.W.....R..Q..E.I.
Nombre de sec./ ¹ Id. Res.	² Residuos 51 – 101 de V _H de BAT murino frente a V _H de la línea germinal de ratón
BAT / 117	WINTDSG--ESTYAEFEKGRFAFSLETSANTAYLQINNLNEDTATYFCVR
VMS2/VGK4 / 92NT....P.....S.....K.....A.

	VMS9/VGK1A/YT....P...DD.....S.....K.....A.
	251 / 90	
5	VGK6 / 89ET....P...DD.....S.....K.....--
	VFM11/VGK1YT....P...DD.....S.....K...M....A.
	B / 89	
	264 / 88Y....VP...DD.....S.....K.....A.
10	VFM1/281/VGET....P...DD.....S.....K.....A.
	K7 / 87	
	VMS1/141/VG	.KY.NT....P..GDD.....S.....K...M....A.
	K3 / 84	
15	161 / 84YT....P...DD.....C.S.....K.Q.....----
	VGK5 / 79H....VPK...D.....S.....K...M....--
	VGK2 / 77H....VPK...D.....S.....S..K.....--
	V104A/VAR10	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS..M.LSS.TS..S.V...A.
	4A / 57	
20	VH105 / 57	Y.YPRD...STN.N.K...KATLTAD..SS..M.LSS.TS..S.V...A.
	VAR104 / 56	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS..M.LSS.TS..S.V...A.
	J558-43y / 56	.YPGD...NTK.N.K...KTTLTADK.SS..M.LSS.TS..S.V...A.
	J558-122B / 55	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS..M.LSS.TS..S.VH..A.
25	37A11 / 55	K.LPG....STN.N.K...KAK.TADI.S...M.LSS.TS..S.V.Y.A.
	VH104A / 55	A.FPAG...STN.NQM...KATLTVD..SS..M.LSS.TS..S.V...A.
	VAR100 / 54	Q.FPA....STN.N.M.E.KATLTVD..SS..M.LSS.TS..S.V.Y.A.

¹Nº de residuos idénticos a la secuencia de BAT

²Un punto [-] se refiere a una coincidencia entre V_H de BAT y V_H de la línea germinal de ratón y una línea [-] se refiere a la ausencia de aminoácido

Ejemplo 3

Diseño de variantes del anticuerpo V_K de BAT-1 humanizado

La primera etapa en el diseño de las regiones variables del anticuerpo BAT-1 humanizado fue la selección de la región variable de la cadena ligera kappa humana que serviría de base de la región V_K de BAT-1 humanizado. Como una ayuda para este proceso, la región V_K de BAT-1 se comparó inicialmente con las secuencias consenso de los cuatro subgrupos de la región variable de la cadena ligera kappa humana como se define por Kabat y sus colaboradores (Kabat et al., arriba).

La región variable de BAT-1 de ratón de la cadena ligera fue la más similar a las secuencias consenso del subgrupo I de la cadena ligera kappa humana y el subgrupo III de la cadena ligera kappa humana. En el caso del subgrupo I de la cadena ligera kappa humana, la región V_K de BAT-1 de ratón mostró un 63,21 % de identidad con respecto a la región variable completa y un 70,00 % de identidad dentro de las FR solas. Cuando se midió con respecto a la similitud, estos valores aumentaron al 71,70 % del global y al 80,00 % dentro de las FR solas. En el caso del subgrupo III de la cadena ligera kappa humana, la región V_K de BAT-1 de ratón mostró un 65,09 % de identidad con respecto a la región variable completa y un 68,75 % de identidad dentro de las FR solas. Cuando se mide con respecto a la similitud, estos valores aumentaron al 74,53 % del global y al 80,00 % dentro de las FR solas. Por consiguiente, pareció generalmente que coincidía bien con un amplio intervalo de secuencias de la región variable de la cadena ligera kappa humana, sin embargo, con respecto a FR en particular, fue marginalmente más idéntica a aquellas encontradas dentro del subgrupo I de la cadena ligera kappa humana.

La región V_K de BAT-1 de ratón se comparó entonces con todos los ejemplos registrados de secuencias individuales de regiones variables humanas públicamente disponibles. La Tabla 3 muestra las quince mejores coincidencias con la región V_K de BAT-1 de ratón que se identificaron mediante este análisis. En general, el algoritmo de búsqueda seleccionó la región V_K humana del anticuerpo TEL9 (Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581, 1991) como la coincidencia más próxima a la región V_K de BAT-1 de ratón (Tabla 4). Esta secuencia humana tuvo una identidad global con la región V_K de BAT-1 del 67,93 % del global y del 72,50 % dentro de las FR solas. Cuando se midió con respecto a la similitud, estos valores aumentaron al 77,36 % del global y al 82,50 % dentro de las FR solas. Por consiguiente, se seleccionó la FR de la región variable de la cadena ligera kappa de TEL9 como la secuencia aceptora humana para la humanización de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo BAT-1. Esto se convierte entonces en la base de la primera versión humanizada de la cadena ligera kappa de BAT-1 (BATR_{K_A}), que esencialmente comprendió las CDR de la región V_K de BAT-1 y las FR de la región V_K de TEL9.

La siguiente etapa en el proceso de diseño fue estudiar las secuencias de aminoácidos de las FR de la región V_K de TEL9 aceptor humano para determinar si era probable que cualquiera de estos residuos de aminoácidos influyera adversamente en la unión al antígeno, tanto directamente mediante interacciones con antígeno, como indirectamente alterando la conformación u orientación de los bucles de CDR. Esto fue un proceso difícil que solo se hizo posible mediante la disponibilidad de un modelo de las regiones variables de BAT-1, es decir, tanto las regiones V_K como V_H. El procedimiento de modelado se dará en detalle en el Ejemplo 5. Sin embargo, cualquier aminoácido en las FR de BAT-1 de ratón que no pareció que afectara la unión al antígeno se consideró entonces para la conservación en el anticuerpo BAT-1 humanizado. En la decisión de qué residuos murinos conservar se trataron los siguientes puntos:

TABLA 3

Nombre	¹ ID	² V _K de BAT murino frente a la mayoría de los homólogos 15 V _K humana		
		³ SCSCCcccsCcccccscscscccCCscsSSscscSSSSsccccCC		
Residuos		1	2	3
1-36		0123456789012345678901234567	ABCDEF890123456	
		⁴ v v	=====L1=====	v v
BAT 100		-QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSARS-----		SVSYMHWF
TEL9 64.8		_E_....._SSL...V.DR.....R.SQ		_SISN.LN.Y
Viclone47 63.3		D_.M...._SSL...V.DR.....R.SQ		_SIS..LN.Y
SiP055 63.3		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ		_SVS_.LA.Y
039741 63.9		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ		_SVS_.LA.Y
AC32 63.9		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ		_SVS_.LA.Y
AC21B 64.5		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ		_SVS_.LA.Y
B9601(Vg-Jk2) 62.7		E.....TL.L....RA.LS.R.SQ		_SVS_.LA.Y

	LS1 62.4	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS..LA.Y
	TR1.21 63.0	EL.M....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y
5	AC18 63.0	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVSG.LA.Y
	19.E7 63.6	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS..LA.Y
	STRAb SA-1A 63.0	D.QM....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y
	Vlclone49 62.4	D..M....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y
	MP6 62.4	D.QM....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y
10	AC33 63.6	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVG.SLA.Y
<hr/>			
	Residuos	ccccscCsCCCCccscsSCCSccccCCSCCcccccccc	
		4 5 6 7 8	
	37-80	78901234567890123456789012345678901234567890	
15		vvvv==L2=== v v vv v	
	BAT 100	QKPGTSPKLWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYCLTISRMEA	
	TEL9 64.8KA...L..AA.T.Q....S.....DFT...NSLQP	
	Vlclone47 63.3KA...L..AA.S.Q....S.....DFT...SLQP	
20	SiP055 63.3QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
	039741 63.9QA.R.L..DA..K.T.....DFT...SL.P	
	AC32 63.9QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
	AC21B 64.5QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
25	B9601(Vg-Jk2) 62.7QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
	LS1 62.4	..R..QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
	TR1.21 63.0KA...L..AA...Q....S.....DFT...SLQP	
	AC18 63.0QA.R.L..D.F.R.T.I.....DFT...SL.P	
	19.E7 63.6QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
30	STRAb SA-1A 63.0KA...L..AA.S.Q....S.....DFT...SLQP	
	Vlclone49 62.4KA...L..AA.S.Q....S.....DFT...SLQP	
	MP6 62.4KA...L..AA.S.Q....S.....DFT...SLQP	
	AC33 63.6QA.R.LV.D..R.T.I.....DFT...SL.P	
35	Residuos	sccccCCcccc ccccCscccc	
		9 10	
	81-107	123456789012345ABCDEF67890123456A7	
		====L3====v	
40	BAT 100	EDAATYYCQ QRSSFP-----LTFGSGTKLEI-K	
	TEL9 64.8	..F.....TN... ..G.....	
	Vlclone47 63.3	..F.....SY.T.G...V...	
	SiP055 63.3	..F.V.....NW. R...Q.....	
45	039741 63.9	..F.V.....S.KW.G...V...	
	AC32 63.9	..F.V.....NW.PG...V...	
	AC21B 64.5	..F.V.....NW.G...V...	
50	B9601(Vg-Jk2) 62.7	..F.V.....NW.P Y...Q.....	
	LS1 62.4	..F.V.....NW.G...V...	
	TR1.21 63.0	..F.....SY.T. F...G...V...	
	AC18 63.0	..F.V.....Y.W.PG...V...	
	19.E7 63.6	..F.V.....NW.P...VD...	
	STRAb SA-1A 63.0	..F.....SY.T.G...V...	
55	Vlclone49 62.4	..F.....SY.T. R...Q...V...	
	MP6 62.4	..F.....SY.P.PV Y...Q.....	
	AC33 63.6	..F.D.....EW.G...V...	

¹ID – porcentaje de identidad de las secuencias Vk humanas con la región Vk de BAT murina

²Un punto [.] se refiere a una coincidencia entre Vk de BAT y Vk de la línea germinal de ratón, una línea [-] se refiere a la ausencia de aminoácido, los residuos subrayados en las secuencias Vk se diferencian de su gen Vk humano más próximo

³S/C se refiere a aminoácidos posicionados dentro de 5 Å de una CDR de la Superficie o Núcleo de Fv y s/c a aminoácidos posicionados más alejados de 5 Å de una CDR sobre la superficie o núcleo de Fv

⁴v se refiere a residuos de Vernier (Footer *et al.*, J. Mol. Biol. 224:487, 1992) localizados en las FR

65

TABLA 4

	NOMBRE	¹ ID	² Todos	³ Superficie	Núcleo	⁴ CDR de Kabat	⁵ FR	³ Superficie de FR	⁴ Núcleo de FR	⁶ FR cerca de CDR	
5	BATVk	100,0	106	23	81	26	80	17	63	32	
	TEL9	64,8	70	11	59	13	58	10	50	26	
10	V1 clon 47	63,3	69	11	59	13	57	10	50	26	
	SiP055	63,3	69	11	59	13	57	10	50	26	
	039741	63,9	69	11	59	13	57	10	50	26	
	AC32	63,9	69	11	59	13	57	10	50	26	
15	AC21B	64,5	69	11	59	13	57	10	50	26	
	B9601	62,7	69	11	59	13	57	10	50	26	
	(Vg-Jk2)										
	LS1	62,4	68	11	59	13	57	10	50	26	
	TR1,21	63,0	68	11	58	13	57	10	50	26	
20	AC18	63,0	68	11	58	13	57	10	50	26	
	19.E7	63,6	68	11	58	12	57	10	50	26	
	STRAb	63,0	68	11	58	12	57	10	49	26	
	SA-1A										
	VL clon 49	62,4	68	11	58	12	57	10	49	26	
25	MP6	62,4	68	11	58	12	57	10	49	25	
	AC33	63,6	68	11	58	12	57	10	49	25	
	NOMBRE	⁷ Vernier	⁸ Vk	⁸ J	Línea germinal humana próxima	⁹ Tamaño de L1	Tamaño de L2	Tamaño de L3	¹⁰ Clase de L1	Clase de L2	Clase de L3
30	BATVk	14	94	12		10	7	9	?	1/7A	?
	TEL9	12	60	10	DPK8-Vd+	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	?
	V1 clon 47	12	60	10	V3b+	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	1/9A
35	SiP055	12	60	10	3A7	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	1/9A
	039741	12	59	10	3A7						
	AC32	12	59	10	3A7	11	Mismo	10	2/11A	Mismo	?
	AC21B	12	59	10	3A7	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	1/9A
40	B9601	12	59	10	3A7	11	Mismo	10	2/11A	Mismo	?
	(Vg-Jk2)										
	LS1	12	59	10	3A7	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	1/9A
	TR1,21	12	59	10	V3b+	11	Mismo	Mismo	?	Mismo	1/9A
	AC18	12	59	10	3A7	11	Mismo	10	2/11A	Mismo	?
45	19.E7	12	59	10	3A7	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	1/9A
	STRAb	12	59	10	V3b+	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	1/9A
	SA-1A										
	VL clon 49	12	59	10	V3b+	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	1/9A
50	MP6	12	59	10	V3b+	11	Mismo		2/11A	Mismo	?
	AC33	12	59	10	3A7	11	Mismo	Mismo	2/11A	Mismo	1/9A

¹ID - porcentaje de identidad de las secuencias de Vk humanas para la región Vk de BAT murino
²Todos - número de residuos idénticos en el conjunto de la región Vk humana cuando se compara con el conjunto de la región Vk de BAT murino
³Superficie (Superficie de FR) - número de residuos (FR) idénticos sobre la superficie
⁴Núcleo (Núcleo de FR) - número de residuos idénticos dentro del núcleo (FR) del dominio Fv
⁵CDR/FR - número de residuos idénticos dentro de las CDR o las FR;
⁶FR cerca de CDR - representa el número de residuos idénticos entre los aminoácidos de FR dentro de 5Å de una CDR;
⁷Vernier - número de residuos idénticos entre los 14 aminoácidos de Vernier (Foote et al., arriba);
⁸Vk (Cadena J) - número de residuos idénticos dentro del gen Vk (cadena J)
⁹Tamaño de L1 a L3 - número de residuos en cada CDR
¹⁰Clase de L1 a L3 - clase canónica de CDR según Martin & Thornton (Martin et al., arriba)

- a. Fue de gran importancia que las estructuras canónicas para los bucles hipervariables (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 arriba; Tramontano et al., arriba) estuvieran conservadas. Por consiguiente, fue crucial conservar en las regiones variables de BAT-1 humanizado todos los residuos de FR de ratón que fueron parte de estas estructuras canónicas.
- b. Las secuencias de las regiones variables del anticuerpo mBAT-1 se compararon con secuencias similares de otros anticuerpos de ratón para identificar residuos poco usuales o raros - que pueden haber indicado una función importante en la unión al antígeno. Entonces, esto se investigó usando el modelo de los genes de las regiones variables de BAT-1.
- c. También se hizo un análisis directo del análisis del modelo para intentar y predecir si cualquiera de los otros residuos FR de ratón no presentes en las FR humanizadas podrían influir o no en la unión al antígeno de alguna forma.
- d. También se hicieron comparaciones de las secuenciasceptoras humanas individuales para las regiones variables de la cadena ligera kappa y pesada con la secuencia consenso de subgrupos de las regiones variables humanas a las que pertenecieron las secuenciasceptoras. La identificación de cualquier aminoácido idiosincrático en las secuencias humanas donantes fue importante, ya que éstos podrían haber afectado adversamente la unión al antígeno.
- e. Como las regiones variables de la cadena ligera y pesada humanas seleccionadas derivarían de dos anticuerpos humanos diferentes (véase el Ejemplo 4 para la selección de la secuencia aceptora de V_H humana), se llevaría a cabo un análisis cuidadoso de los residuos de relleno entre dominios de tanto las regiones ligeras kappa donantes comoceptoras. Esto fue debido a que cualquier ausencia de relleno en esta región podría haber tenido un dramático efecto tras la unión al antígeno, independientemente de la conformación de las estructuras de bucle de CDR del anticuerpo BAT-1 humanizado.
- f. Siguiendo este proceso de diseño, se identificaron varios aminoácidos en las FR de V_k de BAT-1 murinas para la conservación en la segunda versión (BATR_{k_B}) del anticuerpo BAT-1 humanizado (Tabla 5). La Tabla 5 proporciona el alineamiento de secuencias de aminoácidos que conducen al diseño de la primera (BATR_{k_A}) y segunda (BATR_{k_B}) versiones humanas remodeladas de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo BAT-1. Hubo 21 diferencias de aminoácidos entre las FR de la región V_k de BAT-1 de ratón donante y la región V_k de TEL9 humano aceptor. Sin embargo, hubo solo cinco residuos en las FR humanizadas donde se consideró necesario cambiar el aminoácido presente en las FR humanas para el aminoácido presente en las FR de ratón originales.

Se comprobaron los aminoácidos de la región V_k, localizados en la interfase V_k/V_H como se define por Chothia y colaboradores (Chothia et al., J. Mol. Biol. 186:651, 1985), para residuos poco usuales o raros. A partir de este análisis, la única posición de residuo que aumentó cualquier nivel de preocupación fue el Phe en la posición 36 (Phe36) en FR2. Tyr (como se encuentra en TEL9) normalmente se observó en esta posición, sin embargo, en mBAT-1 el Phe estaba presente. Además, la posición 36 fue una posición reconocida para un aminoácido de Vernier (Foote et al., arriba). Se creyó que los residuos de Vernier eran importantes para mantener la conformación de bucles de CDR. Además, el Phe no se observó comúnmente en el subgrupo VI de ratón de Kabat (²¹/₁₅₃) mientras que Tyr se observó muy comúnmente en tanto el subgrupo VI de ratón (¹³¹/₁₅₃) como el subgrupo I humano (⁶⁶/₇₄) (Kabat et al., arriba). Por consiguiente, se creyó que un cambio Tyr36Phe era apropiado, tanto para imitar el relleno entre dominios encontrado en BAT-1, entre las dos regiones variablesceptoras humanas heterólogas, como también para mantener la conformación de bucles de CDR.

TABLAS

Kabat	Nº	FR o CDR	V _k de BAT de ratón	κ-VI de ratón	κ-I humano	TEL9 aceptor humano	Superficie o núcleo	R _{kA} de BAT	R _{kB} de BAT	Comentario
1	1	FR1	Q	Q	D	E	S	E	E	
2	2		I	I	I*	.	C	I	I	Canónicos de Chothia (L1); canónicos de Martin (L1/L3); Vernier
3	3		V	V*	Q	.	S	V	V	Canónicos de Martin (L3);
4	4		L	L*	M	.	C	L	L	Canónicos de Chothia (L1/L3); canónicos de Martin (L1/L3); Vernier
5	5		T	T	T*	.	C	T	T	
6	6		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	
7	7		S	S*	S*	.	c	S	S	
8	8		P	P*	P*	.	c	P	P	
9	9		A	A*	S*	S	s	S	S	
10	10		I	I*	S	S	C	S	S	

ES 2 549 303 T3

Kabat	Nº	FR o CDR	Vk de BAT de ratón	κ-VI de ratón	κ-I humano	TEL9 aceptor humano	Superficie o núcleo	RkA de BAT	RkB de BAT	Comentario
5	11		M	M	L	L	c	L	L	
	12		S	S	S*	.	c	S	S	
	13		A	A*	A	.	c	A	A	
10	14		S	S*	S	.	c	S	S	
	15		P	P	V*	V	s	V	V	
	16		G	G*	G*	.	c	G	G	
	17		E	E	D	D	c	D	D	
	18		K	K*	R	R	s	R	R	
15	19		V	V*	V	.	c	V	V	
	20		T	T*	T*	.	c	T	T	
	21		I	M	I*	.	c	I	I	
	22		T	T*	T	.	C	T	T	
20	23	FR1	C	C*	C*	.	C	C	C	Canónicos de Martin (L1/L2)
	24	CD R1	S	s	R	R	s	S	S	
25	25		A	A*	A	.	c	A	A	Canónicos de Chothia (L1); canónicos de Martin (L1)
	26		R	S*	S	S	s	R	R	
	27		S	S*	Q	Q	s	S	S	
30	27A		-	-	S	-	s	-	-	
	27B		-	-	L	-	c	-	-	
	27C		-	-	V	-	s	-	-	
	27D		-	-	x	-	c	-	-	
	27E		-	-	x	-	s	-	-	
35	27F		-	-	-	-	s	-	-	
	28		-	-	S	S	s	-	-	Canónicos de Martin (L3); no hay aminoácido aquí en V _k de BAT
40	29		S	S*	I	I	s	S	S	Canónicos de Martin (L3)
	30		V	V	S	S	c	V	V	Canónicos de Chothia (L1); canónicos de Martin (L1)
45	31		S	S	N	N	c	S	S	Canónicos de Martin (L3)
	32		Y	Y*	Y	.	c	Y	Y	Canónicos de Martin (L3)
50	33		M	M	L*	L	c	M	M	Canónicos de Chothia (L1); canónicos de Martin (L1/L3)
55	34	CD R1	H	H	A	N	c	H	H	AA de relleno
	35	FR2	W	W*	W*	.	C	W	W	Canónicos de Martin (L1); Vernier
60	36		F	Y	Y	Y	C	Y	F	AA de relleno; línea germinal de ratón =Tyr; (Δ1)
	37		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	
	38		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	AA de relleno
	39		K	K*	K	.	c	K	K	

65

ES 2 549 303 T3

Kabat	Nº	FR o CDR	Vk de BAT de ratón	κ-VI de ratón	κ-I humano	TEL9 aceptor humano	Superficie o núcleo	RkA de BAT	RkB de BAT	Comentario	
5	40	39	P	S	P*	.	s	P	P		
	41	40	G	G	G	.	s	G	G		
	42	41	T	T	K	K	c	<u>K</u>	<u>K</u>	Línea germinal de ratón = Ser	
10	43	42	S	S*	A	A	c	A	A		
	44	43	P	P*	P*	.	C	P	P	AA de relleno del núcleo	
	45	44	K	K*	K	.	s	K	K		
15	46	45	L	R	L	.	C	L	L	Vernier; AA de relleno; línea germinal de ratón = Pro	
	47	46	W	W	L*	L	C	<u>L</u>	W	Vernier; (Δ2)	
20	48	47	I	I*	I*	.	C	<u>I</u>	I	Canónicos de Chothia (L2); Vernier	
	49	48	FR2	Y	Y*	Y	.	C		Vernier	
	50	49	CD R2	R	D	A	A	c	R	R	
25	51	50		T	T	A	A	c	T	T	Canónicos de Chothia (L2)
	52	51		S	S*	S	.	c	S	S	Canónicos de Chothia (L2)
30	53	52		N	K	S	T	s	N	N	
	54	53		L	L*	L*	.	c	L	L	
	55	54		A	A	E	Q	c	A	A	
	56	55	CD R2	S	S*	S	.	s	S	S	
35	57	56	FR3	G	G*	G*	.	S	G	G	
	58	57		V	V*	V	.	C	V	V	
	59	58		P	P*	P*	.	C	P	P	
	60	59		A	A	S*	S	S	S	S	
40	61	60		R	R*	R*	.	c	R	R	
	62	61		F	F*	F*	.	C	F	F	
	63	62		S	S*	S	.	C	S	S	
	64	63		G	G*	G*	.	C	G	G	Canónicos de Chothia (L2); Vernier
45	65	64		S	S*	S	.	C	S	S	
	66	65		G	G*	G*	.	C	G	G	Vernier
	67	66		S	S*	S	.	S	S	S	
	68	67		G	G*	G*	.	C	G	G	Vernier
50	69	68		T	T	T	.	C	T	T	Vernier
	70	69		S	S*	D	D	S	<u>D</u>	<u>D</u>	
	71	70		Y	Y	F	F	C	<u>E</u>	Y	Canónicos de Chothia (L1); canónicos de Martin (L2); Vernier; (Δ3)
55	72	71		C	S*	T	T	C	<u>I</u>	<u>I</u>	Línea germinal de ratón = Ser
	73	72		L	L*	L	.	c	L	L	
	74	73		T	T*	T	.	c	T	T	
60	75	74		I	I*	I	.	c	I	I	
	76	75		S	S	S	N	c	<u>N</u>	<u>N</u>	
	77	76		R	S	S	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	Línea germinal de ratón = Ser
	78	77		M	M	L*	L	c	<u>L</u>	<u>L</u>	
65	79	78		E	E*	Q	Q	c	<u>Q</u>	<u>Q</u>	

ES 2 549 303 T3

Kabat	Nº	FR o CDR	Vk de BAT de ratón	κ-VI de ratón	κ-I humano	TEL9 aceptor humano	Superficie o núcleo	RkA de BAT	RkB de BAT	Comentario	
5	80	79	A	A*	P	P	s	P	P		
	81	80	E	E*	E	.	s	E	E		
	82	81	D	D*	D	.	c	D	D		
	83	82	A	A	F	F	c	F	F		
10	84	83	A	A*	A*	.	c	A	A		
	85	84	T	T	T	.	c	T	T		
	86	85	Y	Y*	Y*	.	c	Y	Y		
	87	86	Y	Y*	Y*	.	C	Y	Y	AA de relleno	
15	88	87	FR3	C	C*	C*	.	C	C	Canónicos de Martin (L3)	
	89	88	CD R3	Q	Q	Q	.	c	Q	Q	Canónicos de Martin (L3); AA de relleno
20	90	89		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	Canónicos de Chothia (L3); canónicos de Martin (L3)
25	91	90		R	W	Y	T	c	R	R	Canónicos de Martin (L3); AA de relleno
	92	91		S	S	N	N	c	S	S	Canónicos de Martin (L3)
30	93	92		S	S	S	.	c	S	S	Canónicos de Martin (L3)
	94	93		F	N	L	.	c	F	F	Canónicos de Martin (L3)
35	95	94		P	P	P	.	c	P	P	Canónicos de Chothia (L3); canónicos de Martin (L3)
	95A			-	P	E	-	-	-		
	95B			-	M	-	-	-	-		
	95C			-	P	-	-	-	-		
40	95D			-	-	-	-	-	-		
	95E			-	-	-	-	-	-		
	95F			-	-	E	-	-	-		
45	96	95		L	L	W	.	c	L	L	Canónicos de Martin (L3); AA de relleno del núcleo
	97	96	CD R3	T	T*	T	.	c	T	T	Canónicos de Martin (L3)
50	98	97	FR4	F	F*	F*	.	C	F	F	Canónicos de Martin (L3); Vernier; AA de relleno del núcleo.
	99	98		G	G*	G*	.	c	G	G	
	100	99		S	A	Q	G	s	G	G	
	101	100		G	G*	G*	.	c			
55	102	101		T	T*	T*	.	c			
	103	102		K	K*	K	.	c	K	K	
	104	103		L	L*	V	.	c	L	L	
	105	104		E	E*	E	.	c	E	E	
60	106	105		I	L	I	.	c	I	I	
	106 A			-	-	-	-	-	-	-	
	107	106	FR4	K	K*	K	.	s	K	K	

También se decidió un segundo cambio en la posición 47 en FR2. La Leu altamente conservada encontrada en la región variable de la cadena ligera kappa de TEL9 humano se cambió a un Trp, como se encuentra en la región variable de la cadena ligera kappa de BAT-1 de ratón. La posición 47 fue otra posición de residuo de Vernier reconocida y también se localizó próxima a la interfase de V_H según el modelo molecular. En particular, fue próximo

a Ala55 en H2 y puede haber estado interactuando con él. Por tanto, aunque el Trp nunca se observó en esta posición de residuo de núcleo en secuencias de V_H humanas, se sintió prudente conservarlo en BATTR_{K_B} haciendo la modificación Leu47Trp.

5 El tercer cambio de FR introducido en BATTR_{K_B} se localizó en la posición 71, que además de estar identificado como una posición de residuo de Vernier (Foote et al., arriba), también se reconoció que era una de las posiciones de residuos canónicos importantes para la estructura de bucle L1. Estos residuos canónicos se definieron por Chothia y sus colaboradores (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 arriba; Tramontano et al., arriba) como vitales para la conservación de la estructura de bucles CDR. Muchos de los aminoácidos canónicos se localizaron dentro de las CDR, sin embargo, varios (tal como 71Tyr) también se posicionaron dentro de las FR. Aunque el cambio de aminoácidos fue conservativo, el cambio Phe71Tyr se consideró crítico para la humanización satisfactoria de la cadena ligera kappa de BAT-1.

Otras versiones de la región V_k humanizada son:

15 BATTR_{K_C}: Cys y Ser son similares en tamaño y carácter, y a partir del modelo ambos aminoácidos en la posición 72 en FR3 parecieron estar razonablemente enterrados y señalando lejos del bucle L1. Sin embargo, en el caso del aminoácido Cys, se expone la cadena lateral de azufre, según el modelo, mientras que según la base de datos de Kabat (Kabat et al., arriba) la presencia de Cys en esta posición es un acontecimiento único y Ser se observa comúnmente en esta posición (⁴²¹/₁₂₃₄).

20 Por consiguiente, BATTR_{K_C} contuvo los cambios en Tyr36Phe, Leu47Trp y Phe71Tyr (como en BATTR_{K_B}) más la modificación de Ser72Cys a los residuos FR de V_k del anticuerpo TEL9 aceptor.

25 BATTR_{K_D}: La evidencia del modelo Fv de BAT-1 murino sugiere que la superficie que expuso 70Ser es un residuo que puede interactuar con el bucle L1. En la cadena ligera kappa de TEL9 humano el aminoácido en esta posición es Asp, que es mayor que Ser y está positivamente cargada. La Ser nunca se observa en esta posición en regiones V_k humanas (siendo Asp de lejos el aminoácido más común). La proximidad al bucle L1 y la naturaleza expuesta de la superficie de 70Ser sugirió provisionalmente que puede estar tanto interactuando con L1 como incluso con el antígeno directamente. Por consiguiente, se decidió hacer el cambio Asp70Ser en BATTR_{K_D}, que era de otro modo idéntico a BATTR_{K_C}.

30 Una descripción de las secuencias de aminoácidos de todas las variantes de la región V_k del anticuerpo BAT-1 humanizado propuestas anteriormente se da en la FIG. 5.

35 Aunque se buscaron posibles sitios de glucosilación unidos a N, es decir, Asn-Xaa-(Ser/Thr)-Xaa (Gavel et al., Protein Eng. 3:43, 1990) en tanto las regiones V_k de ratón donantes como humanas aceptoras, además de las propias construcciones humanizadas, no se identificó ninguno.

Ejemplo 4

40 Diseño de las variantes del anticuerpo V_H BAT-1 humanizado

De nuevo, la primera etapa en el diseño de la región V_H humanizada del anticuerpo BAT-1 de ratón era la selección de la región variable de la cadena pesada humana aceptoras que serviría de base de la región V_H humanizada de BAT-1. Cuando la región V_H de mBAT-1 se comparó inicialmente con las secuencias consenso de los tres subgrupos de la región variable de la cadena pesada humana se encontró que era más similar a la secuencia consenso para el subgrupo I de la cadena pesada humana con un 61,54 % de identidad global y un 67,82 % de identidad entre las FR solas. Cuando se midió con respecto a la similitud, estos valores también aumentaron al 70,09 % del global y al 77,01 % dentro de las FR solas.

50

55

60

65

TABLA 6

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

NOMBRE	ID	V _H de BAT murino frente a la mayoría de los homólogos 15 V _H humana			
		scsCccccscSsssccccccCccccCSCCs cccccCCccsss			
Residuos 1- 43		1	2	3	4
		12345678901234567890123456789012345	AB67890123		
		v		-vvvv===H1==	
BAT 100		QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMN	--	WVKQAPG	
hsighv/295	65.0	.V.....S.....AS.....	S.SSHAI.	.R....	
R2C5H	60.3	.V.....S.....AS.....	N..ST.AL.	.MRR...	
030805	56.8	.V.....A.V....AS..V.....	S.DI.	.R..T.	
WIL2	57.7	.V.....A.V....AS..V..E..V...	GHY.H	.R....	
21/28	59.7	.V.....A.V....AS..V.....	S.A.H	.R....	
UC	57.7	.V.....A.V....AS..V..E.....	GHY.H	.R....	
030802	58.2	.V.....A.V....AS..V.....	S.A.H	.R....	
039734	57.7	.V.....A.V....AS..V..E.....	GHY.H	.G....	
030812	56.3	.V.....A.V....AS..V.....	S.Y.H	.R....	
030810	57.9	.V.....A.V....AS..V.....	S.Y.H	.R....	
4d275a	71.4	.V.....S.....AS..V.....	S.A..	.G....	
030811	56.0	.V.....A.V....AS..V.....	S.Y.H	.R....	
IF10	59.3	.V.....A.V....AS..V.....	S.DI.	.R....	
GD9	71.4	.V.....S.....AS..V.....	S.A..	.R....	
039232	59.3	VH....S.F....AS..V.....	SSVI.	.R....	
		cCCCCccccccsc cccccsssssCCCCCcSccccccccccsc			
Residuos		5	6	7	8
44-82		456789012ABC345678901234567890123456789012ABC			
		vvv=====H2=====	-Kabat-	v v v v v	
BAT 100		KGLKWMGWINT-			
hsighv/295	65.0	DSGESTYAEFKGRFAFSLETSANTAYLQINNL			
		Q..Q.....			
		NT.SP...QG.T...V...D..VS.....	TS.		
R2C5H	60.3	Q..L NT.NP...QD.T...V...D..V...F...SS.			
030805	56.8	Q..E...M.P N..NTG..QK.Q..VTMTRN..IS...MELSS.			
WIL2	57.7	Q..E...P N..GTN...K.Q..VTITRD..I...MELSR.			
21/28	59.7	QR.E...A GN.NTK.SQK.Q..VTITRD...S...MELSS.			
UC	57.7	Q..E...P N..GTN...QK.Q..VTITRD..I...MELSR.			
030802	58.2	QR.E...A GN.NTK.SQK.Q..VTITRD...S...MELSS.			
039734	57.7	Q..E...P N..GTN...QK.Q..VTITRD..I...MELSR.			
030812	56.3	Q..E...I..P SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.			
030810	57.9	Q..E...I..P SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.			
4d275a	71.4	Q..E..... NT.NP...QG.T...V...D..VS.....	CS.		
030811	56.0	Q..E...I..P SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.			
IF10	59.3	Q..E...M.P N..NTG..QK.Q..VTMTRN..IS...MELSS.			
GD9	71.4	Q..E..... NT.DP...QG.T...V...D..VS.....	SS.		

039232 59.3 Q..E..... NT.NP...QG.T...V...D..VT.T.....S.

Residuos 9 10 11

83-113 345678901234567890ABCDEFGHIJK1234567890123

VV=====H3=====V

BAT 100 NNEDTATYFCVRVGYDA-----LDYWGQGTSTVTVSS

hsighv1295 65.0 TA...GM...AKESHSSALDL -.....L.....

R2C5H 60.3 QA...V.Y.AKPKRGTYRRGYYYYP M.V.....T.....

030805 56.8 RS...V.Y.A.G..VWGSYRYTA AF.I.....M.....

WIL2 57.7 RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYY FF.....L.....

21/28 59.7 RS...V.Y.A.G..YGS GS -N.....L.....

UC 57.7 RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYY FF.....L.....

030802 58.2 RS...V.Y.A..KWEQPIDAP F.....L.....

039734 57.7 RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYYF F.....L.....

030812 56.3 RS...V.Y.A.D..YYDSNGYYSG YF.....L.....

030810 57.9 RS...V.Y.A..QWLGLTGPN -.....L.....

4d275a 71.4 KA...V.Y.A.-----

030811 56.0 RS...V.Y.A.D.IVVVPAAI PH YF.....L.....

IF10 59.3 RS...V.Y.A.NNGSY YF.....L.....

GD9 71.4 KA...V.Y.A.-----

039232 59.3 KA...V.Y.A.ELRNDHYVWXNYRPLS-.....

La región V_H de BAT-1 de ratón se comparó entonces con todos los ejemplos registrados de secuencias individuales de regiones variables humanas públicamente disponibles. Las Tablas 6 y 7 muestran las quince mejores coincidencias con la región V_H de BAT-1 de ratón que se identificaron mediante este análisis. En general, el algoritmo de búsqueda seleccionó la región V_H humana del anticuerpo hsighv1295 (Fang et al., J. Exp. Med. 179:1445, 1994) como la coincidencia más próxima a la región V_H de BAT-1 de ratón. Esta región V_H humana tuvo una identidad global con la región V_H de BAT-1 del 69,23 % (Tabla 7), un valor que aumentó al 74,71 % cuando las FR solas se compararon. Cuando se midió con respecto a la similitud, estos valores aumentaron al 75,21 % del global y al 79,31 % dentro de las FR solas. Así, esta FR humana se convirtió en la base de la versión humanizada de la cadena pesada de BAT-1.

TABLA 7

NOMBRE	ID	Todos	Superficie	Núcleo	CDR de Kabat	FR	Superficie de FR	Núcleo de FR	FR cerca de CDR
BAT V _H	100	117	26	86	30	87	18	68	27
Hsighv1295	65,0	78	17	63	17	65	14	51	22
R2C5H	60,3	76	16	59	17	64	14	49	20
030805	56,8	71	16	56	14	59	13	47	19
WIL2	57,7	71	15	56	13	59	13	46	19
21/28	59,7	71	15	55	13	59	13	46	19
UC	57,7	71	15	55	13	59	13	46	19
030802	58,2	71	15	55	13	59	13	46	19
039734	57,7	71	15	55	13	57	13	46	19
030812	56,3	71	15	55	13	58	13	46	18
030810	57,9	70	15	55	13	58	13	46	17
4d275a	71,4	70	15	54	13	58	13	46	18
030811	56,0	70	15	54	13	58	13	46	18
IF10	59,3	70	15	54	13	58	13	46	18
GD9	71,4	70	15	54	11	58	13	46	18
039232	59,3	70	15	54	13	58	13	46	18

	NOMBRE	Vernier	V _H	J	Línea germinal humana próxima	Tamaño de H1	Tamaño de H2	Tamaño de H3	Clase de H1	Clase de H2
5	BAT V _H	16	98	19		5	17	8	?	?
	Hsighv12 95	13	70	14	VI-4,1b+	Mismo	Mismo	11	1/10A	2/10A
	R2C5H	13	70	14	VI-4,1b+	Mismo	Mismo	17	Mismo	Mismo
	030805	11	66	14	DP-15-V18+					
	WIL2	11	65	14	DP-8+	Mismo	Mismo	14	1/10A	Mismo
10	21/28	11	64	14	DP-25-VI3b+	Mismo	Mismo	10	1/10A	Mismo
	UC	11	62	14	DP-8+	Mismo	Mismo	14	1/10A	Mismo
	030802	11	62	14	DP-25-VI3b+					
	039734	11	62	14	DP-8+					
	030812	11	60	14	hv1f10t					
15	030810	11	59	14	hv1f10t					
	4d275a	11	59	14	DP-21-4d275a+	Mismo	Mismo	0	Mismo	Mismo
	030811	11	59	14	hv1f10t					
	IF10	11	59	14	DP-15-V18+	Mismo	Mismo	9	Mismo	Mismo
20	GD9	11	58	14	VI-4,1b+	Mismo	Mismo	0	Mismo	2/10A
	039232	11	58	14	VI-4,1b+					

ID - porcentaje de identidad de las secuencias V_H humanas para la región V_H de BAT murino

²Todos - número de residuos idénticos en el conjunto de la región V_H humana cuando se compara con el conjunto de la región V_H de BAT murino

25 ³Superficie (Superficie de FR) - número de residuos (FR) idénticos sobre la superficie

⁴Núcleo (Núcleo de FR) - número de residuos idénticos dentro del núcleo (FR) del dominio Fv

⁵CDR/FR - número de residuos idénticos dentro de las CDR o las FR;

⁶FR cerca de CDR - representa el número de residuos idénticos entre los aminoácidos de FR dentro de 5Å de una CDR;

30 ⁷Vernier - número de residuos idénticos entre los 14 aminoácidos de Vernier (Foote et al., arriba);

⁸V_H (Cadena J) - número de residuos idénticos dentro del gen V_H (cadena J)

⁹Tamaño de L1 a L3 - número de residuos en cada CDR

¹⁰Clase de L1 a L3 - clase canónica de CDR según Martin & Thornton (Martin et al., arriba)

35 La siguiente etapa en el proceso de diseño era estudiar las secuencias de aminoácidos de las FR de la región V_H de hsignv1295 aceptor humano para determinar si cualquiera de estos residuos de aminoácidos iba a influir probablemente adversamente en la unión al antígeno. Una vez más, los modelos moleculares construidos por OML (véase el Ejemplo 5) fueron cruciales para este proceso de diseño, a partir de los cuales se identificaron varios aminoácidos en las FR de la región V_H de BAT-1 murino para la conservación en la primera (BATTRH_A) y posteriores versiones del anticuerpo BAT-1 humanizado (Tabla 8). Hubo 22 diferencias de aminoácidos entre las FR de las regiones V_H de BAT-1 de ratón donante y de hsignv1295 humano aceptor y se consideraron hasta nueve residuos murinos para la conservación en las FR humanizadas.

45 Por tanto, BATTRH_A consistió en las CDR de la región V_H del anticuerpo BAT-1 de ratón, genéticamente insertadas en las FR de la región V_H del anticuerpo hsignv1295 humano. Esta fue la versión de CDR injertadas de la región V_H del anticuerpo BAT-1 humanizado y no contuvieron en absoluto cambios de aminoácidos de FR.

50 En BATTRH_B, los aminoácidos en las posiciones 28 y 30 en FR1 de la secuencia de BAT-1 de ratón (es decir, Thr y Thr, respectivamente) sustituyeron los aminoácidos de hsignv1295 humano correspondientes (es decir, Ser, y Ser, respectivamente) en la región variable de la cadena pesada de BAT-1 humanizado. Esto se hizo debido a que representaron algunos de los residuos canónicos importantes para la conformación del bucle hipervariable H1 (Chothia et al., 1992 arriba). Los residuos canónicos se consideraron críticos para la orientación y estructura correctas de bucles hipervariables y generalmente siempre se conservaron en una región variable humanizada. Además, las posiciones de residuos 27-30 se consideraron parte del propio bucle H1 y así fueron incluso más críticas para la conformación y orientación correctas de este bucle - justificando su conservación incluso más fuertemente. Así, estas dos posiciones de residuos representaron la suma de los cambios hechos a las FR de la secuencia de hsignv1295 humano en BATTRH_B.

60 La siguiente etapa en el proceso de diseño era estudiar las secuencias de aminoácidos de las FR de la región V_H de hsignv1295 aceptor humano para determinar si era probable que cualquiera de estos residuos de aminoácidos influyera adversamente en la unión al antígeno. Una vez más, los modelos moleculares construidos por OML (véase el Ejemplo 5) fueron cruciales para este proceso de diseño, a partir de los cuales se identificaron varios aminoácidos en las FR de la región V_H de BAT-1 murino para la conservación en la primera (BATTRH_A) y posteriores versiones del anticuerpo BAT-1 humanizado (Tabla 8). Hubo 22 diferencias de aminoácidos entre las FR de las regiones V_H de BAT-1 de ratón donante y de hsignv1295 humano aceptor y se consideraron hasta nueve residuos murinos para la

conservación en las FR humanizadas.

Por tanto, BATHA consistió en las CDR de la región VH de la región VH del anticuerpo BAT-1 de ratón, genéticamente insertadas en las FR de la región VH del anticuerpo hshghv1295 humano. Esta fue la versión de CDR injertadas de la región VH del anticuerpo BAT-1 humanizado y no contuvieron en absoluto cambios de aminoácidos de FR.

En BATHB, los aminoácidos en las posiciones 28 y 30 en FR1 de la secuencia de BAT-1 de ratón (es decir, Thr y Thr, respectivamente) sustituyeron los aminoácidos de hshghv1295 humano correspondientes (es decir, Ser, y Ser, respectivamente) en la región variable de la cadena pesada de BAT-1 humanizado. Esto se hizo debido a que representaron algunos de los residuos canónicos importantes para la conformación del bucle hipervariable H1 (Chothia et al., 1992 arriba). Los residuos canónicos se consideraron críticos para la orientación y estructura correctas de bucles hipervariables y generalmente siempre se conservaron en una región variable humanizada. Además, las posiciones de residuos 27-30 se consideraron parte del propio bucle H1 y así fueron incluso más críticas para la conformación y orientación correctas de este bucle - justificando su conservación incluso más fuertemente. Así, estas dos posiciones de residuos representaron la suma de los cambios hechos a las FR de la secuencia de hshghv1295 humano en BATHB.

TABLA 8

Kabat	Nº	FR o CDR	VH de BAT de ratón	Varios de ratón	Humano	hshghv 1295 acceptor humano	Superf. o núcleo	RHA de BAT	RHB de BAT	RHC de BAT	Comentario
1	1	FR 1	Q	E	Q	.	s	Q	Q	Q	
2	2		I	V*	V	V	c	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	Canónicos de Martin (H1); Vernier
3	3		Q	Q	Q	.	s	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L*	.	C	L	L	L	Canónicos de Martin (H1)
5	5		V	Q*	V	.	c	V	V	V	
6	6		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S*	.	c	S	S	S	
8	8		G	G	G*	.	c	G	G	G	
9	9		P	A*	A	S	S	S	S	S	
10	10		E	E	E	.	c	E	E	E	
11	11		L	L*	V	.	S	L	L	L	
12	12		K	V*	K	.	c	K	K	K	
13	13		K	K	K*	.	s	K	K	K	
14	14		P	P*	P*	.	s	P	P	P	
15	15		G	G	G*	.	c	G	G	G	
16	16		E	A	A	A	c	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
17	17		T	S*	S*	S	c	S	S	S	
18	18		V	V*	V	.	c	V	V	V	
19	19		K	K*	K	.	s	K	K	K	
20	20		I	L	V	.	c	I	I	I	Canónicos de Martin (H1)
21	21		S	S	s	.	c	S	S	S	
22	22		C	C	C*	.	C	C	C	C	Canónicos de Martin (H1)
23	23		K	T	K	.	c	K	K	K	
24	24		A	A*	A	.	c	A	A	A	Canónicos de Chothia (H1); canónicos de Martin (H1)
25	25		S	S	S*	.	c	S	S	S	

ES 2 549 303 T3

Kabat	Nº	FR o CDR	V _H de BAT de ratón	Varios de ratón	Humano I	hsighv 1295 acceptor humano	Superf. o núcleo	RH _A de BAT	RH _B de BAT	RH _C de BAT	Comentario	
5	26	26		G	G	G*	.	c	G	G	G	Canónicos de Chothia (H1); canónicos de Martin (H1)
10	27	27		Y	P*	Y	.	C	Y	Y	Y	Canónicos de Chothia (H1); Vernier
15	28	28		T	N	T	S	S	<u>S</u>	T	T	Vernier; (Δ1)
20	29	29		F	I*	F*	.	C	F	F	F	Canónicos de Chothia (H1); canónicos de Martin (H1); Vernier
25	30	30	FR 1	T	K	T	S	C	<u>S</u>	T	T	Vernier; (Δ2)
	31	31	CDR 1	N	D	S	S	s	N	N	N	
30	32	32		Y	T	Y	H	c	Y	Y	Y	Canónicos de Martin (H1)
	33	33		G	Y*	A	A	c	G	G	G	Canónicos de Martin (H1/H2)
35	34	34		M	M	I	I	c	M	M	M	Canónicos de Chothia (H1); canónicos de Martin (H1)
40	35	35		N	H	S	-	c	N	N	N	Canónicos de Martin (H1); AA de relleno
45	35a			-	-	-	-	-	-	-	-	
	35b		CDR 1	-	-	-	-	-	-	-	-	
50	36	36	FR 2	W	W	W*	.	C	W	W	W	Canónicos de Martin (H1)
	37	37		V	V*	V	.	C	V	V	V	AA de relleno
	38	38		K	K	R*	R	C	<u>R</u>	<u>R</u>	R	
55	39	39		Q	Q	Q*	.	c	<u>Q</u>	<u>Q</u>	Q	AA de relleno
	40	40		A	R	A	.	c	A	A	A	
	41	41		P	P	P	.	s	P	P	P	
	42	42		G	E*	G*	.	s	G	G	G	
	43	43		K	Q*	Q	Q	s	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	
60	44	44		G	G*	G	.	c	G	G	G	
	45	45		L	L	L*	.	C	L	L	L	AA de relleno del núcleo
65	46	46		K	E	E*	Q	c	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	

ES 2 549 303 T3

Kabat	Nº	FR o CDR	V _H de BAT de ratón	Varios de ratón	Humano I	hsighv 1295 acceptor humano	Superf. o núcleo	RH _A de BAT	RH _B de BAT	RH _C de BAT	Comentario
5	47		W	W	W*	.	C	W	W	W	Canónicos de Martin (H2); AA de relleno
10	48		M	I*	M	.	C	M	M	M	Canónicos de Martin (H1)
	49	FR 2	G	G*	G*	.	C	G	G	G	
15	50	CDR 2	W	R	W	.	c	W	W	W	Canónicos de Martin (H2)
	51		I	I	I	.	c	I	I	I	Canónicos de Martin (H1/H2)
20	52		N	D*	N	.	c	N	N	N	Canónicos de Martin (H2)
25	52a		T	P*	P	.	c	T	T	T	Canónicos de Chothia (H2); canónicos de Martin (H2)
30	52b		-	-	Y	-		-	-	-	Canónicos de Martin (H2)
	52c		-	-		-		-	-	-	Canónicos de Martin (H2)
35	53		D	A	G	N	s	D	D	D	Canónicos de Martin (H2)
40	54		S	N	N	T	c	S	S	s	Canónicos de Martin (H2)
45	55		G	G	G	.	c	G	G	G	Canónicos de Chothia (H2); canónicos de Martin (H2)
50	56		E	N	D	S	s	E	E	E	Canónicos de Martin (H2)
	57		S	T	T	P	c	S	S	S	
	58		T	K	N	.	c	T	T	T	Canónicos de Martin (H2)
55	59		Y	Y	Y	.	c	Y	Y	Y	Canónicos de Martin (H2)
	60		A	D	A	.	c	A	A	A	
	61		E	P*	Q	Q	s	E	E	E	
	62		E	K*	K	G	s	E	E	E	
60	63		F	F*	F	.	c	F	F	F	
	64		K	Q*	Q	T	s	K	K	K	
	65	CDR 2	G	G	G	.	s	G	G	G	
	66	FR 3	R	K	R	.	C	R	R	R	
65	67		F	A	V	.	C	F	F	F	

ES 2 549 303 T3

	Kabat	Nº	FR o CDR	V _H de BAT de ratón	Varios de ratón	Humano I	hsighv 1295 acepto humano	Superf. o núcleo	RH _A de BAT	RH _B de BAT	RH _C de BAT	Comentario
5	68	69		A	T*	T	V	C	V	V	V	
	69	70		F	I	I	.	C	F	F	F	Canónicos de Martin (H1/H2)
10	70	71		S	T*	T	.	C	S	S	S	
	71	72		L	A*	A	.	C	L	L	L	Canónicos de Chothia (H2); canónicos de Martin (H2)
15	72	73		E	D	D	D	c	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	
	73	74		T	T*	T	.	S	T	T	T	
	74	75		S	S*	S*	.	s	S	S	S	
	75	76		A	S*	T	V	c	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	
20	76	77		N	N*	S	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	N	(Δ3)
	77	78		T	T*	T	.	c	T	T	T	
	78	79		A	A*	A	.	c	A	A	A	Canónicos de Martin (H1/H2)
25	79	80		Y	Y*	Y	.	c	Y	Y	Y	
	80	81		L	L	M	.		L	L	L	Canónicos de Martin (H1)
30	81	82		Q	Q*	E	.	c	Q	Q	Q	
	82	83		I	L*	L	.	c	I	I	I	
	82a	84		N	S*	S	T	c	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
	82b	85		N	S*	S	S	s	<u>S</u>	<u>S</u>	s	
	82c	86		L	L	L*	.	c	L	L	L	
35	83	87		N	T*	R	T	c	<u>T</u>	T	<u>T</u>	
	84	88		N	S*	S	A	s	A	A	A	
	85	89		E	E*	E	.		E	E	E	
	86	90		D	D*	D*	.	c	D	D	D	
	87	91		T	T*	T	.	c	T	T	T	
40	88	92		A	A	A	G	c	G	G	G	
	89	93		T	V	V	M	c	<u>M</u>	<u>M</u>	<u>M</u>	
	90	94		Y	Y	Y*	..	c	Y	Y	Y	Canónicos de Martin (H1)
45	91	95		F	Y*	Y C*	.	C	F	F	F	AA de relleno
	92	96		C	C		.	C	C	C	C	Canónicos de Martin (H1)
50	93	97		V	A	A*	A	C	<u>V</u>	<u>V</u>	A	AA de relleno; (Δ4)
55	94	98	FR 3	R	R	R	K	C	R	R	K	Canónicos de Chothia (H1); canónicos de Martin (H1); (Δ5)
60	95	99	CDR 3	V	G	A			V	V	V	AA de relleno
	96	100		G	Y	P			G	G	G	
	97	101		Y	L	G	H	s	Y	Y	Y	
	98	102		D	R	Y	S	s	D	D	D	
65	99	103		A	R	G	S	c	A	A	A	
	100			-	D	S	A		-	-	-	

	Kabat	Nº	FR o CDR	V _H de BAT de ratón	Varios de ratón	Humano I	hshighv 1295 acceptor humano	Superf. o núcleo	RH _A de BAT	RH _B de BAT	RH _C de BAT	Comentario
5	100 a			-	-	G	L		-	-	-	
	100 b			-	-	G	D		-	-	-	
	100 c			-	-	G	-		-	-	-	
	100 d			-	-	C	-		-	-	-	
10	100 e			-	-	Y	-		-	-	-	
	100 f			-	-	R	-		-	-	-	
	100 g			.	-	G	-		.	.	.	
	100 h			.	-	D	-		.	.	.	
	100 i			.	-	Y	-		.	.	.	
15	100 j			.	-	x	-		.	.	.	
	100 k	104		L	-	F	.	c	L	L	L	AA de relleno del núcleo
20	101	105		D	D	D	.	c	D	D	D	
	102	106	CDR 3	Y	Y	Y	.	c	Y	Y	Y	Canónicos de Martin (H1)
	103	107	FR 4	W	W	W*	.	C	W	W	W	AA de relleno del núcleo
25	104	108		G	G	G	.	c	G	G	G	
	105	109		Q		Q	.	s	Q	Q	Q	
	106	110		G	G	G*	.	c	G	G	G	
	107	111		T	T*	T	.	c	T	T	T	
30	108	112		S	S	L	L	c	L	L	L	
	109	113		V	V	V*	.	c	V	V	V	
	110	114		T	T	T	.	c	T	T	T	
	111	115		V	V*	V*	.		V	V	V	
35	112	116		S	S	S*	.		S	S	S	
	113	117	FR 4	S	S	S*	.		S	S	S	

La tercera versión de la región V_H de BAT-1 humanizada (BATRH_C) incorporó todas las sustituciones hechas en BATRH_B y, además, contuvo otros tres aminoácidos murinos, que se insertaron en las FR humanas en lugar de los residuos humanos correspondientes. El primero de éstos fue el aminoácido Asn localizado en la posición 76 en FR3. Según el modelo molecular de la región F_v de BAT-1, el residuo Asn estuvo próximo a CDR H1 y puede haber estado soportando la estructura de bucle. Además, en la región V_H de BAT-1 de ratón, la Asn estuvo expuesta en la superficie y fue mayor que la Ser en las FR de hshighv1295 humano. Por consiguiente, se hizo una sustitución Ser76Asn a la FR.

Se hizo otro cambio al aminoácido en la posición 94 en FR3 de la región V_H, una posición de residuo que se había identificado previamente por Chothia et al. (Chothia et al., 1992 arriba), además de por Martin y Thornton (Martin et al., arriba), como importante para la conformación del bucle H3. Además, el modelo molecular indicó que la Arg94 podría formar un puente salino con Asp101 en CDR H3, estabilizando la estructura de bucle. Por consiguiente, la Arg en el ratón sustituyó la Lys en el ser humano en esta posición de residuo. También se hizo una modificación final en la posición 93 en FR3 en la que la Ala humana se sustituyó con el aminoácido Val murino. Este residuo se consideró un residuo de relleno, como se define por Chothia (Chothia et al., 1985 arriba), importante para el correcto relleno de las regiones V_K y V_H. Además, éste se identificó como una posición de residuo de Vernier, y por tanto, importante para mantener la conformación de bucle de CDR, una clasificación confirmada por un análisis del modelo molecular. Tomados conjuntamente, todos los datos y el análisis molecular sugirieron que era apropiado para conservar estos tres residuos murinos en la región V_H humanizada de BATRH_C, es decir, Ser76Asn, Ala93Val y Lys94Arg.

La construcción de las dos siguientes variantes humanizadas de la región V_H de BAT-1 dependió de la afinidad de unión de estas tres primeras versiones humanizadas, es decir, BATRH_A, BATRH_A y BATRH_C. Si los tres dejaron de mostrar un nivel adecuado de unión, entonces se sinterizarían y probarían las versiones BATRH_D y BATRH_E.

La versión D de la región V_H de BAT-1 humanizado (BATRH_D) incorporó todas las sustituciones hechas en BATRH_C y, además, contuvo un aminoácido de ratón adicional localizado en la posición 2 en FR1. Esta localización se definió como tanto una posición de residuo canónico (Martin et al, arriba) como de Vernier (Foote et al., arriba). Además, a partir del modelo de la región variable de BAT-1, el aminoácido Ile murina estuvo próximo a Tyr27 en FR1, que es él

mismo parte de la estructura de bucle H1. En cambio, los aminoácidos Ile murina y Val humana, en esta localización en las FR de ratón y humanas, fueron similares en carácter y solo ligeramente diferentes en tamaño, es decir, Ile tiene un grupo metilo adicional. Por tanto, se decidió hacer el cambio Val2Ile solo en esta etapa del procedimiento de humanización e incorporar la mutación en la versión BATRH_D.

5 La versión final de la región variable de la cadena pesada de BAT-1 humanizado (BATRH_E) incorporó todas las sustituciones de FR de ratón hechas en BATRH_D junto con tres cambios de aminoácidos adicionales en las posiciones 38 (FR2), 46 (FR2) y 68 (FR3).

10 La modificación Arg38Lys se hizo debido a que el modelo sugirió que la Arg, profundamente enterrada en el núcleo de la región V_H, estaba próxima a Phe63 en CDR H2. Sin embargo, ésta no era una posición de residuo canónico o de Vernier previamente identificada. Además, la Arg y la Lys tienen estructura relativamente similar, aunque la Arg es más voluminosa, y así era difícil de juzgar la significancia de cualquier cambio de aminoácido. Por consiguiente, esto se consideró solo una posibilidad provisional y la sustitución solo iba a hacerse si se encontrara que la afinidad de unión del anticuerpo BAT-1 humanizado era mala. El mismo fundamento también estuvo detrás de la selección de la modificación de Gln46Lys. El aminoácido Lys estaba medio enterrado, según el modelo molecular, pero próximo a Glu62 y Phe63 en CDR H2. Hubo una leve posibilidad de que el residuo de Lys46 cargado más grande pudiera interactuar con el antígeno directamente, por tanto estaba conservado en BATRH_E. El caso para preservar el aminoácido 68Ala murino estaba relacionado con su proximidad a CDR H2, particularmente al residuo Tyr59 en el bucle H2, y a la probabilidad de que, por tanto, influyera en la estructura de bucle. Era poco probable que la Ala fuera importante debido a su pequeño tamaño, sin embargo la Val más grande, encontrada en las FR de h5ighv1295 humano, podría haber afectado adversamente la estructura del bucle H2, y así se sustituyó con el residuo de Ala murina.

25 Una descripción de las secuencias de aminoácidos de todas las variantes de la región V_H humanizada propuestas anteriormente se da en la FIG. 6.

Aunque se buscaron posibles sitios de glucosilación ligados a N, es decir, Asn-Xaa-(Ser/Thr)-Xaa (Gavel et al., arriba) en tanto las regiones V_H de ratón donantes como humanas aceptoras, además de las propias construcciones humanizadas, no se identificó ninguno.

Ejemplo 5

Modelado molecular del dominio Fv de BAT-1 murino y humanizado

35 Para ayudar en el diseño de las regiones variables del anticuerpo BAT-1 humanizado, se construyó un modelo molecular de las regiones variables de tanto los anticuerpos murinos como los humanizados. El modelado de estas estructuras se logró usando tanto los métodos establecidos de modelado por homología como técnicas desde el principio. Esto se hizo usando el paquete de modelado molecular de AbM, que se suministró y utilizó por Oxford Molecular Limited (OML). Se formatearon las estructuras cristalográficas de rayos X de anticuerpos de la base de datos de Brookhaven disponible para permitir que fueran usadas para el modelado con *AbM*.

45 Las FR de las regiones variables de BAT-1 se modelaron en FR de regiones variables de inmunoglobulina similares, estructuralmente resueltas. Aunque se mantuvieron las cadenas laterales de aminoácidos idénticas en su orientación original, las cadenas laterales desapareadas se sustituyeron como en la región Fv de BAT-1 original. Se usaron los átomos de esqueleto de la región V_K de FAB17-1A para el modelo de la región V_K de BAT-1, mientras que las FR de la región V_H de 409.5.3 se usaron para modelar la región V_H de BAT-1 (códigos de Brookhaven PDB 1for y 1iai, respectivamente). Estas secuencias representaron ambas buenas coincidencias para las secuencias de la región variable del anticuerpo BAT-1 murino, y sus variantes humanizadas. Las identidades para las secuencias de mBAT-1 y humanizadas oscilaron del 73 % al 92 % para las secuencias de la región V_K y entre el 65 % y el 79 % para las secuencias de la región V_H. La prueba de *AbM* con estructuras conocidas ha mostrado que la homología del esqueleto de FR es un factor importante en la calidad de cualquier modelo, ya que el uso de estructuras de FR que coinciden poco con una secuencia que se modela puede afectar significativa y adversamente la posición y orientación de la estructura de bucle de CDR.

55 Para la estructura de esqueleto del bucle L1, se tomaron las conformaciones de bucle de la región V_K de BAT-1 murino y la secuencia de BATTR_{K_B} humanizado (FIG. 5) de clases canónicas usadas por *AbM*. Estas clases canónicas se basan en aquellas descritas por Chothia y sus colaboradores, pero se han modificado para tener en cuenta estructuras que han estado disponibles desde que se publicaron los artículos originales (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 arriba; Tramontano et al., arriba). La prueba del rendimiento de las predicciones de *AbM* para estructuras de bucle conocidas ha mostrado que los bucles de CDR que se crean de esta forma son normalmente modelados con mucha exactitud, es decir, a dentro de 1-1,5Å de desviación RMS. Para la secuencia de la región V_K de BATTR_{K_A}, la sustitución de Tyr por Phe en la posición 71 (en FR3) significa que ya no se ajustó a la clase canónica (Clase 1) observada en la región V_K murina y la región V_K de BATTR_{K_B} humanizado. Tyr71 tuvo una función importante en la conformación del bucle L1, sin embargo, el análisis de las estructuras modeladas sugirió que era el relleno del bucle L1 contra el anillo aromático de Tyr el que era la característica clave del residuo. Así, hubo un motivo para creer que

Phe también podría realizar esta función. Además, a partir de los modelos no pareció que hubiera ninguna fuerte interacción con el grupo hidroxilo de Tyr71. Por consiguiente, hubo una posibilidad de que la sustitución de Tyr con Phe pudiera no haber afectado la conformación real del bucle L1.

5 Para las estructuras de esqueleto de CDR L2, L3, H1 y H2, las conformaciones para todos los modelos se tomaron de clases canónicas definidas por *AbM* sin modificación.

10 El bucle H3 en la región V_H de BAT-1 tuvo ocho residuos de longitud, de manera que se usaron dos métodos para predecir la estructura de bucle H3. Se usó una búsqueda en base de datos de las conformaciones de esqueleto para ambos métodos, pero además, la conformación de los cinco residuos centrales en el modelo se buscó más minuciosamente usando una búsqueda CONGEN (Bruccleri, arriba). Aunque esta duró más calcularla, produjo tranquilizadamente una conformación que era muy similar a aquella identificada a partir de la búsqueda en bases de datos.

15 Después de ajustar el conjunto del modelo para choques estéricos obvios, finalmente se sometió a minimización de energía, como se ha implementado en MACROMODEL, tanto para aliviar contactos atómicos desfavorables como para optimizar interacciones de van der Waals y electrostáticas.

20 **Ejemplo 6**

Construcción de variantes de la cadena ligera de BAT-1 humanizado

25 Al igual que en todos los ejemplos, se siguió un estricto protocolo de clonación por PCR y secuenciación. Esto se hizo para minimizar la posibilidad de introducir errores en las versiones humanizadas. La construcción de los genes de la región variable de la cadena ligera kappa de BAT-1 humanizado (es decir, $BATR_{KA}$, $BATR_{KB}$ y $BATR_{KD}$) produjo un producto de aproximadamente 425 pb que luego se subclonó en pCR2.1™. Las reacciones de PCR se establecieron usando los cebadores descritos en las Tablas 9 y 10.

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 9

Nombre del cebador	SEC ID N°	Oligonucleótido usado en la construcción de las diversas versiones humanizadas del gen de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo BAT-1 (5' → 3')
BATrk.1	30	CCCAAGCTTCCCGCCACCATG GACATGAGGGTCCCGGCTCAG C
BATrk.2	31	TCTGGGGTCTCTGCTGCTCT GGCTCCAGGTGCCAAATG
BATrk.3	32	TGAAATTGTG TTGAGGCAG TC TCATCCTCCCTGCTGCA
BATrk.4	33	TCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCAGTCCAGGT
BATrk.5	34	CAAGTGAAGTTACATGCACT GG TATCAGCAGAAACCAGG
BATrk.6	35	GAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATAGGACATCCAACCTG
BATrk.7	36	GCTTCTGGGTCCCATCTAGA TTCAGCGGCAGTGGATCTG
BATrk.8	37	GGACAGATTTCACTCTCACCA TCAACAGCCTGCAGCCTGA
BATrk.9	38	AGATTTGCAACTTACTATTG CCAGCAAAGGAGTAGTTTC
BATrk.10	39	CCACTCACGTTGGGGAGGG ACCAAGCTGGAGATCAAAACGT
		GAGTGGATCCGGG
BATrk.11	40	GAGCAGCAGGAGCCCCAGGAG CTGAGCGGGGACCCCTCATG
BATrk.12	41	ACTGCGTCAACACAATTCAC ATTTGGCACCTGGGAGCCA
BATrk.13	42	GTGACTGTCTCTCC TAGAGAT GCAGACAGGGAGGATGGAG
BATrk.14	43	GTGCATGTAAC TTACACTTGACCTGGCAGTGC AAGTGATG
BATrk.15	44	TCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCTGCTGATACCA
BATrk.16	45	CTAGATGGACCCCCAGAACCCAGGTTGGATGCCATAGA
BATrk.17	46	GGTGAGAGTGAATCTGTCCAGATCCACTGCCGCTGAAT
BATrk.18	47	AATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGTTGAT
BATrk.19	48	CCTCCGCCGAAG TGAGTGGGAAACTACTCCTTTGCTGGC
BATrk.20	49	CGCGATCCACTCACG TTTGATCTCCAGCTTGGTC
BATrk.5B	50	CAAGTGAAGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAACCAGG
BATrk.6B	51	GAAGCCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG
BATrk.8B	52	GGACAGATTACACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGA
BATrk.15B	53	TCCAGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTCTGCTGGAACCA
BATrk.17B	54	GGTGAGAGTGAATCTGTCCAGATCCACTGCCGCTGAAC
BATrk.17D	55	GGTGAGACAGTAAGATGTCCAGATCCACTGCCGCTGAAC
BATrk.8D	56	GGACATCTTACTGTCTCCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGA

TABLA 10

Variante de BAT-1 humanizado	Combinaciones de cebadores de oligonucleótidos ¹ usadas para la construcción de la cadena ligera kappa de cada variante ²				
5 BATR_{kA}	BATR _{k.1}	BATR _{k.2}	BATR _{k.3}	BATR _{k.4}	BATR _{k.5}
	BATR _{k.6}	BATR _{k.7}	BATR _{k.8}	BATR _{k.9}	BATR _{k.10}
	BATR _{k.11}	BATR _{k.12}	BATR _{k.13}	BATR _{k.14}	BATR _{k.15}
	BATR _{k.16}	BATR _{k.17}	BATR _{k.18}	BATR _{k.19}	BATR _{k.20}
10 BATR_{kB}	BATR _{k.1}	BATR _{k.2}	BATR _{k.3}	BATR _{k.4}	BATR _{k.5B}
	BATR _{k.6B}	BATR _{k.7}	BATR _{k.8B}	BATR _{k.9}	BATR _{k.10}
	BATR _{k.11}	BATR _{k.12}	BATR _{k.13}	BATR _{k.14}	BATR _{k.15B}
	BATR _{k.16}	BATR _{k.17B}	BATR _{k.18}	BATR _{k.19}	BATR _{k.20}
15 BATR_{kD}	BATR _{k.1}	BATR _{k.2}	BATR _{k.3}	BATR _{k.4}	BATR _{k.5B}
	BATR _{k.6B}	BATR _{k.7}	BATR _{k.8D}	BATR _{k.9}	BATR _{k.10}
	BATR _{k.11}	BATR _{k.12}	BATR _{k.13}	BATR _{k.14}	BATR _{k.15B}
	BATR _{k.16}	BATR _{k.17D}	BATR _{k.18}	BATR _{k.19}	BATR _{k.20}

¹Las secuencias de oligonucleótidos se dan en la Tabla 9.

²También se usaron los cebadores de oligonucleótidos BATR_{k.1} y BATR_{k.20} como los cebadores de amplificación externos.

Se identificaron transformantes positivos putativos usando el ensayo de cribado de PCR, digestión con restricción y a continuación se secuenció el ADNbc. A continuación, los genes V_k humanizados (FIGS. 7-9; SEC ID N^o. 15, 16 y 18) se subclonaron en plásmidos de expresión.

La construcción pKN110 de la cadena ligera incluyó genes de resistencia a ampicilina y neomicina. Las variantes del gen V_k humanizado de BAT-1 (es decir, BATR_{kA}, BATR_{kB} y BATR_{kD}) se insertaron entre el promotor temprano inmediato del HCMV y la región constante kappa humana genómica, produciendo los siguientes vectores de expresión: pKN110-BATR_{kA}, pKN110-BATR_{kB} y pKN110-BATR_{kD}, respectivamente (véase la FIG. 10 para un vector pKN110-BATR_{kD} representativo).

El casete de expresión de la cadena ligera de BAT-1 insertado en un vector de expresión incluyó un fragmento de ADN que codifica una secuencia de péptidos señal de inmunoglobulina de ratón, secuencia de Kozak y un intrón de la secuencia señal que se añadió a ambos lados de las variantes del gen V_k humanizado de BAT-1 (FIG. 11). Este casete se insertó entre el promotor temprano inmediato del HCMV y la región constante kappa humana genómica. El vector de expresión de la cadena ligera completa también incluyó un terminador de poliA de BGH de la transcripción y un marcador de selección de Neo/G418. Todas las construcciones se digirieron con enzimas de restricción y se secuenciaron con ADNbc para confirmar la presencia del inserto correcto.

Ejemplo 7

Construcción de variantes de la cadena pesada de BAT-1 humanizado

La construcción de las diversas versiones de los genes de la región variable de la cadena de pesada de BAT-1 humano remodelado (es decir, BATRH_A, BATRH_B, BATRH_C) produjo un producto de aproximadamente 450 pb que luego se subclonó en pCR2.1TM. Las reacciones de PCR se establecieron usando los cebadores descritos en las Tablas 11 y 12.

Se identificaron de nuevo transformantes positivos putativos en un cribado por PCR y a continuación se secuenciaron con ADNbc. A continuación, los genes V_H humanizados (SEC ID N^o. 20-22) se subclonaron en vectores de expresión.

La construcción pG1D110 de la cadena pesada incluyó el gen de resistencia a ampicilina y dhfr de hámster como marcador de selección. Las variantes del gen V_H humanizado de BAT-1 se insertaron entre el promotor temprano inmediato del HCMV y la región constante de IgG1 humana genómica produciendo los siguientes vectores de expresión: pG1D110-BATRH_A, pG1D110-BATRH_B, pG1D110-BATRH_C (véase la FIG. 15 para un vector pG1D110.BAT-1.RH_C representativo).

El casete de expresión de la cadena pesada de BAT-1 se insertó en un vector de expresión que incluyó un fragmento de ADN que codifica una secuencia de péptidos señal de inmunoglobulina de ratón, secuencia de Kozak y un intrón de la secuencia señal que se añadió a ambos lados de las variantes del gen V_k humanizado de BAT-1 (FIG. 16). Este casete se insertó entre el promotor temprano inmediato del HCMV y la región constante de IgG1 humana genómica. El vector de expresión de la cadena ligera completa también incluyó un terminador de poliA de BGH de la transcripción y un marcador de selección de dhfr.

Los vectores de expresión resultantes se digirieron con enzimas de restricción para confirmar la presencia del inserto correcto.

TABLA 11
Oligonucleótido usado en la construcción de los diversos genes de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo BAT-1 humanizado (5' → 3')

Nombre del cebador	SEC ID N°	Oligonucleótido
BATRH.1	57	CCCAAGCTGCCGCCACCATG GACTGGACCTGGAGGATCC
BATRH.2	58	TCCTCTGGTGGCAGCAGCAA CAGGTGCCCACT
BATRH.3	59	CCCAGGTGCAGCTGGTGCAAT CTGGGTCTGAGCTTAAGAA
BATRH.4	60	GCCTGGGCCCTCAGTGAAGAT CTCCTGCAAGGCTTCTGGA
BATRH.5	61	TATAGCTTCAGTAACTATGGA ATGAACTGGGTGCGACAGG
BATRH.6	62	CCCCTGGACAAGGGCTTCAGT GGATGGGATGGATAAACAC
BATRH.7	63	CGACAGTGGAGAGTCAACATA TGCTGAAGAGTCAAGGGA
BATRH.8	64	CGGTTTCTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAACACGGCAT
BATRH.9	65	ATCTGCAGATCACAGCCTCA CGGCTGAGGACACTGGCAT
BATRH.10	66	GTATTTCTGTGGAAAGTCGG CTACGATGCTTTGG
BATRH.11	67	ACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAGGTG
BATRH.12	68	AGTGGATCCGGG TGCTGCCACCAAGAAAGAGGAT CCTTCCAGGTGGAGTCCATGG
BATRH.13	69	TGG TTGCACAGCTGCACCTGGGA GTGGGCACCTGTTGC
BATRH.14	70	TCTTCACTGAGGCCCCAGGCT TCTTAAGCTCAGACCCAGA
BATRH.15	71	CCATAGTTACTGAAGCTATAT CCAGAAGCTTGCAGGAGA
BATRH.16	72	CTGAAGCCCTTGCCAGGGGC CTGTCCGACCCAGTTTCATT
BATRH.17	73	ATGTTGACTCTCCACTGTCCG TGTTTATCCATCCCATCCA
BATRH.18	74	TCCAAGGAGAAGACAAACCCG CCGTTGAACTCTTCAGCAT
BATRH.19	75	GAGGCTGGTGATCTGCAGATA TGCCAGTGTCTCAGAGGTG
BATRH.20	76	CGACTTTCGCACAGAAATACA TGCCAGTGTCTCAGCCCGT
BATRH.21	77	TTCCCTGGCCCCAGTAGTCCA AAGCATCGTAGC
BATRH.22	78	CGCGGATCCACTCACCTGAGG AGACGGTGACCAGGG
BATRH.5B	79	TATACTTTCACAAACTATGGA ATGAACTGGGTGGACAGG
BATRH.15B	80	CCATAGTTTGTGAAAGTATAT CCAGAAGCTTGCAGGAGA
BATRH.8C	81	CGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAACACGGCAT
BATRH.10C	82	GTATTTCTGTGAGAGTCCG CTACGATGCTTTGG
BATRH.20C	83	CGACTCTCACACAGAAATACATG CCAGTGTCTCAGCCCGT
BATRH.9C	84	ATCTGCAGATCACAGCC TC AACGGTGAAGACACTGGCAT
BATRH.19C	85	GAGGCTGGTGATCTGCAGAT ATGCCGTTGACAGAGGTG
BATRH.5C	86	TATACITTCACAAACTATGG AATGAACTGGGTGAAGCAGG

TABLA 12

	Variante de BAT-1 humanizado	Combinaciones de cebadores de oligonucleótidos ¹ usadas para la construcción de la cadena pesada de cada variante ²				
5	BATRH_A	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5
		BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8	BATRH.9	BATRH.10
		BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15
		BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
		BATRH.21	BATRH.22			
10	BATRH_B	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5B
		BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8	BATRH.9	BATRH.10
		BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15B
		BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
		BATRH.21	BATRH.22			
15	BATRH_C	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5C
		BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8C	BATRH.9	BATRH.10
		BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15C
		BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
		BATRH.21	BATRH.22			

¹Las secuencias de oligonucleótidos se dan en la Tabla 11.

²También se usaron los cebadores de oligonucleótidos BATRH.1 y BATRH.22 como los cebadores de amplificación externos.

Ejemplo 8

25

Construcción del anticuerpo completo BAT-1 RH_C/RK_D γ 1 en un único vector de expresión

Con el fin de maximizar los niveles de expresión que pueden lograrse para el anticuerpo BAT-1 γ 1, se decidió eliminar un intrón de la construcción pG1D110.BAT-1.RH_C (descrita en el Ejemplo 7, véase la FIG. 15) antes de hacer la construcción de vector único de BAT-1 γ 1. Este procedimiento se llevó a cabo del siguiente modo.

30

pG1D200 es otro vector de expresión de mamífero de la cadena pesada de la inmunoglobulina γ 1 (AERES Biomedical; FIG. 17). Este vector es una versión de intrón V_H:C_H γ 1 menos del vector pG1D110 (es decir, no tiene el intrón de 71 pb en la unión V_H:C_H).

35

Con el fin de convertir la construcción pG1D110.BAT-1.RH_C en una construcción, se escindió un fragmento *Bst*EII (219 pb) del vector pG1D200 y se purificó en gel usando un kit de extracción/purificación en gel Qiagen. Este fragmento contuvo la unión V_H:C_H de intrón menos.

40

La construcción pG1D110.BAT-1.RH_C (FIG. 15) también se digirió con restricción con *Bst*EII, liberando un fragmento de 290 pb que contuvo la unión V_H:C_H de intrón más. El fragmento de vector restante (~7207 pb) se purificó en gel usando un kit de extracción/purificación en gel Qiagen.

45

El fragmento *Bst*EII de intrón menos (219 pb) de la digestión con el vector pG1D200 se ligó entonces en el vector pG1D110.BAT-1.RH_C digerido con *Bst*EII de ~7207 pb. Se transformaron 2 μ l de ADN ligado en células DH5 α (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se preparó ADN de plásmido a partir de 10 colonias y cada ADN de plásmido se analizó para la presencia del fragmento de *Bst*EII correcto por análisis de secuencias de ADN.

50

Tras la identificación de un clon perfecto, la nueva construcción de intrón menos (pG1D210.BAT-1.RH_C) y la construcción de cadena ligera pKN110.BAT.RK_D (véase FIG. 10) se usaron para construir el vector de expresión individual pG1KD210.BAT-1.RH_C/RK_D (SEC ID N^o. 93).

55

Los componentes de este vector de expresión único pG1KD210.BAT-1.RH_C/RK_D dentro de SEC ID N^o 93 están localizados del siguiente modo:

60

1. Intervalo de nucleótidos: 1 a 2502 - pBR322 (secuencia basada en pBR322 que incluye el gen de resistencia a Amp y origen ColEI más el origen SV40 y promotor temprano del SV40 dañado)
2. Intervalo de nucleótidos: 206 a 1067 - Amp (gen de resistencia a ampicilina)
3. Posición: 1824 - ColE1
4. Intervalo de nucleótidos: 2502 a 3227 - DHFR (gen dihidrofolato reductasa)
5. Intervalo de nucleótidos: 3233 a 4074 - poliA del SV40 (secuencia de poli A del SV40, etc.)
6. Intervalo de nucleótidos: 4109 a 5649 - HCMVi (promotor del HCMVi)
7. Intervalo de nucleótidos: 5662 a 6067- BAT rKd

65

Región variable de la cadena ligera kappa de BAT remodelado

8. Intervalo de nucleótidos: 6073 a 6720 - HuK (copia de ADNc del gen de la región constante kappa humana (Km(3)))
 9. Intervalo de nucleótidos: 6726 a 6943 - spaC2 Secuencia de terminación de spaC2 artificial
 10. Intervalo de nucleótidos: 6949 a 8489 - HCMVi (promotor del HCMVi)
 11. 12. Intervalo de nucleótidos: 8502 a 8923 - BAT rHc

Región variable de la cadena pesada de BAT remodelado

13. Intervalo de nucleótidos: 8924 a 10297 - HG1 (regiones constantes de gamma-1 humanas precedidas por un intrón de 60 pb y seguidas de la secuencia de terminación 'Arnie')

El casete de expresión de la cadena ligera kappa de BAT-1 que contuvo el promotor del HCMVi, el gen de la región variable de la cadena ligera kappa de BAT-1 y el gen de la región constante kappa de la cadena ligera se digirió con enzimas de restricción (*EcoRI* /*SpeI*) fuera de la construcción pKN110.BAT-1.RK_D y posteriormente se ligó en la construcción pG1D210.BAT-1.RH_C mediante los sitios de restricción *EcoRI* y *SpeI* únicos. Esta ligación produjo la construcción del vector de expresión individual pG1KD210.BAT-1.RH_C/RK_D, que contuvo tanto las cadenas pesadas como ligeras kappa del anticuerpo humanizado BAT-1 RH_C/RK_D (FIG. 18). Se transformaron 2 µl de ADN ligado en células DH5α (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se preparó ADN de Mini prep a partir de diez colonias y cada ADN de plásmido se analizó para la presencia de la construcción de expresión única correcta por análisis de digestión con restricción. Se eligió un clon de una construcción de expresión individual correcta para la expresión transitoria del anticuerpo BAT-1 gamma-1 en células COS como se ilustrará en el Ejemplo 11.

Ejemplo 9

Construcción de la variante del anticuerpo completo BAT-1.RH_C/RK_D gamma-1 (γ1) en un vector de expresión único

Se transfirió la región variable de la cadena pesada de BATH_C al vector de expresión combinado (individual) como fragmento *XhoI* a *HindIII*. La región variable de la cadena ligera de BATH_D se transfirió al vector de expresión combinado (único) como un fragmento *XbaI* a *BamHI*. El sitio *XbaI* interno en el gen de la cadena ligera se eliminó sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Se confirmaron las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de BAT-1.RK_D/BAT-1.RH_C en este vector. El vector incluye regiones constantes de IgG1 humana genéticas y kappa. Tanto los genes de la cadena pesada como ligera se pusieron bajo el control del promotor temprano inmediato del HCMV. El vector incluye un gen dhfr de ratón como marcador de selección (véase la FIG. 19). La misma secuencia de Kozak, secuencia de péptidos señal e intrón se añadieron en cuanto al sistema de expresión de dos vectores (véanse los Ejemplos 6 y 7).

Ejemplo 10

Construcción de BAT-1 gamma-4 (γ4) PG4KD110.BAT-1. RH_C/RK_D en un vector individual

La primera etapa en la construcción de la construcción del vector de expresión único BAT-1 γ4 fue la clonación del gen BAT-1.RH_C modificado fuera de la construcción pG1D110.BAT-1.RH_C (FIG. 14) por digestión con restricción con *BamHI* y *HindIII*, y la ligación de este fragmento de 430 pb en el vector de expresión de la cadena pesada de la inmunoglobulina gamma-4 pG4D110, de nuevo mediante sitios de restricción *BamHI* y *HindIII*.

Se transformaron 2 µl de ADN ligado en células DH5α (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se preparó ADN de plásmido a partir de 10 colonias y cada ADN de plásmido se analizó para la presencia del fragmento *BamHI/HindIII* de BAT-1.RH_C correcto por análisis de secuencias de ADN.

Tras la identificación de un clon perfecto, la nueva construcción de gamma-4 (pG4D110.BAT-1.RH_C) y la construcción de cadena ligera pKN110.BAT-1.RK_D (FIG. 10) se usaron para construir el vector de expresión individual pG4KD110.BAT-1.HR_C/RK_D del siguiente modo.

El casete de expresión de la cadena ligera kappa de BAT-1 que contuvo el promotor del HCMVi, el gen de la región variable de la cadena ligera kappa de BAT-1 y el gen de la región constante kappa de la cadena ligera se digirió con enzimas de restricción (*EcoRI* /*SpeI*) fuera de la construcción pKN110.BAT-1.RK_D y posteriormente se ligó en la construcción pG4D110.BAT-1.RH_C mediante los sitios de restricción *EcoRI* y *SpeI* únicos. Esta ligación produjo la construcción de una construcción de vector de expresión único pG4KD110.BAT-1.RH_C/RK_D, que contuvo tanto las cadenas pesadas como ligeras kappa de la variante RH_C/RK_D del anticuerpo humanizado BAT-1. Se transformaron 2 µl de ADN ligado en células DH5α (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se preparó ADN de Mini prep a partir de diez colonias y cada ADN de plásmido se analizó para la presencia de la construcción de vector de expresión único correcta por análisis de digestión con restricción. La construcción de vector de expresión único

correcta digerida con *Bam*HI y con *Hind*III liberó un fragmento de 2864 pb y el digesto *Hind*III liberó un fragmento de 2840 pb. Se eligió un clon para la expresión transitoria del anticuerpo BAT-1 gamma-4 en células COS.

Ejemplo 11

Co-transfección de vectores de la cadena ligera y pesada de BAT-1 humanizado, y expresión transitoria de las variantes de BAT-1 humanizado en células COS7

Se co-transfectaron los vectores de expresión de la cadena pesada (pG1D110) y ligera (pKN110; Ejemplo 7) de BAT-1 humanizado, en diversas combinaciones, en células COS7 y después de 72 h de incubación, el medio se recogió, se centrifugó para eliminar el residuo celular, se filtró y se analizó por ELISA para la producción de anticuerpos humanizados. La concentración de anticuerpo humanizado en los sobrenadantes de células COS7 varió con cada combinación de construcciones de anticuerpo BAT-1 humano remodelado que se probaron (Tabla 13). Por ejemplo, la versión BATH_B/BATR_{K_A} expresó los mayores niveles de anticuerpo (4800 ng/ml), mientras que la versión BATH_B/BATR_{K_D} fue la menos expresora (357 ng/ml).

Ejemplo 12

Purificación de las variantes de BAT-1 humanizado de células COS7

Recogiendo aproximadamente 8 ml por co-transfección (véase Ejemplo 11), se llevaron a cabo una serie de transfecciones hasta que se habían recogido más de 200 ml de sobrenadante de COS7. El volumen de este sobrenadante se redujo a 10 ml pasando el sobrenadante a través de una celda de ultra-filtración con agitación con una membrana de filtro PM30 - que tenía un corte de peso molecular de 30 kDa.

El kit de purificación de IgG Inmunopure®(A) comprendió esencialmente una columna de 2 ml de columna de proteína A-Sepharose inmovilizada. El anticuerpo se eluyó de la columna con 5 ml de tampón de elución, cuyo eluato se recogió en fracciones de 1 ml. La concentración de anticuerpo BAT-1 humanizado en cada fracción se ensayó entonces usando métodos de ELISA. La Tabla 13 describe las concentraciones finales de las construcciones de anticuerpo purificado en proteína A recogidas. En promedio, la etapa de purificación aumentó la concentración de anticuerpo aproximadamente 150 veces.

TABLA 13

Ejemplo 13	Cadena de anticuerpo		Concentraciones de anticuerpo quimérico y hBAT-1 en sobrenadantes de células COS7 (experimentos de expresión transitoria)	
	Pesada	Ligera kappa	Sobrenadantes en bruto (µg/ml)	Después de la purificación en proteína A (µg/ml)
	BATCH	BATR _K	0,358	50
	BATH _A	BATR _{K_A}	2,350	110
	BATH _B	BATR _{K_A}	4,800	211
	BATH _B	BATR _{K_B}	0,757	149
	BATH _C	BATR _{K_B}	1,250	137
	BATH _B	BATR _{K_D}	0,357	112
	BATH _C	BATR _{K_D}	0,718	122

Análisis de unión de células de Daudi a las variantes de BAT-1 humanizado producidas en células COS7

Usando el ELISA de células de Daudi fue evidente que las diferentes versiones del anticuerpo BAT-1 humanizado purificado en proteína A se unieron a células de Daudi a diversos grados. Las FIG. 20-23 muestran ejemplos típicos para estos experimentos de unión. También se representaron curvas sigmoideas de dosis-respuesta de la unión de células Daudi por los anticuerpos recombinantes y se calcularon las pendientes de las cimas de estas curvas de unión. La combinación de los datos de las pendientes de las cimas y las posiciones de las curvas de dosis-respuesta con respecto a las curvas de dosis-respuesta del anticuerpo quimérico sugirieron una jerarquía cualitativa con respecto a la unión de células de Daudi entre las diversas construcciones de anticuerpo BAT-1 humanizado probadas (Tabla 14). En la parte superior de esta jerarquía estaba claramente la construcción BATH_C/BATR_{K_D}, que presentó una pendiente de la cima (es decir, $0,8818 \pm 0,1107$) muy similar a su control de anticuerpo BAT-1 quimérico (es decir, $0,8248 \pm 0,1210$) y siguió estrechamente la curva de dosis-respuesta del control quimérico. Aunque la construcción BATH_C/BATR_{K_B} mostró una pendiente de la cima más empinada (es decir, $0,6408 \pm 0,1622$) que el mismo control de anticuerpo BAT-1 quimérico (es decir, $0,8248 \pm 0,1210$), como se ha calculado a partir de los datos de unión disponibles, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Además, es evidente de la FIG. 22 que la curva de dosis-respuesta para esta construcción no es tan buena como para la construcción BATH_C/BATR_{K_D} y, por tanto, se clasificó segunda en la jerarquía de unión.

En cambio, la construcción BATH_A/BATR_{K_A} tiene claramente las peores características de unión de todas las construcciones de anticuerpo BAT-1 humanizado probadas (Tabla 14) y así se clasificó la sexta en la jerarquía de unión. Aunque la pendiente de la cima calculada para esta versión (es decir, $1,2730 \pm 0,2688$) es evidentemente mejor que la construcción humanizada muy similar BATH_B/BATR_{K_A} (es decir, $1,7710 \pm 0,6461$), esta diferencia no

es de nuevo estadísticamente significativa. Además, es evidente de la FIG. 21 que el anticuerpo BAT-1 BATH_A/BATR_{KA} con CDR injertadas está alcanzando su respuesta de unión máxima a nivel mucho menor que la construcción BATH_B/BATR_{KA} humanizada - que se clasificó la quinta en la jerarquía de unión.

5 Las construcciones BATH_B/BATR_{KB} (FIG. 20; clasificada la cuarta) y BATH_B/BATR_{KD} (FIG. 23; clasificada la tercera) muestran niveles intermedios de unión entre estos dos conjuntos de extremos. De nuevo, estas clasificaciones se basaron principalmente en una interpretación subjetiva de los datos de unión disponibles y experiencia previa.

10 **TABLA 14**

15 **Afinidades de unión relativas de las construcciones de anticuerpos BAT-1 humanizados frente a quiméricos purificados en proteína A recogidos tras la expresión transitoria en células COS**

Número de experimento	Cadena pesada	Cadena ligera kappa	Pendiente de la cima ± EEM ^a	Jerarquía de unión del análisis de la pendiente de la cima
1	BATH	BATR _K	0,5422 ± 0,2911	-
	BATH _A	BATR _{KA}	1,273 ± 0,2688	6
	BATH _B	BATR _{KA}	1,771 ± 0,6461	5
2	BATH	BATR _K	0,8057 ± 0,0849	-
	BATH _B	BATR _{KD}	0,6555 ± 0,1252	3
3	BATH	BATR _K	0,8248 ± 0,1210	-
	BATH _C	BATR _{KB}	0,6408 ± 0,1622	2
	BATH _C	BATR _{KD}	0,8818 ± 0,1107	1
4	BATH	BATR _K	0,7090 ± 0,2768	-
	BATH _B	BATR _{KB}	0,7796 ± 0,3420	4

25 ^aMedia del error estándar de 3 ELISA duplicados de células de Daudi calculada después de ajustar los datos de ELISA a una curva sigmoidea de dosis-respuesta.

30 **Ejemplo 14**

Expresión transitoria de la variante R_{KD}/R_{Hc} de BAT-1 por co-transfección o por transfección individual de células COS

35 Se siguió el método de Kettleborough (Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 23:206, 1993) para transfectar las construcciones de expresión en mamífero en células COS. Brevemente, se añadió ADN (10 µg de cada una de la construcción de expresión de la cadena ligera kappa pKN110.BAT-1.R_{KD} y la construcción de expresión de la cadena pesada pG1D210.BAT-1.R_{Hc}, o 13 µg de la construcción de vector único pG1KD210.BAT-1.R_{Hc}/R_{KD}) a una alícuota a 0,7 ml de 10⁷ células/ml en PBS y se pulsó a 1900 V, 25 µF de capacitancia, usando un aparato Bio-Rad Gene Pulser. Tras una recuperación de 10 minutos a temperatura ambiente, las células electroporadas se transfirieron a placas de Petri que contenían 8 ml de DMEM que contenía 10 % de FCS y se incubaron durante 72 h en 5 % de CO₂ a 37 °C. Después de 72 h de incubación, el medio se recogió, se centrifugó para eliminar el residuo celular y se analizó por ELISA de captura para la producción de anticuerpo. Las co-transfecciones, con vector de expresión de la cadena ligera y vector de expresión de la cadena pesada, y transfecciones con un vector único que expresa tanto las cadenas ligeras como pesadas, se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se presentan en la Tabla 15. Los resultados indican que los niveles de expresión del vector único son -6 veces superiores a los niveles de expresión observados para las co-transfecciones.

50 **TABLA 15**

Transfección nº	Construcción transfectada	Niveles de expresión transitoria de células COS para el anticuerpo BAT-1 γ1 (µg/ml)*
1	Vector individual	55,451
2	"	49,009
3	"	66,018
55	Vectores de la cadena ligera y pesada	9,06
	"	10,232
	"	9,536

*Los niveles de transfección de la variante de BAT-1 humanizado R_{Hc}/R_{KD}, de la co-transfección usando vectores pG1D110 y pKN110, fueron 0,718 µg/ml

Ejemplo 15

Transfección estable de células *CHOdhfr*- de mamífero con el vector único pG1KD210.BAT-1.RH_C/RK_D y producción de líneas celulares estables

Se propagaron células *CHOdhfr*- en un medio no selectivo que consistía en α -MEM con ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos, complementado con 10 % de clon fetal II y 50 μ g/ml de gentamicina. Se transfectó una alícuota, 0,7 ml, de 10^7 células/ml en PBS con 13 μ g de pG1.KD210.BAT-1.RH_C/RK_D a 1900 V, 25 μ F de capacitancia, usando un Bio-Rad Gene Pulser. Las células se dejaron recuperar durante 10 minutos a TA antes de transfectarse a placas de Petri de 10 cm en 8 ml de medio no selectivo y a continuación se incubaron en 5 % de CO₂ a 37 °C durante 48 horas.

Dos días después de la transfección, las células se tripsinaron, se centrifugaron y se resuspendieron en 150 ml de medio selectivo precalentado (α -MEM sin ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos, complementado con 10 % de FBS dializado y 50 μ g/ml de gentamicina, y que contenía tanto metotrexato 10 nM, 50 nM, 100 nM como 500 nM) antes de dividirse igualmente entre quince placas de Petri de 10 cm. A continuación, éstas se incubaron en 5 % de CO₂ a 37 °C durante 20-30 días, cambiándose el medio selectivo cada 3-4 días hasta que los focos fueron claramente visibles. Después de 2 semanas desde la transfección inicial, los focos empezaron a desarrollarse sobre las placas 10 nM. Ocho días después, se desarrolló un foco sobre las placas de 50 nM. No se desarrollaron otros focos después de 35 días sobre las placas 50 nM y no se desarrollaron focos sobre las placas de 100 nM o 500 nM.

Para "recoger" focos, cuadrados de 1 mm de papel de filtro Whatman 1MM se sumergieron primero en 0,05 % de tripsina, disolución al 0,02 % de EDTA. El medio selectivo se eliminó cuidadosamente de las placas de cultivo, que a continuación se lavaron cuidadosamente con 5 ml de PBS. A continuación, la PBS se eliminó y, usando pinzas estériles, los cuadrados de papel de filtro previamente empapados se colocaron cuidadosamente sobre el foco individual de las células. Se dejaron los cuadrados sobre los focos durante 15 segundos antes de transferirse a pocillos individuales de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos que contenía 1 ml del medio selectivo apropiado.

Se recogieron un total de 31 focos de gamma-1, 30 fueron de las placas de MTX 10 nM y uno fue de las placas de 50 nM. Estas células se dejaron crecer en medio selectivo hasta que fueron casi confluentes y el medio de pocillos individuales se probó para la producción de anticuerpos. Aquellos clones que producen anticuerpo humano se seleccionaron entonces para la expansión y análisis de producción específica. Los resultados de los ensayos de producción específica se presentan en la Tabla 16.

TABLA 16

Clon	Niveles de producción de células CHO específicas para la variante de anticuerpo completo BAT-1 γ 1 RH _C /RK _D (ng/10 ⁶ células/día)		
	Ensayo N ^o . 1	Ensayo N ^o . 2	Ensayo N ^o . 3
γ 1 B9	3284,7	2921,5	1227,1
γ 1 B10	297	1288	268,3
γ 1 B13	12443	5425,2	7731,53
γ 1 B18	6,5	10,4	4,9
γ 1 B19	199,7	26,9	43
γ 1 B15	5978,6	1657,1	3015,43
γ 1 D6	2539,2	1605,5	2072,40

Las tres líneas celulares (B9, B13 y B15) que mostraron los mejores niveles de productividad se analizaron adicionalmente y se monitorizaron durante tiempos de duplicación (véase la Tabla 17).

TABLA 17

Línea celular	Niveles de producción de las mejores líneas celulares CHO γ 1 (μ g/10 ⁶ células/día)	Tiempo de duplicación de las mejores líneas celulares CHO γ 1 (horas)
B9	3,5	22,5
B13	7,7	31,5
B15	3	21

Basándose en los niveles de productividad específicos y los tiempos de duplicación, se decidió empezar la producción de la cantidad de 500 μ g del anticuerpo BAT-1 γ 1 usando la línea celular B15.

Ejemplo 16

Expresión transitoria de la variante de BAT-1 γ 4 RH_C/RK_D en células COS por transfecciones únicas y co-transfecciones

Se siguió el método de Kettleborough et al. para transfectar las construcciones de expresión de mamífero en células COS. Brevemente, se añadió ADN (10 µg de cada una de la construcción de expresión de la cadena ligera kappa pKN110.BAT-1.RK_D y la construcción de expresión de la cadena pesada pG4D110.BAT-1.RH_C, o 13 µg de la superconstrucción de vector pG4D110.BAT-1.RH_C/RK_D) a una alícuota de 0,7 ml de 10⁷ células/ml en PBS y se pulsó a 1900 V, 25 µF de capacitancia, usando un aparato Bio-Rad Gene Pulser. Tras una recuperación de 10 minutos a TA, las células electroporadas se transfirieron a placas de Petri que contenían 8 ml de DMEM que contenían 10 % de FCS y se incubaron durante 72 h en 5 % de CO₂ a 37 °C. Después de 72 h de incubación, el medio se recogió, se centrifugó para eliminar los residuos celulares y se analizó por ELISA de captura para la producción de anticuerpos.

Tanto las co-transfecciones como las transfecciones únicas se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se presentan en la Tabla 18. Los resultados indican que los niveles de expresión de este vector de expresión individual son ~4 veces superiores a los niveles de expresión observados para las co-transfecciones.

TABLA 18

Transfección Nº	Construcción transfectada	Niveles de expresión transitoria en células COS para el anticuerpo BAT-1 γ4 (ng/ml)
1	Vector individual	519,3
2	"	522
3	"	567,2
1	Vectores de la cadena ligera y pesada	65,6
2	"	152,3
3	"	129,9

Ejemplo 17

Transfección estable de células *CHOdhfr*- de mamífero con el vector único pG4KD210.BAT-1.RH_C/RK_D y producción de líneas celulares estables

Se propagaron células *CHOdhfr*- en un medio no selectivo que consistía en α-MEM con ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos, complementado con 10 % de clon fetal II y 50 µg/ml de gentamicina. Se transfectó una alícuota, 0,7 ml, de 10⁷ células/ml en PBS con 13 µg de pG4KD110.BAT-1.RH_C/RK_D a 1900 V, 25 µF de capacitancia, usando un Bio-Rad Gene Pulser. Las células se dejaron recuperar durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de transfectarse a placas de Petri de 10 cm en 8 ml de medio no selectivo y a continuación se incubaron en 5 % de CO₂ a 37 °C durante 48 horas. Dos días tras esta incubación, las células se tripsinaron, se centrifugaron y se resuspendieron en 150 ml de medio selectivo precalentado (α-MEM sin ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos, complementado con 10 % de FBS dializado y 50 µg/ml de gentamicina, y que contenía tanto metotrexato 10 nM, 50 nM, 100 nM como 500 nM) antes de dividirse igualmente entre quince placas de Petri de 10 cm. A continuación, éstas se incubaron en 5 % de CO₂ a 37 °C durante 20-30 días, cambiándose el medio selectivo cada 3-4 días hasta que los focos fueron claramente visibles.

Después de 2 semanas, los focos empezaron a desarrollarse sobre las placas 10 nM. No se desarrollaron focos después de 35 días sobre las placas 50 nM y sobre las placas 100 nM o 500 nM. Los focos se recogieron como se ha descrito antes (Ejemplo 15) y aquellos clones seleccionados que producen anticuerpo humano se seleccionaron entonces para expansión y análisis de producción específica. Los resultados de los ensayos de producción específica se presentan en la Tabla 19.

TABLA 19

Clon	Niveles de producción de células CHO para el anticuerpo completo BAT-1 γ4 (ng/10 ⁶ células/día)		
	Ensayo Nº. 1	Ensayo Nº. 2	Ensayo Nº. 3
γ4 A9	4,8	6,08	5,7
γ4 A13	48,5	14,8	68,8
γ4 A12	60,7	77,0	52,7
γ4 C4	66,0	141,7	104,4
γ4 C8	41,7	52,4	77,6
γ4 C9	30,7	30,6	32,2
γ4 F2	40,7	17,9	29,30

Ejemplo 18

Co-transfección de células NSO con vectores de amplificación de la cadena pesada de BATH_C y de la cadena ligera de BAT_{K_D} y selección de líneas celulares productoras de anticuerpo

Se mezclaron vectores de expresión que contenían el casete de la cadena pesada de BATH_C (FIG. 16) y los casetes de la cadena ligera de BATH_D (FIG. 11) y se transfectaron en la línea de células huésped NS0 por electroporación.

Se distribuyeron células transfectadas en 10 placas de 96 pocillos en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y 1 mg/ml de medio G418 (gentamicina). Después de 10 a 14 días cuando se han desarrollado las colonias de células transfectadas, se ensayaron muestras de medio acondicionado de los pocillos para anticuerpo BAT-1 humanizado. Se recogieron células de los pocillos más productores y se expandieron en medio que incluía G418.

La transfección se repitió después de una semana como confirmación y para proporcionar más clones de células transfectadas para la selección. Después de 10 días se habían desarrollado colonias visibles de células transfectadas, y se cribó medio acondicionado de los pocillos para la producción de anticuerpos. Las placas de ELISA se recubrieron con anticuerpo de oveja anti-k humana. Se transfirieron muestras de 25 µl de medio de los pocillos a la placa de ELISA y se diluyeron a 100 µl en PBS Tween (PBST). El anticuerpo secundario fue oveja anti-IgG humana conjugado con HRP (cadena específica γ) y se desarrolló color con o-fenilendiamina (OPD). Se examinaron microscópicamente pocillos positivos y las células de los pocillos más productores se recogieron en 1,5 ml de DMEM complementado con 10 % de FBS y 1 mg/ml de G418 en placas de 24 pocillos. Se recogió un total de 15 colonias de alta producción de las dos transfecciones (Tabla 20). Dos líneas celulares independientes dieron niveles de producción de anticuerpo de aproximadamente 40 µg/ml o mayores.

Para la amplificación usando el gen *dhfr* en el vector de la cadena pesada, se han transferido dos líneas celulares de alta producción iniciales al medio (DMEM con 10 % de FCS y 1 mg/ml de G418) con metotrexato 0,02 µM añadido.

Ejemplo 19

Transfección de la línea de células huésped NS0 con un vector de amplificación único que contiene el gen BAT-1.RH_C/R_D γ1 y selección de líneas celulares productoras de anticuerpo

El vector de expresión de anticuerpo combinado (único) descrito en el Ejemplo 9 se transfectó en la línea de células huésped NS0 por electroporación.

Se distribuyeron células transfectadas en 10 placas de 96 pocillos en DMEM con 10 % de FBS. Después de 2 días se añadió una cantidad igual de medio con metotrexato 0,1 µM. La mitad del medio se cambió con el mismo volumen de medio que contenía MTX 0,1 µM cada 2 días hasta el 8º día después de la transfección. La transfección se repitió después de una semana como confirmación y para proporcionar más clones de células transfectadas para la selección. Después de 14-21 días se habían desarrollado colonias visibles de células transfectadas, y se cribó medio acondicionado de los pocillos para la producción de anticuerpos como se describe en el ejemplo anterior. Se examinaron microscópicamente pocillos positivos y las células de los pocillos más productores se recogieron en 1,5 ml de DMEM complementado con 10 % de FBS y metotrexato 0,1 µM en placas de 24 pocillos. Se recogieron un total de 13 colonias de alta producción de las dos transfecciones y se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido (Tabla 20). Seis líneas celulares independientes dieron niveles de producción de anticuerpo por encima de 40 µg/ml. Debido a la diferente selección, las líneas celulares que contenían el vector único fueron más lentas que aquellas que contenían los genes de anticuerpo sobre 2 vectores diferentes.

TABLA 20

Sistema de dos vectores		Sistema de vector único	
Línea celular	Nivel de producción (µg/ml)	Línea celular	Nivel de producción (µg/ml)
31E1	43	1B7	48
33E5	15	3E3	45
33B10	40	3H5	35
34F1	8	8H7	26
35C12	12,5	9D7	41
36G4	4	24B7	26
37H5	20	26A6	24
38E8	15	26D6	33
39A3	38	26E3	43
42G7	12	27B2	23
44F4	7	27C4	45
45C2	10	23E10	45
45H12	13	29E3	22
46A10	7		
49H2	15		

Un ejemplo representativo de las células productoras de BAT humanizado después de la transfección de una línea de células huésped NSO con un vector de amplificación único que contiene el gen BAT-1.RH_C/Rk_D γ 1 y selección de líneas celulares productoras de anticuerpo, es decir, línea celular clonada 1B7, se depositó en el banco de células ATCC usando el Formulario de Depósito del Tratado de Budapest el 9 de mayo de 2003 bajo el número de acceso ATCC n° (PTA-5189).

Ejemplo 20

Inhibición de BAT-1 de ratón por la variante de BAT-1.RH_C/Rk_D γ 1 humanizado

Para asegurar que la variante de BAT-1.RH_C/Rk_D γ 1 humanizado puede reconocer el mismo epítipo que el BAT-1 murino original, se realizó un ensayo de competición de unión a células de Daudi que expresan el epítipo de unión a BAT-1.

Se incubaron células de Daudi con cantidades crecientes de BAT-1 humanizado o BAT-1 de ratón como control (0-80 μ g/ml). Se desechó el anticuerpo sin unir y se añadió BAT-1 murino biotinilado (20 μ g/ml) a las células y se tiñeron con estreptavidina-FITC. La Figura 24 representa una disminución de la unión de BAT-1 murino en presencia de concentraciones crecientes de tanto el mAb humanizado como de ratón original, soportando el reconocimiento del mismo epítipo como era de esperar. Ambos anticuerpos muestran una dependencia de la dosis similar, con una Cl₅₀ de aproximadamente 10 μ g/ml, sugiriendo una afinidad de unión al antígeno similar.

Ejemplo 21

Efecto *in vivo* de BAT-1 humanizado en un modelo de tumor murino

Como se muestra en el ejemplo 20, el injerto de CDR que produce la formación del mAb BAT-1.RH_C/Rk_D γ 1 humanizado retuvo el reconocimiento del antígeno de BAT-1. Para examinar si esta unión puede transmitir los efectos biológicos característicos de BAT-1 murino, la eficacia de BAT-1 humanizado se estudió *in vivo*. Esto es de particular importancia en vista de la diferencia de isotipo entre el mAb de ratón y humano.

Se inocularon ratones C57BL con células de melanoma B16 para inducir metástasis de pulmón. Se inyectaron cantidades crecientes (1,10 y 20 μ g) de mAb humanizado en el día 12 después de la inoculación del tumor y en comparación con una dosis óptima de 10 μ g de BAT-1 murino. El peso del pulmón medido en el día 24 después de la inoculación del tumor se representa en la FIG. 25 y se corresponde con el establecimiento de un tumor. Tanto los ratones sin tratar como los ratones tratados con una IgG1 humana irrelevante del mismo isotipo tuvieron un peso de pulmón promedio de 0,9 g. El BAT-1 humanizado presentó una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento metastásico, produciéndose la mayor inhibición a una dosis baja de 1 μ g/ratón. Esto produjo una disminución del 67 % en la masa tumoral y fue similar a la lograda por una dosis óptima de BAT-1 murino (62 %). Y, lo que es más importante, este efecto máximo se logró por una dosis diez veces menor del mAb humanizado, sugiriendo una mayor eficacia terapéutica de este anticuerpo en comparación con el mAb BAT-1 murino original.

Ejemplo 22

Inhibición de melanoma humano (SK-28) en ratones SCID por hBAT-1

Se ha mostrado que el mAb BAT-1 de ratón inhibe la formación de metástasis de tumor humano en presencia de linfocitos de la sangre periférica humana (hPBL). Para estimar la eficacia del mAb BAT-1.RH_C/Rk_D γ 1 humanizado en la inhibición de cáncer humano, el anticuerpo humanizado se estudió en un modelo que combina tanto tumores como linfocitos de origen humano. Se injertaron ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) con hPBL para restaurar la inmunocompetencia. Los ratones se expusieron a células de melanoma humano (SK-28) y se trataron con concentraciones crecientes del anticuerpo humanizado, se administraron en una única dosis i.v. en el día 11 después de la inoculación del tumor. La Fig 26 representa el peso de pulmón que se correlaciona con el número de metástasis observadas, como se mide en el día 23. Ambas concentraciones del anticuerpo humanizado indujeron la inhibición de tumor en presencia de hPBL. Como se ha observado en el modelo de tumor de ratón descrito anteriormente, el anticuerpo humanizado podría inhibir más eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*, en comparación con BAT-1 de ratón. Una dosis única de 1 μ g de este anticuerpo humanizado inhibió el crecimiento tumoral el 68 %, mostrando una mayor eficacia que 10 μ g del anticuerpo BAT-1 de ratón (30 %).

Ejemplo 23

Inmunoterapia de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal humano por el anticuerpo monoclonal mBAT-1 en ratones sin pelo

LIM6 y HM7 son dos sub- clones de la línea celular de CRC humano LS174T que se seleccionaron por su alta síntesis de mucina y potencial metastásico. Las células tumorales se inyectaron en el bazo expuesto de ratones sin

pelo anestesiados. Después de 1 minuto, los bazos se extrajeron y se cerraron las escisiones. Se administraron dosis bajas del anticuerpo BAT-1 murino y humanizado 12 días después y los ratones se sacrificaron 35 días después de la inoculación del tumor. Los hígados se pesaron, se contó el número de nódulos metastásicos y se procesó el tejido de hígado para estudio de histología e inmunohistoquímica.

Se encontró que el tratamiento con BAT-1, anticuerpos murinos y humanizados, fue eficaz en la inhibición del establecimiento de metástasis hepáticas en el modelo murino. El tratamiento con el anticuerpo BAT-1 de ratón previno el desarrollo de xenoinjertos de LIM-6. El peso promedio de los xenoinjertos de ratones tratados con BAT-1 y controles fueron de $0,14 \pm 0,17$ g y $0,98 \pm 1,12$ g, respectivamente ($P=0,004$). Células HM7 inyectadas a los ratones sin pelo produjeron un gran número de lesiones metastásicas voluminosas en el hígado que se previnieron por la administración única de BAT-1 murino y BAT-1 humanizado (Fig. 27). Se observó una disminución importante (superior al 40 %) en el número de nódulos metastásicos, concretamente de $134,5 \pm 34$ en los ratones de control a $8,36 \pm 3$ y $4,88 \pm 2$ en los ratones tratados con BAT-1 murino y BAT-1 humanizado, respectivamente. El tratamiento con BAT-1 previno la acumulación de linfocitos en el borde del tumor. La función de la infiltración de linfocitos alrededor del módulo metastásico puede relacionarse con el desenlace del cáncer y puede sugerir un mecanismo para la terapia de BAT-1.

Ejemplo 24

Co-localización de hBAT con CD4 y CD8

Se ha mostrado que BAT-1 de ratón se une a linfocitos humanos, reconociendo tanto subconjuntos CD4+ como CD8+. Para establecer la especificidad de unión del mAb BATRH_C/BATRK_D γ 1 humanizado (hBAT), se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBL) humana de la sangre de donantes normales, como se describe en el presente documento más adelante, y se analizó para la co-localización de hBAT con marcadores de linfocitos conocidos.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por Ficoll y se incubaron en placas de cultivo de tejido para eliminar células adherentes. Se seleccionaron PBL aislados sobre linfocitos por tamaño y granularidad y sobre células vivas por exclusión con yoduro de propidio (PI). La unión se realizó a 4 °C durante 1 h, y se determinó por citometría de flujo sobre linfocitos seleccionados.

En todas las muestras examinadas, al menos el 20 % de PBL presentaron unión a hBAT. La Figura 28 representa un ejemplo de unión a linfocitos de un donante seleccionado en el que el 50 % de los PBL aislados fueron positivos para hBAT, que incluye tanto células CD4+ (25 %) como células CD8+ (15 %). Dentro de estas subpoblaciones, la mayoría de las células CD4+, además de CD8+, se unieron al mAb hBAT (58 % y 71 %, respectivamente).

Ejemplo 25

Unión de hBAT a linfocitos B

El mAb BATRH_C/BATRK_D γ 1 humanizado (hBAT) se produjo contra las membranas de células de Daudi, una línea de células de linfoma de linfocitos B humano. Se aislaron PBL de donantes normales por Ficoll, como se ha descrito anteriormente, seguido de adherencia a placas de cultivo de tejido. Las células no adherentes se examinaron para la co-localización de hBAT con marcadores de linfocitos B que incluyen CD19 y CD20. La unión se realizó a 4 °C durante 1 h, y se determinó por citometría de flujo sobre linfocitos seleccionados. La Figura 29 representa la evaluación de la unión a las células de un donante normal representativo.

El 25-29 % de los linfocitos en la muestra fueron positivos para el mAb BAT humanizado. Estas células incluyeron la mayoría de los linfocitos B (70-75 %) como se demuestra por ambos marcadores independientes. 70 % de CD20+ fueron positivas para el mAb BAT humanizado (seleccionadas sobre R1 y PI negativa; Fig. 29A) y 75 % de CD19+ fueron negativas para el mAb BAT humanizado (seleccionadas sobre R1 y PI negativa). Los resultados sugieren que el resto de unión a BAT sobre la superficie celular podría ser común a linfocitos B periféricos.

Ejemplo 26

La unión de hBAT a linfocitos T CD4+ aumenta tras la activación de las células

La unión del anticuerpo BAT de ratón se ha correlacionado anteriormente con la activación de linfocitos. Esta actividad de unión se estudió adicionalmente para el mAb humano y se examinó el nivel de unión del mAb BAT humano a linfocitos T CD4+ humanos, sometidos a activación. Se aislaron células de un donante normal por selección negativa y se estimularon con perlas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 (5 μ l/ml). Este tratamiento se seleccionó con el fin de ejercer la activación policlonal mediante el receptor de linfocitos T y moléculas co-estimulantes.

Se examinaron células para la unión del mAb BATRH_C/BATRK_D γ 1 humanizado (hBAT) y anti-CD4 (4 °C, 1 h) en el día 0, 2 y 5 tras la activación (Fig. 30A, B y D). El análisis se realizó por citometría de flujo sobre células negativas

para tinción con PI. Los cuadrantes se determinaron por controles de isotipo.

La unión del mAb BATH_D/BATR_{KD} γ 1 humanizado a células CD4⁺ aumentó espectacularmente tras la activación (Fig. 30). Mientras que las células no activadas, en el día 0 (Fig. 30A) y en el día 5 (Fig. 30C), presentaron el 17-20 % de unión positiva a hBAT, el 52 % y el 77 % de las células CD4⁺ se unieron a hBAT en el día 2 (Fig. 30B) y el día 5 (Fig. 30D) de activación, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares con múltiples muestras y también pudo demostrarse para células CD8⁺. Esto demuestra que la unión de hBAT a linfocitos T aumenta tras la activación de TCR.

La dependencia de la dosis de esta activación se demostró por co-localización de hBAT con CD69. La activación de linfocitos T se caracteriza por la expresión superficial de células de diversas moléculas, algunas de las cuales se ha mostrado que participan en el proceso de activación. Se estudió hBAT para su co-expresión con diferentes marcadores que incluyen tanto moléculas de activación tempranas como tardías. CD69, un marcador de activación temprano, está regulado por incremento en linfocitos T tras la activación. Cuatro días tras la activación, las células se examinaron para la unión de hBAT y anti-CD69 (4 °C, 1 h). Se realizó análisis por citometría de flujo sobre células negativas para tinción por PI. Los cuadrantes se determinaron por controles de isotipo.

Una activación dependiente de la dosis de linfocitos T CD4⁺ de un donante normal se demuestra en la Figura 31. Tras la fuerte activación (5 μ l/ml de perlas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28; Fig. 31B), la mayoría de las células, que fueron capaces de unirse a hBAT (93 %), fueron células activadas y se identificaron por expresión de CD69. El elevado tiempo de activación también produjo un aumento de la unión a hBAT empezando en el día uno de activación. La dependencia del tiempo de activación también pudo demostrarse y produjo un aumento en la unión de hBAT empezando en el día uno de activación. De forma interesante, la unión de hBAT a tanto células CD4⁺ como CD8⁺ siguió siendo alta, incluso después de la disminución de CD69 (día 5), sugiriendo una correlación de la unión con múltiples etapas de la activación de linfocitos. La unión de hBAT a células CD69⁺ sugiere que la expresión de la proteína de unión hBAT se correlaciona con la activación temprana.

Ejemplo 27

Unión de hBAT a linfocitos T activados que expresan ligando de CD25 y CD40

CD25, el receptor de alta afinidad para IL2, es vital para la expansión de linfocitos T y normalmente es elevado sobre la superficie de células activadas. Cronológicamente de esto resulta la aparición de CD69 y su expresión se prolonga varios días después de la regulación por disminución de CD69.

Se aislaron linfocitos T CD4⁺ de un donante normal por selección negativa y se estimularon durante varios días con perlas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 (5 μ l/ml). Las células se examinaron para la unión de hBAT y anti-CD25 (4 °C, 1 h) en el día 0 (Fig. 32A), día 1 (Fig. 32B) y día 5 (Fig. 32D) de activación con respecto a los controles (día 0, Fig. 32A y día 5 de no activación, Fig. 32C). El análisis se realizó por citometría de flujo sobre células negativas para tinción con PI. Los cuadrantes se determinaron por controles de isotipo.

Tanto los linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ mostraron un aumento dependiente del tiempo en la expresión de CD25 tras la estimulación anti-CD3 y anti-CD28, empezando en el día 1 de estimulación. hBAT se co-localizó con CD25 sobre estas células activadas (Fig. 32).

La expresión de CD25 aumentó del 55 % de las células en el día 1 (Fig. 32B) al 93 % en el día 5 (Fig. 32D) tras la activación. En ambos momentos de tiempo, la mayoría de las células que se unieron a hBAT fueron CD25⁺ (85 % y 98 %, respectivamente).

La correlación con los marcadores de activación se extendió adicionalmente al marcador de activación tardía el ligando de CD40 (Fig. 33). La unión de hBAT se correlacionó positivamente con la expresión del ligando de CD40 en CD4⁺ (Fig. 33) y linfocitos T CD8⁺ en un modo dependiente del tiempo. Los resultados culminan sugiriendo que la activación de linfocitos T induce la expresión de la proteína de unión hBAT de un modo que se correlaciona con diferentes etapas de activación.

Ejemplo 28

hBAT aumenta la supervivencia de células CD4⁺ activadas

Para examinar si los linfocitos T activados pueden ser adicionalmente estimulados por hBAT, células CD4⁺ humanas se aislaron de donantes normales por selección negativa y se activaron con una concentración subóptima (0,25 μ g/ml) de perlas anti-CD3/CD28 (Fig. 34). Se añadió hBAT (0,5 μ g/ml) 2 días tras la activación y su efecto se evaluó determinando el número de células viables. Los resultados indican que hBAT indujo un aumento significativo en el número de células CD4⁺ viables aisladas de los dos donantes separados (Fig. 34A y B). Las células no estimuladas de control murieron en el plazo de ocho días desde el aislamiento, mientras que las células activadas se expandieron de un modo que es típico de linfocitos, comenzando con la proliferación celular seguida de una etapa

de número de células estables que conduce a una etapa dominada por muerte celular. La adición de hBAT potenció la expansión de célula CD4+ y aumentó el número de células 1,5 veces con respecto a las células en ausencia del mAb.

5 El hecho de que la eficacia del anticuerpo BAT *in vivo* sea elevada en presencia de tumor, junto con los resultados en el presente documento, sugiere que la elevada eficacia puede depender de la presencia de células diana BAT activadas. Se han observado linfocitos dirigidos contra antígenos de tumor en pacientes con cáncer, sin embargo ineficaces en la inhibición del crecimiento tumoral, y pueden servir de células diana para la actividad de BAT. Así, en vista de los resultados puede implicar que hBAT activa células CD4+ estimulando la proliferación celular y/o
10 inhibiendo la muerte celular.

Ejemplo 29

Unión de hBAT a líneas celulares de Daudi y Jurkat

15 Se produjo BAT-1 de ratón contra membranas de la línea de linfocitos B Daudi y se ha mostrado que se une a linfocitos T humanos. Para verificar la especificidad del anticuerpo humanizado, hBAT se examinó para su unión a dos líneas celulares humanas de origen mieloide: células de Daudi – una línea de linfoma de linfocitos B humanos y células de Jurkat - una línea de leucemia de linfocitos T humana. hBAT conjugado con FITC se incubó con células
20 Daudi y Jurkat a una concentración de 150 ug/ml (4 °C durante 1 h). La unión se determinó por citometría de flujo.

Ambas líneas celulares, Daudi (Fig. 35A) y Jurkat (Fig. 35B), se unieron al anticuerpo humanizado. Además, la mayoría de las células en cultivo de ambas líneas fueron capaces de unirse al anticuerpo. Una IgG1 humana del mismo isotipo sirvió de control negativo (Fig. 35; control de isotipo) y estableció el umbral de lectura. Ambas líneas celulares demostraron una intensidad similar de tinción de anticuerpo, sugiriendo que expresan un número similar de
25 moléculas de unión de hBAT.

Ejemplo 30

Unión de hBAT a PBL de pacientes con cáncer

30 Tras la observación de que hBAT puede unirse a linfocitos T humanos de donantes normales, los presentes inventores compararon su capacidad para unirse a linfocitos recogidos de pacientes con cáncer. Se aislaron PBL de la sangre de un paciente con cáncer de próstata por Ficoll, seguido de adherencia a placas de cultivo de tejido. Las
35 células no adherentes se examinaron para la unión de hBAT y marcadores de linfocitos. La unión se realizó a 4 °C durante 1 h, y se determinó por citometría de flujo sobre linfocitos seleccionados. Se usaron controles de isotipo para determinar los cuadrantes. Estos pacientes han recibido anteriormente terapia que frecuentemente afecta la presencia y el fenotipo de los linfocitos. La unión de hBAT a estas células es un requisito previo para su actividad y, como se representa en la Figura 36, se parece a la unión a linfocitos de donantes normales. Aunque los números
40 totales de linfocitos fueron bajos, hBAT podría todavía unirse a una gran proporción de subpoblaciones de linfocitos que los presentes inventores examinaron que incluían el 39 % de células CD4+, 60 % de células CD8+ y 68 % de linfocitos B.

Ejemplo 31

Reactividad cruzada de hBAT con tejidos humanos, de primate y murinos

45 El fin de este estudio era examinar la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal hBAT-1 con un intervalo de tejido humano normal. Este estudio implicó la prueba inmunohistoquímica del anticuerpo monoclonal contra un
50 intervalo de tejidos humanos. También se realizó una comparación de reactividad cruzada *in vitro* en tejidos de mono cinomolgo y ratones CD-1.

(i) Fuente de tejido

55 Los tejidos usados en este estudio se obtuvieron cada uno de tres donantes sin relacionar para minimizar las probabilidades de factores específicos de donante que afectan la unión al anticuerpo. El tejido humano se proporcionó por una fuente ética. Los tejidos de primate y murinos usados en este estudio se obtuvieron de dos animales de cada especie, por una fuente ética. El murino y primate son posibles sistemas de prueba que pueden evaluarse en estudios pre-clínicos de toxicología. Los tejidos seleccionados fueron aquellos especificados en los
60 Puntos a Considerar en la Fabricación y Prueba de Productos de Anticuerpos Monoclonales para Uso humano de la FDA (Oficina de Investigación y Revisión biológica. Centro para la Evaluación e Investigación biológica de la FDA. 1997) y las Normas que gobiernan los Medicamentos en la Comunidad Europea Vol. 3a (Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies Dec. 1994, 3AB4a). Todos los tejidos usados en esta investigación se congelaron criogénicamente en nitrógeno líquido y se guardaron a o por debajo de -70 °C hasta que se requirieron. Se prepararon secciones de criostato a un espesor nominal de 5 µm a 8 µm. El control positivo fue células Jurkat E6. Se
65 recogieron muestras de sangre fresca de 3 donantes y se prepararon extensiones en el día de uso.

(ii) Conjugación con FITC

5 El anticuerpo hBAT-1 monoclonal humanizado se conjugó con FITC por la Custom Antibody Services Division de Serotec Ltd (ISO 9001, Certificación) antes de empezar el estudio. La concentración final del anticuerpo conjugado fue 1,99 mg/ml.

10 La validación inicial de la metodología se realizó sobre tejido de control (línea celular Jurkat E6) para determinar la concentración en títulos para la unión de anticuerpo-tejido con secciones congeladas y otras condiciones relevantes para el apropiado rendimiento de la unión de anticuerpo-tejido. Los portaobjetos se examinaron microscópicamente y se puntuaron subjetivamente contra la especificidad por anticuerpo (Tabla 21). Basándose en estos datos, las concentraciones de hBAT-1 que se usaron en todo el estudio fueron 1:100, 1:250 y 1:500.

TABLA 21

	Dilución de hBAT-1	¹ Especificidad	Intensidad de la señal	Fondo
15	1 :25	3	+++	3
	1:50	3	+++	2
	1:100	3	+++	1
	1:250	3	+++	0
20	1:500	2	++	0
	1:1000	1	+	0
	1:2000	0	0	0
	1:4000	0	0	0
	1:8000	0	0	0
25	Negativa	0	0	0

30 ¹Clave: 3 se refiere a tinción positiva fuerte, 2 se refiere a tinción positiva, 1 se refiere a tinción positiva débil y 0 se refiere a sin tinción/señal. +++ se refiere a señal visual fuerte, ++ se refiere a buena señal visual y + se refiere a señal visual débil.

(iii) Controles.

35 Se llevaron a cabo reacciones de control negativo, en las que el anticuerpo se sustituyó con un tampón, para cada tejido. Cada reacción de detección incluyó células de control positivo, Jurkat E6, reaccionaron en las tres diluciones predeterminadas del anticuerpo. Esto permitió monitorizar la coherencia de la reacción. Se incluyeron secciones de tiroides, se incubaron con anticuerpo anti-actina, en cada ensayo ejecutado como controles para el sistema de detección.

(iv) Evaluación de la reactividad cruzada

45 Se tiñeron secciones de cada tejido con hematoxilina y eosina (H&E) para confirmar su identidad e idoneidad para el estudio. También se incubaron secciones con anti-actina de músculo liso (SMA; Tabla 22) o sueros de control de conejo anti-transferrina humana, que mostró que los tejidos eran adecuados para inmunohistoquímica. Se prepararon tres secciones de cada uno de los tejidos y se incubaron con el anticuerpo, que se habían conjugado con FITC, a concentraciones de 1:100, 1:250 y 1:500 como se ha determinado durante la fase de validación. Después de lavar en tampón y bloquear con suero normal, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios y terciarios apropiados para la detección de fosfatasa alcalina, y se contratiñeron con hematoxilina antes del examen microscópico para determinar sitios de unión.

50 El método de tinción conjugada con FITC con detección de fosfatasa alcalina contuvo las siguientes etapas:

1. Secar al aire secciones de criostato.
2. Fijar por inmersión en acetona, 10 minutos a temperatura ambiente
- 55 3. Secar al aire.
4. Lavar en tampón.
5. Suero normal, 1:5, al menos 20 minutos.
6. Lavar en tampón
7. Prueba 1022292 Anticuerpo conjugado con FITC a 1:100, 1:250 y 1:500, durante la noche a 2-8 °C.
- 60 8. Lavar en tampón.
9. Anticuerpo monoclonal anti-FITC, 1:50, 30 minutos.
10. Lavar en tampón.
11. Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, 1:200, 2 horas.
12. Lavar en tampón.
- 65 13. Vector red y levamisol, 20 minutos.
14. Lavar en tampón.

15. Contrateñir y montar.

Se minimizó la fosfatasa alcalina endógena usando Levamisol incorporado en el cromógeno. En tejidos en los que la actividad de la fosfatasa alcalina endógena no pudo suprimirse (colon, íleon, placenta y endotelio humano, colon y páncreas murino, estómago, íleon y próstata de primate), se usó anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante a 1:200 durante 2 horas, seguido de reactivo de diaminobencideno (DAB) durante 20 minutos.

(v) Resultados

Se examinaron muestras de tejidos individuales teñidos con H&E para la calidad de tejido, presencia de características histológicas normales e idoneidad de la preservación. Todas muestras que se probaron se consideraron adecuadas para los fines de este estudio. Se logró tinción positiva en la línea celular Jurkat E6 para hBAT-1 y en las secciones de tiroides tratadas con actina de músculo liso. A medida que los controles dieron los resultados esperados, la prueba se consideró válida.

Se muestran resultados individuales de reactividad cruzada para hBAT-1 y tejidos humanos en las Tablas 22. Se detectó tinción positiva en vasos sanguíneos de endotelio humano a una dilución de 1:100 y fue probablemente un resultado de la unión de hBAT-1 a linfocitos. La tinción positiva indica probable unión del tejido del anticuerpo hBAT-1 monoclonal humanizado. No se observó tinción, es decir, reactividad cruzada con hBAT-1, en secciones de bazo, extensiones de sangre u otros tejidos humanos (excepto endotelio humano - vasos sanguíneos). Ninguno de los tejidos murinos y de primate mostró evidencia de reactividad cruzada con hBAT-1.

TABLA 22

Tejido	SMA	Anticuerpo hBAT-1			
		1:100	1:250	1:500	1:100
Adrenal	+	-	-	-	-
Vejiga	+	-	-	-	-
Glóbulos sanguíneos	¹ N/A	-	-	-	-
Vaso sanguíneo (endotelio)	+	+	-	-	-
Médula ósea	N/A	-	-	-	-
Mama	+	-	-	-	-
Cerebelo	+	-	-	-	-
Corteza cerebral	+	-	-	-	-
Colon	+	-	-	-	-
Ojo (retina)	+	-	-	-	-
Trompas de Falopio	+	-	-	-	-
Corazón	+	-	-	-	-
Íleon (tubo GI)	+	-	-	-	-
Riñón	+	-	-	-	-
Hígado	+	-	-	-	-
Pulmón	+	-	-	-	-
Ganglio linfático	+	-	-	-	-
Ovario	+	-	-	-	-
Páncreas	+	-	-	-	-
Paratiroides	+	-	-	-	-
Parótida	+	-	-	-	-
Pituitaria	+	-	-	-	-
Placenta	+	-	-	-	-
Próstata	+	-	-	-	-
Piel	+	-	-	-	-
Médula espinal	+	-	-	-	-
Bazo	+	-	-	-	-
Estómago	+	-	-	-	-
Músculo estriado	+	-	-	-	-
Testículos	+	-	-	-	-
Timo	+	-	-	-	-
Tiroides	+	-	-	-	-
Amígdalas	+	-	-	-	-
Uréter	+	-	-	-	-
Útero-cuello uterino	+	-	-	-	-
Útero-endometrio	+	-	-	-	-
¹ N/A - resultado no aplicable					

La anterior descripción de las realizaciones específicas revelará así completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando el conocimiento actual, modificar fácilmente y/o adaptar para diversas aplicaciones tales realizaciones específicas sin excesiva experimentación y sin apartarse del concepto genérico y, por tanto, tales adaptaciones y modificaciones deben y pretenden estar comprendidas dentro del significado e intervalo de equivalentes de las realizaciones desveladas. Debe entenderse que la fraseología o terminología empleadas en el presente documento es con el fin de descripción y no de limitación. Los medios, materiales y etapas para llevar a cabo diversas funciones desveladas pueden tomar una variedad de formas alternativas sin apartarse de la invención. Así, está previsto que la expresión "medios para...", o cualquier lenguaje de las etapas del método, como puede encontrarse en la memoria descriptiva anterior y/o en las reivindicaciones más adelante, seguido de una declaración funcional, defina y cubra cualquier elemento estructural, físico, químico o eléctrico o estructura, o cualquier etapa del método, que puede existir ahora o en el futuro que lleve a la función citada, tanto precisamente equivalente como no a la realización o realizaciones desveladas en la memoria descriptiva anterior, es decir, pueden usarse otros medios o etapas para llevar a cabo las mismas funciones; y se pretende dar a tales expresiones su interpretación más amplia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CURETECH LTD. MOR - RESEARCH APPLICATIONS LTD.

<120> Anticuerpos monoclonales inmunomoduladores humanizados para el tratamiento de enfermedad neoplásica o inmunodeficiencia

<130> CT/004 PCT

<140> PCT/IL03/00425

<141> 22-05-2003

<150> IL 149820

<151> 23-05-2002

<160> 93

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Phe o Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)
 <223> Xaa = Trp o Leu

<400> 2

5

Trp Xaa Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Xaa Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 3
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Péptido sintético

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = Asp o Ser

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa = Tyr o Phe

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa = Cys o Thr

30

<400> 3

35

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

40

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 4

50

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

55

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Péptido sintético

65

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Ile o Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa = Thr o Ser
 5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa = Thr o Ser
 10

<400> 5

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Xaa Phe Xaa
20 25 30

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> Péptido sintético
 25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Arg o Lys
 30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Gln o Lys
 35

<400> 6
 40

Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Xaa Trp Met Gly
1 5 10

<210> 7
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45

<220>
 <223> Péptido sintético
 50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Val o Ala
 55

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Asn o Ser
 60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = Thr o Asn
 65

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa = Val o Ala
 5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa = Arg o Lys
 10

<400> 7
 15
Arg Phe Xaa Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Xaa Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Thr Ser Leu Xaa Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys Xaa Xaa
20 25 30

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> Péptido sintético
 25

<400> 8
 30
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>
 <223> Péptido sintético
 40

<400> 9
 45
Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50

<220>
 <223> Péptido sintético
 55

<400> 10
 60
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65

ES 2 549 303 T3

<220>
<223> Péptido sintético

5 <400> 11

Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

15 <400> 12

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

20 <210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético

30 <400> 13

Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

35 **Gly**

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético

45 <400> 14

Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr
1 5

50 <210> 15
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Péptido sintético

60 <400> 15

65

5
 10
 15
 20
 25

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

30
 35
 40

<210> 16
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 16

40
 45
 50
 55
 60

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

65
 <210> 17
 <211> 106

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 17

10 **Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly**
1 5 10 15

15 **Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met**
20 25 30

20 **His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr**
35 40 45

25 **Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser**
50 55 60

30 **Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu**
65 70 75 80

35 **Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr**
85 90 95

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

35 <210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 18

45

50

55

60

65

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

<210> 19
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 19

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

<210> 20
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 20

45 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 50 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr
 55 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 60 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 65 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65

5 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 10 Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 21
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 21

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

55 <210> 22
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 22

65

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

<210> 23
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 23

1 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 5 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 10 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 15 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 20 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
 25 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 Val Thr Val Ser Ser
 115

30 <210> 24
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 24

45

50

55

60

65

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

<210> 25
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 25

atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcaccataa cctgcagtg cagggtcaagt gtaagttaca tgcactgggt ccagcagaag 180
 ccaggcactt ctccaaact ctggatttat aggacatcca acctggcttc tggagtccct 240
 gctcgcttca gtggcagtg atctgggacc tcttactgtc tcacaatcag ccgaatggag 300
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gtttcccact cacgttcggc 360
 tcggggacaa agttggaaat aaaa 384

<210> 26
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 26

65

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

<210> 27
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 27

45 atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagcacag 60
 atccagttgg tgcagtctgg acctgagttg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
 tgcaaggcctt ctggatatac tttcacaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180
 50 ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aacaccgaca gtggagagtc aacatattgct 240
 gaagagttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccaacac tgcctatttg 300
 cagatcaaca acctcaaca tgaggacacg gctacatatt tctgtgtgag agtcggctac 360
 55 gatgctttgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca 408

<210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 28

5
 10
 15
 20
 25

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

30
 35
 40

<210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 29

40
 45
 50
 55
 60
 65

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

ES 2 549 303 T3

5	<210> 30 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
10	<400> 30 cccaagcttg cgcaccat ggacatgagg gtccccgctc agc	43
	<210> 31 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Péptido sintético	
20	<400> 31 tcctggggct cctgctgctc tggctcccag gtgccaaatg	40
	<210> 32 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Polinucleótido sintético	
30	<400> 32 tgaaattggt ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca	40
	<210> 33 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Polinucleótido sintético	
40	<400> 33 tctgtaggag acagagtcac catcactgac agtgccaggt	40
	<210> 34 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Polinucleótido sintético	
50	<400> 34 caagtgaag ttacatgcac tggatcagc agaaaccagg	40
	<210> 35 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Polinucleótido sintético	
60	<400> 35 gaaagcccct aagctcctga tctataggac atccaacctg	40

ES 2 549 303 T3

<210> 36
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 36
 10 gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg 40
 <210> 37
 <211> 40
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 20 <400> 37
 ggacagattt cactctcacc atcaacagcc tgcagcctga 40
 <210> 38
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 30 <400> 38
 agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc 40
 <210> 39
 <211> 55
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 39
 ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cgcg 55
 45 <210> 40
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 40
 55 gagcagcagg agccccagga gctgagcggg gaccctcatg 40
 <210> 41
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 41
 65 actgcgtcaa cacaattca cattggcac ctgggagcca 40

ES 2 549 303 T3

	<210> 42	
	<211> 40	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
10	<400> 42	
	gtgactctgt ctctacaga tgcagacagg gaggatggag	40
	<210> 43	
	<211> 40	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
20	<400> 43	
	gtgcatgtaa ctacacttg acctggcact gcaagtgatg	40
	<210> 44	
25	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
30	<400> 44	
	tcaggagctt aggggcttcc cctggttct gctgatacca	40
	<210> 45	
35	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 45	
	ctagatggga cccagaagc caggttgat gtctataga	40
45	<210> 46	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 46	
55	ggtgagagtg aaatctgtcc cagatccact gccgctgaat	40
	<210> 47	
	<211> 40	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
65	<400> 47	
	aatagtaagt tgcaaatct tcaggctgca ggctgttgat	40

ES 2 549 303 T3

<210> 48
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 48
 10 cctccgccga acgtgagtgg gaaactactc cttgctggc 40
 <210> 49
 <211> 35
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 20 <400> 49
 cgcgatcca ctcagtttg atctccagct tggtc 35
 <210> 50
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 30 <400> 50
 caagtgaag ttacatgcac tggttccagc agaaaccagg 40
 <210> 51
 <211> 40
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 51
 gaaagcccct aagctctgga tctataggac atccaacctg 40
 <210> 52
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 52
 55 ggacagatta cactctcacc atcaacagcc tgcagcctga 40
 <210> 53
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 53
 65 tccagagctt aggggcttcc cctggtttct gctggaacca 40
 <210> 54

ES 2 549 303 T3

	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 54	
10	ggtgagagtg taatctgtcc cagatccact gccgctgaac	40
	<210> 55	
	<211> 40	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 55	
20	ggtgagacag taagatgtcc cagatccact gccgctgaac	40
	<210> 56	
	<211> 40	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 56	
30	ggacatctta ctgtctcacc atcaacagcc tgcagcctga	40
	<210> 57	
	<211> 40	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
40	<400> 57	
	cccaagcttg ccgccacat ggactggacc tggaggatcc	40
	<210> 58	
45	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 58	
	tcttcttgtt ggcagcagca acaggtgccc act	33
55	<210> 59	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 59	
65	cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa	40
	<210> 60	

<211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 60
 gcctggggcc tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga 40

10

<210> 61
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 61
 tatagcttca gtaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg 40

20

<210> 62
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 62
 cccttgaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac 40

30

<210> 63
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 63
 cgacagtgga gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga 40

40

<210> 64
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 64
 cggttgtct tctccttga cacctctgtc agcacggcat 40

50

<210> 65
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 65
 atctgcagat caccagcctc acggctgagg aactggcat 40

60

<210> 66

65

ES 2 549 303 T3

<211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 66
 gtatttctgt gcgaaagtcg gctacgatgc tttgg 35
 10 <210> 67
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 67
 20 actactgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcctcagg tgagtgatc cgcg 54
 <210> 68
 <211> 45
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 30 <400> 68
 tgctgccacc aagaagagga tccttcagg tggagtccat ggtgg 45
 <210> 69
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 40 <400> 69
 ttgcaccagc tgcacctggg agtgggcacc tgttgc 36
 <210> 70
 <211> 40
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 70
 tcttactga ggcccaggc ttcttaagct cagaccaga 40
 55 <210> 71
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 71
 65 ccatagttac tgaagctata tccagaagct tgcaggaga 39
 <210> 72

ES 2 549 303 T3

<211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 72
 ctgaagccct tgtccagggg cctgtcgac ccagttcatt 40
 10 <210> 73
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 73
 atgttgactc tccactgtcg gtgttatcc atcccatcca 40
 20 <210> 74
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 74
 tccaaggaga agacaaaccg tccttgaac tttcagcat 40
 30 <210> 75
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 75
 gaggctggtg atctgcagat atgccgtgct gacagaggtg 40
 40 <210> 76
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 76
 cgactttcgc acagaaatac atgccagtgt cctcagccgt 40
 50 <210> 77
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 77
 ttccctggcc ccagtagtcc aaagcatcgt agc 33
 60 <210> 78

ES 2 549 303 T3

	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 78	
10	cgcggtacca ctcacctgag gagacggtga ccaggg	36
	<210> 79	
	<211> 40	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 79	
20	tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgacgacagg	40
	<210> 80	
	<211> 40	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 80	
30	ccatagtttg tgaagtata tccagaagcc ttgcaggaga	40
	<210> 81	
	<211> 40	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
40	<400> 81	
	cggtttgtct tctccttga cacctctgtc aacacggcat	40
	<210> 82	
45	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 82	
	gtatttctgt gtgagagtgc gctacgatgc ttgg	35
55	<210> 83	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 83	
65	cgactctcac acagaaatac atgccagtgt cctcagccgt	40
	<210> 84	

ES 2 549 303 T3

	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Polinucleótido sintético		
	<400> 84		
10	atctgcagat caccagcctc aacgctgagg aactggcat	40	
	<210> 85		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Polinucleótido sintético		
	<400> 85		
20	gaggctggtg atctgcagat atgccgtgtt gacagaggtg	40	
	<210> 86		
	<211> 40		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Polinucleótido sintético		
30	<400> 86		
	tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgaagcagg	40	
	<210> 87		
	<211> 412		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Polinucleótido sintético		
40	<400> 87		
	aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc tcctggggct cctgctgctc	60	
45	tggtctccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca	120	
	tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggc caagtgtgtaag ttacatgcac	180	
	tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct aagctcctga tctataggac atccaacctg	240	
50	gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	300	
	atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc	360	
	ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc	412	
55	<210> 88		
	<211> 412		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Polinucleótido sintético		
	<400> 88		
65			

ES 2 549 303 T3

5
10

aagcttgccg	ccaccatgga	catgagggtc	cccgctcagc	tcctggggct	cctgctgctc	60
tggtccacag	gtgccaaatg	tgaattgtg	ttgacgcagt	ctccatcctc	cctgtctgca	120
tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	agtgccaggt	caagtgtaag	ttacatgcac	180
tggttccagc	agaaaccagg	gaaagcccct	aagctctgga	tctataggac	atccaacctg	240
gcttctgggg	tccatctag	attcagcggc	agtggatctg	ggacagatta	cactctcacc	300
atcaacagcc	tgcagcctga	agattttgca	acttactatt	gccagcaaag	gagtagtttc	360
ccactcacgt	tcggcggagg	gaccaagctg	gagatcaaac	gtgagtggat	cc	412

15
20

<210> 89
<211> 412
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<400> 89

25
30
35

aagcttgccg	ccaccatgga	catgagggtc	cccgctcagc	tcctggggct	cctgctgctc	60
tggtccacag	gtgccaaatg	tgaattgtg	ttgacgcagt	ctccatcctc	cctgtctgca	120
tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	agtgccaggt	caagtgtaag	ttacatgcac	180
tggttccagc	agaaaccagg	gaaagcccct	aagctctgga	tctataggac	atccaacctg	240
gcttctgggg	tccatctag	attcagcggc	agtggatctg	ggacatctta	ctgtctcacc	300
atcaacagcc	tgcagcctga	agattttgca	acttactatt	gccagcaaag	gagtagtttc	360
ccactcacgt	tcggcggagg	gaccaagctg	gagatcaaac	gtgagtggat	cc	412

40

<210> 90
<211> 436
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<400> 90

50
55
60

aagcttgccg	ccaccatgga	ctggacctgg	aggatcctct	tcttgggtggc	agcagcaaca	60
ggtgccact	cccaggtgca	gctggtgcaa	tctgggtctg	agcttaagaa	gcctggggcc	120
tcagtgaaga	tctcctgcaa	ggcttctgga	tatactttca	caactatgg	aatgaactgg	180
gtgcgacagg	cccctggaca	agggtctcag	tggatgggat	ggataaacac	cgacagtgga	240
gagtcaacat	atgctgaaga	gttcaaggga	cggtttgtct	tctccttggga	cacctctgtc	300
aacacggcat	atctgcagat	caccagcctc	acggctgagg	acactggcat	gtatttctgt	360
gtgagagtcg	gctacgatgc	tttgactac	tggggccagg	gaaccctggt	caccgtctcc	420
tcaggtgagt	ggatcc					436

65

<210> 91
<211> 436
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 549 303 T3

<220>
<223> Polinucleótido sintético

<400> 91

5
aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca 60
ggtgcccact cccaggtgca gctgggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc 120
10 **tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg 180**
gtgcgacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga 240
gagtcaacat atgctgaaga gttcaagggg cggtttgtct tctccttggg cacctctgtc 300
15 **agcacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg aactggcat gtatttctgt 360**
gcgaaagtcg gctacgatgc tttggactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
tcaggtgagt ggatcc 436

<210> 92
<211> 436
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Polinucleótido sintético

<400> 92

30
aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca 60
ggtgcccact cccaggtgca gctgggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc 120
35 **tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg 180**
gtgcgacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga 240
gagtcaacat atgctgaaga gttcaagggg cggtttgtct tctccttggg cacctctgtc 300
40 **agcacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg aactggcat gtatttctgt 360**
gcgaaagtcg gctacgatgc tttggactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
tcaggtgagt ggatcc 436

<210> 93
<211> 10259
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Vector de expresión individual pG1KD210.BAT-1.RHC/RkD

<400> 93

55

60

65

ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat 60
 5 ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacce ctatttgttt 120
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 180
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttatcc 240
 10 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaagtaaa 300
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 360
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 420
 15 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgcg 480
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540
 20 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 600
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa 660
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 720
 25 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 780
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 840
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

	taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	900
	atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	960
5	gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	1020
	tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	1080
	ttactcatat	atactttaga	ttgatttaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	1140
10	gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	1200
	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	1260
15	aatctgctgc	ttgcaaaca	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttgtt	tgccggatca	1320
	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggttcagc	agagcgcaga	taccaaatc	1380
	tgctcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	1440
20	atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	1500
	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	1560
	gggttcgtgc	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	1620
25	gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	1680
	aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgcac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	1740
	tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgtc	1800
30	gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	1860
	cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	tcccctgatt	ctgtggataa	1920
35	ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	1980
	cgagtcagtg	agcgaggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcctct	2040
	gtgcggtatt	tcacaccgca	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgata	2100
40	gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	gccccgacac	2160
	ccgccaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	2220
	caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	ttcaccgtc	atcaccgaaa	2280
45	cgcgcgaggc	agcatgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccgcccc	taactccgcc	2340
	catccccccc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatttt	2400
	ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
50	aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
	tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggt	aggattttat	ccccgctgcc	2580
55	atcatggttc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
	aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
	acaacctctt	cagtggaagg	taacagaat	ctggtgatta	tggttaggaa	aacctggttc	2760
60	tccattctcg	agaagaatcg	acctttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
	ctcaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgccttaaga	2880

65

cttattgaac aaccggaatt ggcaagtaaa gtagacatgg tttggatagt cggaggcagt 2940
 tctgtttacc aggaagccat gaatcaacca ggccacctca gactctttgt gacaaggatc 3000
 5 atgcaggaat ttgaaagtga cacgtttttc ccagaaattg atttggggaa atataaactt 3060
 ctcccagaat acccaggcgt cctctctgag gtccaggagg aaaaaggcat caagtataag 3120
 tttgaagtct acgagaagaa agactaacag gaagatgctt tcaagttctc tgctcccctc 3180
 10 ctaaagctat gcatttttat aagaccatgg gacttttgct ggcttttagat ctttgtgaag 3240
 gaaccttact tctgtggtgt gacataattg gacaaactac ctacagagat ttaaagctct 3300
 aaggtaaata taaaattttt aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt 3360
 gtattttaga ttccaaccta tggaaactgat gaatgggagc agtgggtggaa tgcctttaat 3420
 gaggaaaacc tgttttgctc agaagaaatg ccatctagtg atgatgaggc tactgctgac 3480
 20 tctcaacatt ctactcctcc aaaaaagaag agaaaggtag aagaccccaa ggactttcct 3540
 tcagaattgc taagtttttt gagtcatgct gtgttttagta atagaactct tgcttgcttt 3600
 gctatttaca ccacaaagga aaaagctgca ctgctataca agaaaattat ggaaaaatat 3660
 25 tctgtaacct ttataagtag gcataacagt tataatcata acatactgtt ttttcttact 3720
 ccacacaggc atagagtgtc tgctattaat aactatgctc aaaaattgtg taccttttagc 3780
 tttttaattt gtaaaggggt taataaggaa tatttgatgt atagtgcctt gactagagat 3840
 30 cataatcagc cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaacc tcccacacct 3900
 ccccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttaactgtt ttattgcagc 3960
 35 ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag cttttttttc 4020
 actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctactagtg 4080
 gccggcccgg gcgatcgctc gagatatcta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt 4140
 40 tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgctggctg 4200
 accgcccac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc 4260
 aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc 4320
 45 agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaattg 4380
 gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat 4440
 ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggag 4500
 50 tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg tcaatgggag 4560
 tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt 4620
 55 gacgcaaattg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt 4680
 gaaccgtcag atcgcttggg gacgccatcc acgctgtttt gacctcata gaagacaccg 4740
 ggaccgatcc agcctccgag gccgggaacg gtgcattgga acgcggattc cccgtgccaa 4800
 60 gagtgcgta agtaccgcct atagagtcta taggcccacc cccttggtt cttatgcatg 4860
 ctatactggt tttggcttgg ggtctataca cccccgcttc ctcatgttat aggtgatggt 4920

65

atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga ccaactcccc attggtgacg 4980
 atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctcttt attggtata 5040
 5 tgccaataca ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct 5100
 catttattat ttacaaattc acatatacaa caccaccgtc cccagtgcc gcagttttta 5160
 10 ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcgggtacg tgttccggac atgggctctt 5220
 ctccggtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgctcc catgcctcca gcgactcatg 5280
 gtcgctcggc agctccttgc tcctaacagt ggaggccaga cttaggcaca gcacgatgcc 5340
 15 caccaccacc agtgtgccgc acaaggccgt ggcggtaggg tatgtgtctg aaaatgagct 5400
 cggggagcgg gcttgcaccg ctgacgcatt tggaaactt aaggcagcgg cagaagaaga 5460
 tgaggcagc tgagttgtt tgttctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct 5520
 20 gttaacgggt gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag 5580
 acataatagc tgacagacta acagactggt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg 5640
 tccttgacac gcgtctcggg aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc 5700
 25 tcctggggct cctgctgctc tggctcccag gtgccaaatg tgaattgtg ttgacgcagt 5760
 ctccatcctc cctgtctgca tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt 5820
 30 caagtgtaa ttacatgcac tggttccagc agaaaccagg gaaagcccc aagctctgga 5880
 tctataggac atccaacctg gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtgatctg 5940
 ggacatctta ctgtctcacc atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt 6000
 35 gccagcaaag gagtagttc ccactcacgt tgggcggagg gaccaagctg gagatcaaac 6060
 gtgagtggat ccatctggga taagcatgct gtttctgtc tgtccctaac atgccctgtg 6120
 attatgcgca aacaacacac ccaagggcag aactttgtta cttaaaccacc atcctgtttg 6180
 40 cttctttcct caggaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgc atctgatgag 6240
 cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga ataacttcta tcccagagag 6300
 45 gccaaagtac agtggaagggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc 6360
 acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa 6420
 gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg 6480
 50 cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgttagaggg agaagtgcc ccacctgctc 6540
 ctgagttcca gcctgacccc ctccatcct ttggcctctg acccttttct cacaggggac 6600
 ctaccctat tgcggtctc cagctcatct ttcacctcac cccctctctc ctcttggt 6660
 55 ttaattatgc taatgttga ggagaatgaa taaataaagt gaacttttgc acctgtggtg 6720
 gatctaataa aagatattta ttttcattag atatgtgtgt tggttttttg tgtgcagtgc 6780
 ctctatctgg aggccaggta gggctggcct tgggggaggg ggaggccaga atgactcaa 6840
 60 gagctacagg aaggcaggtc agagacccca ctggacaaac agtggtgga ctctgcacca 6900
 taacacacia tcaacagggg agtgagctgg aaatttgcta gcgaattcta ttaatagtaa 6960

65

tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 7020
 gtaaattggcc cgcctggctg accgcccac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 7080
 5 tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 7140
 cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt 7200
 gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac 7260
 10 tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt 7320
 tggcagtaca tcaatgggag tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac 7380
 cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 7440
 15 cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat 7500
 ataagcagag ctctgttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt 7560
 20 gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga 7620
 acgcggtatc cccgtgccaa gaggtagcga agtaccgct atagagtcta taggcccacc 7680
 cccttggctt cttatgcatg ctatactgtt tttggcttgg ggtctataca cccccgttc 7740
 25 ctcatgttat aggtgatggt atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga 7800
 ccactccccct attggtgacg atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac 7860
 aactctcttt attggtata tgccaatata ctgtccttca gagactgaca cggactctgt 7920
 30 atttttacag gatggggtct catttattat ttacaaatc acatatacaa caccaccgtc 7980
 cccagtgcc gcagttttta taaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcggtacg 8040
 35 tgttccggac atgggctctt ctccggtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgtctc 8100
 catgcctcca gcgactcatg gtcgctcggc agctccttgc tcctaacagt ggaggccaga 8160
 cttaggcaca gcacgatgcc caccaccacc agtgtgccgc acaaggccgt ggcggtaggg 8220
 40 tatgtgtctg aaaatgagct cggggagcgg gcttgcaccg ctgacgcatt tggagactt 8280
 aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc tgagtgttg tttctgata agagtacagag 8340
 gtaactcccg ttgcggtgct gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt 8400
 45 gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc tgacagacta acagactggt cctttccatg 8460
 ggtcttttct gcagtcaccg tccttgacac gcgtctcggg aagcttgccg ccaccatgga 8520
 ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca ggtgccact cccaggtgca 8580
 50 gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc tcagtgaaga tctctgcaa 8640
 ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg cccctggaca 8700
 agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga gagtcaacat atgctgaaga 8760
 55 gttcaagggg cggtttctct tctccttggg cacctctgtc aacacggcat atctgcagat 8820
 caccagcctc acggctgagg aactggcat gtatttctgt gtgagagtcg gctacgatgc 8880
 60 tttggactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcg agcgcctcca ccaagggccc 8940
 atcggctctc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccttggg 9000

65

ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcctt 9060
 gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 9120
 5 cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa 9180
 tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac 9240
 10 tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctett 9300
 cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgagggtca catgctggtt 9360
 ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga 9420
 15 ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgggtggt 9480
 cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt 9540
 ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc 9600
 20 ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt 9660
 cagcctgacc tgcttgggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 9720
 caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc 9780
 25 cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 9840
 ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct 9900
 30 gtctccgggt aaatgagtgc gacggccggc aagccccgct ccccgggctc tcgctgctgc 9960
 acgaggatgc ttggcacgta cccctgtac atacttccc ggcgcccagc atggaaataa 10020
 agcaccggat ctaataaaag atatttattt tcattagata tgtgtgttgg ttttttgtgt 10080
 35 gcagtgcctc tatctggagg ccaggtaggg ctggccttgg gggaggggga ggccagiatg 10140
 actccaagag ctacaggaag gcaggtcaga gaccccactg gacaaacagt ggctggactc 10200
 40 tgcaccataa cacacaatca acaggggagt gagctggaaa tttgctagcg aattaattc 10259

45
 50
 55
 60
 65

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humanizado que tiene al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de anticuerpo monoclonal murino BAT-1 (mBAT-1) y una región estructural (FR) derivada de una inmunoglobulina humana aceptora, en el que el anticuerpo humanizado conserva la actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal mBAT-1 y es menos inmunogénico en un sujeto humano que dicho anticuerpo murino.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal humanizado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo humanizado induce un mayor efecto antitumoral que el inducido por el anticuerpo BAT-1 murino parental.
- 15 3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal murino BAT-1 (mBAT-1), en el que dicho anticuerpo humanizado comprende:
- 20 a. las regiones variables de la cadena ligera de fórmula: FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-CDR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4} en la que cada FR es independientemente una región estructural de un anticuerpo humano, y cada CDR es una región determinante de la complementariedad, derivada de BAT-1;
- b. las regiones variables de la cadena pesada de fórmula: FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4} en la que cada FR es por separado una región estructural de un anticuerpo humano, y cada CDR es una región determinante de la complementariedad, de mBAT-1.
- 25 4. Un anticuerpo monoclonal humanizado que tiene una región Fab genéticamente modificada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal murino BAT-1 (mBAT-1), en el que el anticuerpo genéticamente modificado conserva la actividad biológica de dicho mBAT-1 y en el que dicho anticuerpo genéticamente modificado monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
- 30 (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de: CDR_{H1} (SEC ID N°: 12); CDR_{H2} (SEC ID N°: 13); CDR_{H3} (SEC ID N°: 14); y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR_{L1} (SEC ID N°: 9); CDR_{L2} (SEC ID N°: 10); CDR_{L3} (SEC ID N°: 11);
- (ii) regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos que tienen más de aproximadamente el 80 por ciento de similitud con todas o parte de las secuencias de: CDR_{H1} (SEC ID N°: 12); CDR_{H2} (SEC ID N°: 13); CDR_{H3} (SEC ID N°: 14); CDR_{L1} (SEC ID N°: 9); CDR_{L2} (SEC ID N°: 10); CDR_{L3} (SEC ID N°: 11);
- 35 (iii) un anticuerpo de (i) o (ii) en el que uno o más residuos de aminoácidos se han añadido, delecionado, sustituido o modificado químicamente sin afectar sustancialmente la actividad biológica o especificidad de unión del anticuerpo.
- 40 5. El anticuerpo monoclonal humanizado de la reivindicación 4, en el que las regiones estructurales (FR) derivan de un anticuerpo humano.
- 45 6. El anticuerpo monoclonal humanizado de la reivindicación 3 que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal murino BAT-1 (mBAT-1), en el que dicho anticuerpo humanizado comprende:
- 50 a. regiones variables de la cadena ligera de fórmula: FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-CDR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4} en la que cada FR es independientemente una región estructural de un anticuerpo humano, y cada CDR es una región determinante de la complementariedad, en el que la secuencia de aminoácidos de CDR_{L1} es SARSSVSYMH (SEC ID N°: 9); CDR_{L2} es RTSNLAS (SEC ID N°: 10); CDR_{L3} es QRSSFPLT (SEC ID N°: 11);
- b. las regiones variables de la cadena pesada de fórmula: FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4} en la que cada FR es por separado una región estructural de un anticuerpo humano, y cada CDR es una región determinante de la complementariedad, en el que la secuencia de aminoácidos de: CDR_{H1} es NYGMN (SEC ID N°: 12); CDR_{H2} es WINTDSGESTYAEFKG (SEC ID N°: 13); CDR_{H3} es VGYDALDY (SEC ID N°: 14).
- 55 7. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo humanizado induce un mayor efecto antitumoral que el anticuerpo monoclonal BAT-1 murino; o en el que dicho anticuerpo humanizado induce un mayor efecto antimetastásico que el anticuerpo monoclonal BAT-1 murino; o
- 60 en el que las FR de la región variable de la cadena pesada derivan de las FR de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo h9ighv1295 humano; o en el que las FR de la región variable de la cadena ligera kappa se basan en las FR de la región variable de la cadena ligera kappa del anticuerpo TEL9 humano; o que tiene una región constante kappa humana; o
- 65 en el que el anticuerpo está adicionalmente marcado con una marca detectable, inmovilizado sobre una fase sólida, o conjugado con un compuesto heterólogo; o

- 5 en el que dichas regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado están seleccionadas del grupo que consiste en: BATTR_{KA} (SEC ID N°: 15), BATTR_{KB} (SEC ID N°: 16), BATTR_{KC} (SEC ID N°: 17), BATTR_{KD} (SEC ID N°: 18), y las regiones variables de la cadena pesada están seleccionados del grupo que consiste en: BATTR_{HA} (SEC ID N°: 20), BATTR_{HB} (SEC ID N°: 21), BATTR_{HC} (SEC ID N°: 22), BATTR_{HD} (SEC ID N°: 23) o BATTR_{HE} (SEC ID N°: 24); o
- 10 en el que dichas regiones variables del anticuerpo monoclonal humanizado están seleccionadas del grupo que consiste en: BATTR_{HA}/BATTR_{KA} (SEC ID N°: 20/SEC ID N°: 15), BATTR_{HB}/ BATTR_{KA} (SEC ID N°: 21/SEC ID N°: 15), BATTR_{HB}/ BATTR_{KB} (SEC ID N°: 21/SEC ID N°: 16), BATTR_{HC}/ BATTR_{KB} (SEC ID N°: 22/SEC ID N°: 16), BATTR_{HB}/ BATTR_{KD} (SEC ID N°: 21/SEC ID N°: 18) o BATTR_{HC}/ BATTR_{KD} (SEC ID N°: 22/SEC ID N°: 18).
- 15 8. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 6, en el que dicha región variable de la cadena ligera es BATTR_{KD} (SEC ID N°: 18), y en el que dicha región variable de la cadena pesada es BATTR_{HC} (SEC ID N°: 22).
9. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
- 20 10. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo es de isotipo IgG; preferentemente en el que dicha subclase de isotipo está seleccionada de IgG₁ o IgG₄.
- 25 11. Un fragmento de anticuerpo derivado del anticuerpo humanizado de la reivindicación 6, en el que el fragmento de anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en: F_v, F(ab'), F(ab')₂, un anticuerpo monocatenario.
12. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 6 generado por tecnología de ADN recombinante, utilizando injerto de CDR.
- 30 13. Una construcción de polinucleótido aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones 1-12 o fragmentos de los mismos.
- 35 14. La construcción de polinucleótido aislado según la reivindicación 13 que codifica una región variable de la cadena ligera kappa seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18; preferentemente en la que la construcción de polinucleótido aislado está seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 87, SEC ID N°: 88, SEC ID N°: 89.
- 40 15. La construcción de polinucleótido aislado según la reivindicación 13 que codifica una región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24; preferentemente en el que la construcción de polinucleótido aislado está seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 90, SEC ID N°: 91, SEC ID N°: 92.
- 45 16. Un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la reivindicación 13 a 15.
17. El vector de la reivindicación 16, que comprende además al menos una secuencia de polinucleótidos que codifica un componente seleccionado del grupo que consiste en: un promotor operativamente ligado al polinucleótido que codifica el anticuerpo, uno o más genes de resistencia, una secuencia de Kozak, un origen de replicación, uno o más genes marcadores de selección, un elemento potenciador, terminador de la transcripción, un péptido señal, región constante kappa humana genómica, región constante IgG humana genómica.
- 50 18. El vector de la reivindicación 17, en el que el vector es un plásmido o un virus; preferentemente en el que el vector está seleccionado del grupo que comprende: pKN110, pG1D200, pG1KD210, pUC o pBR322.
19. El vector de la reivindicación 16, que comprende la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N°: 93.
20. Una célula huésped que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 16-19.
- 55 21. La célula huésped de la reivindicación 20, capaz de expresar un anticuerpo o fragmentos del mismo; o en el que la célula está seleccionada de eucariotas y procariontes; o seleccionada del grupo que consiste en: células CHO, CHO*dhfr*, NSO, COS o COS7.
- 60 22. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-12; preferentemente que comprende además un vehículo, diluyente o estabilizador fisiológicamente aceptable.
- 65 23. Uso de un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer; preferentemente en el que el cáncer está seleccionado de melanoma, tumores de pulmón, cáncer colorrectal o metástasis hepáticas.
24. Uso de un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmentos de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones

1-12 para la preparación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de dicho anticuerpo o fragmentos de anticuerpos para inducir actividad proliferativa, citolítica o estimulante de linfocitos T CD4+.

5 25. Uso de un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmentos de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para la preparación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de dicho anticuerpo o fragmentos de anticuerpos para aumentar la supervivencia de linfocitos T CD4+ activados.

10 26. Uso según la reivindicación 24 o 25,
en el que la composición farmacéutica se refiere al tratamiento de una deficiencia genética o inmunoadquirida; o
en el que la composición farmacéutica se refiere al tratamiento de las fases tempranas de la infección por el VIH; o
en el que la composición farmacéutica se refiere al tratamiento de SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida);
o
en el que la composición farmacéutica se refiere al tratamiento de pacientes que tienen un hemograma que muestra una disminución en linfocitos T CD4+.

15 27. Un método para producir el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende:

20 (i) transfectar una célula huésped con un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica dicho anticuerpo, o co-transfectar la célula huésped con 2 vectores que comprende cada uno una secuencia de polinucleótidos que codifica las regiones de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo;
(ii) cultivar la célula huésped de (i) de manera que se exprese dicho anticuerpo; y
(iii) recuperar el anticuerpo del huésped.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ATGGATTTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCC
 1 - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 60
 TACCTAAATGTCCACGTCTAATAGTCTGAAGGACGATTAGTCACGGAGTCAGTATTACAGG
 M D L Q V Q I I S F L L I S A S V I M S

AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAG
 61 - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 120
 TCTCCTGTTTAAACAAGAGTGGGTCAGAGGTCGTTAGTACAGACGTAGAGGTCCCCTCTTC
 R G Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K

GTCACCATAACCTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAG
 121 - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 180
 CAGTGGTATTGGACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTGACCAAGGTCGTCTTC
 V T I T C S A R S S V S Y M H W F Q Q K

CCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGGACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT
 181 - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 240
 GGTCCGTGAAGAGGGTTTGAGACCTAAATATCCTGTAGGTTGGACCGAAGACCTCAGGGA
 P G T S P K L W I Y R T S N L A S G V P

GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTGTCTCACAATCAGCCGAATGGAG
 241 - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 300
 CGAGCGAAGTCACCGTCACCTAGACCCTGGAGAATGACAGAGTGTTAGTCGGCTTACCTC
 A R F S G S G S G T S Y C L T I S R M E

GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTCCCCTCAGGTTCCGGC
 301 - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 360
 CGACTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTCGTTTCTCATCAAAGGGTGAGTGCAAGCCG
 A E D A A T Y Y C Q Q R S S F P L T F G

TCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
 361 - - - + - - - - + - - - - 384
 AGCCCCTGTTTCAACCTTTATTTT
 S G T K L E I K

FIGURA 1

Clases canónicas de Chothia

L1 (10 aminoácidos)	= Clase 1*
	Residuos clave: 2(I) ; 25(A); 29(VIL); 33(LM); 71(YF)
L2 (7 aminoácidos)	= Clase
	Residuos clave: 48(IV) ; 51(AT); 52(ST); 64(G)
L3 (9 aminoácidos)	= Clase 1
	Residuos clave: 90(QNH); 95 (P)

Clases canónicas de Martin

L1 (10 aminoácidos)	= Clase indefinida (aunque más similar a la clase 1/10A*)
	Residuos clave: 2(I) ; 4(L) ; 23(C) ; 25(A); 30(V); 33(LM); 35(W) ; 71(Y); 88(C) ; 90(Q); 93(SYR)
L2 (7 aminoácidos)	= Clase 1/7A
	Residuos clave: 23(C)
L3 (9 aminoácidos)	= Clase indefinida (aunque más similar a la clase 1/9A)
	Residuos clave: 2(ILV) ; 3(VQLE) ; 4(ML) ; 28(SNDTE) [⊗] ; 30(DLYVISNFHGT); 31(SNTKG); 32(FYNAHSR); 33(MLVIF); 88(C) ; 89(QSGFL); 90(QNH); 91(NFGSRDHTYV); 92(NYWTSRQHAD); 93(ENGHTSRAQHAD); 94(DYTVLHNIWPS) [⋄] ; 95(P); 96(PLYRIWF); 97(I); 98(F)

* Esta clase solo se observa en el subgrupo kappa de ratón de Kabat VI

⊗ Como el bucle L1 solo tiene 10 aminoácidos de longitud, no hay residuo en esta posición en la región Vk de BAT

⋄ El aminoácido Phe (F) se encuentra en esta posición en la región Vk de BAT

FIGURA 2

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATCCAAGCACAG
 1 - - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - - 60
 TACCGAACCCACACCTGGAACGATAAGGACTACCGTCGACGGGTTTCATAGGTTTCGTGTC
 M A W V W T L L F L M A A A Q S I Q A Q

 ATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCC
 61 - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - -120
 TAGGTCAACCACGTCAGACCTGGACTCAACTTCTTCGGACCTCTCTGTGAGTTCTAGAGG
 I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S

 TGCAAGGCTTCTGGATATACTTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCA
 121 - - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - -180
 ACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTTTGATACCTTACTTGACCCACTTCGTCCGAGGT
 C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P

 GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCCGACAGTGGAGAGTCAACATATGCT
 181- - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - - 240
 CCTTCCCAAATTCACCTACCCGACCTATTTGTGGCTGTACCTCTCAGTTGTATACGA
 G K G L K W M G W I N T D S G E S T Y A

 GAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTG
 241- - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - - 300
 CTTCTCAAGTTCCCTGCCAAACGGAAGAGAAACCTTTGGAGACGGTTGTGACGGATAAAC
 E E F K G R F A F S L E T S A N T A Y L

 CAGATCAACAACCTCAACAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGTGAGAGTCCGGCTAC
 301 - - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - -360
 GTCTAGTTGTTGGAGTTGTTACTCCTGTGCCGATGTATAAAGACACACTCTCAGCCGATG
 Q I N N L N N E D T A T Y F C V R V G Y

 GATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
 361- - - - + - - - - +- - - - -+- - - - -+- - - - -+ - - - - 408
 CTACGAAACCTGATGACCCAGTTCCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGT
 D A L D Y W G Q G T S V T V S S

FIGURA 3

Clases canónicas de Chothia

H1 (10 aminoácidos*) = Clase 1

Residuos clave: **24(TAVGS); 26(G);**
27;(FYTG); 29(FLIV);
34(MIVLT); 94(RTKHGL)

H2 (17 aminoácidos) = Clase 2

Residuos clave: **52a(PTA); 55(GS); 71(ALT)**

Clases canónicas de Martin

H1 (10 aminoácidos*) = Clase 1/10A

Residuos clave: **2(VIG); 4(LV); 20(LIMV);**
22(C); 24(TAVGS); 26(G);
29(IFLS); 32(IHYFTNCED);
33(YAWGTLV); 34(TVMW);
35(HENQSYT); 36(W);
48(IMLV); 51(LIVTSN);
69(ILFMV); 78(ALVYF);
80(LM); 90(YF); 92(C);
94(RKGSNH); 102(YHVISDG)

H2 (10 aminoácidos*) = Clase indefinida (aunque más similar a la clase 2/10A)

Residuos clave: **33(YWGATL); 47(WY);**
50(REWYGQVLNKA); 51(LI);
52(DLNSY); 53(AGYSKTN) ⇨;
54(NSTKDG); 56(YREDGVSA);
58(KNTSDRGFY); 59(Y);
69(IFLM); 71(VAL); 78(ALV)

* El bucle H1 actualmente consiste en 5 aminoácidos de CDR1 y 5 aminoácidos del extremo N de FR1.

✱ *AbM* define el bucle H2 como solo 10 aminoácidos de longitud, es decir, 7 aminoácidos más corto que la definición de Kabat para CDR2.

⇨ El aminoácido Asp (D) se encuentra en esta posición en la región V_H de BAT.

FIGURA 4

Números de Kabat de CDR	=====L1=====	==L2==	==L3====
	1	2	3
VK de BAI de ratón	123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890	123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890	12345678901234567890123456789012345678901234567890
Vk de IEL9 humana	QIVLTQSPAIMSASPGKVTITCSARSSVSYMHWFQOKPGTSPKLIYRTSNLASGVPARFSGSGTSY	E.....SSL...V.DR.....R.SQSISN.LN.Y.....KA...L...AA.T.Q.....S.....D	
SEC ID N° de variante			
BATRK _A 15	EIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCSARS-SVSYMHWFQOKPGKAPKLLIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTD		
BATRK _B 16	EIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCSARS-SVSYMHWFQOKPGKAPKLIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTD		
BATRK _C 17	EIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCSARS-SVSYMHWFQOKPGKAPKLIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTD		
BATRK _D 18	EIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCSARS-SVSYMHWFQOKPGKAPKLIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTS		

Números de Kabat de CDR	9	10
VK de BAI de ratón	1234567890123456789012345678901234567	1234567890123456789012345678901234567
Vk de IEL9 humana	CLTISRMEAEADAATYYCQQRSSFPLTFGSGTKLEIK	FT...NSIQP..F.....TN.....G.....
SEC ID N° de variante		
BATRK _A 15	FTLTINSLQPEDEFATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK	
BATRK _B 16	YTLTINSLQPEDEFATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK	
BATRK _C 17	YCLTINSLQPEDEFATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK	
BATRK _D 18	YCLTINSLQPEDEFATYYCQQRSSFPLTFGGGKLEIK	

FIGURA 5

Números de Kabat de CDR		-----H1=	=====H2=====	=====H3=====				
		1	2	3	4	5	6	7
V _H de BAT de ratón	123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456							
V _H de hsinh1295	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTDSGESTYAEFEFKGRFAFSLTSSAN							
SEC ID N° de variante	.V.....S.....AS.....S.SSHAI...R....Q...Q.....NT.SP...QG.T...V...D..VS							
BATRH _A	20	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYFSNYGMNWRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEFEFKGRFVFLDTSVS						
BATRH _B	21	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYFTTNYGMNWRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEFEFKGRFVFLDTSVS						
BATRH _C	22	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYFTTNYGMNWRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEFEFKGRFVFLDTSVN						
BATRH _D	23	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYFTTNYGMNWRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEFEFKGRFVFLDTSVN						
BATRH _E	24	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYFTTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTDSGESTYAEFEFKGRFAFSLDTSVN						
Números de Kabat de CDR		H3=====						
		8	9	10	11			
V _H de BAT de ratón	789012ABC345678901234567890ABC1234567890123							
V _H de hsinh1295	TAYLQINNLNEDTATYFCVRVGYDAL--- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>							
SEC ID N° de varianteTS.TA...GM...AKESHSSA LDL.....L.....							
BATRH _A	20	TAYLQITSLTAEDTGMVFCVAVGYDAL--- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>						
BATRH _B	21	TAYLQITSLTAEDTGMVFCVAVGYDAL--- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>						
BATRH _C	22	TAYLQITSLTAEDTGMVFCVAVGYDAL--- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>						
BATRH _D	23	TAYLQITSLTAEDTGMVFCVAVGYDAL--- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>						
BATRH _E	24	TAYLQITSLNAEDTGMVFCVAVGYDAL--- <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>						

FIGURA 6

```

AAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTC
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TTCGAACGGCGGTGGTACCTGTACTCCCAGGGGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGACGAG

      M D M R V P A Q L L G L L L L

TGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ACCGAGGGTCCACGGTTTACACTTTAACACAAC TGCCTCAGAGGTAGGAGGGACAGACGT

      W L P G A K C E I V L T Q S P S S L S A

TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAAGTTACATGCC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGTCACGGTCCAGTTCACATTC AATGTACGTG

      S V G D R V T I T C S A R S S V S Y M H

TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGGACATCCAACCTG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ACCATAGTCGTCTTTGGTCCCTTTCGGGGATTGAGGACTAGATACTCTGTAGGTTGGAC

      W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R T S N L

GCTTCTGGGGTCCCATCTAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CGAAGACCCCAGGGTAGATCTAAGTCGCCGTCACTAGACCCCTGTCTAAAGTGAGAGTGG

      A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T

ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTACTATTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TAGTTGTGGGACGTGCGACTTCTAAAACGTTGAATGATAACGGTCGTTTCCCTCATCAAAG

      I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

CCTCAGCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTGGATCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 412
GGTGAGTGAAGCCGCCTCCCTGGTTCGACCTTAGTTTGCACTCACCTAGG

      P L T F G G G T K L E I K

```

FIGURA 7

```

1  AAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCGTGCTGCTC 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1  TTCGAACGGCGGTGGTACCTGTACTCCCAGGGGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGACGAG
      M D M R V P A Q L L G L L L L

61  TGGCTCCCAGGTGCCAATGTGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
61  ACCGAGGGTCCACGGTTTACACTTTAACACAACCTGCGTCAGAGGTAGGAGGGACAGACGT
      W L P G A K C E I V L T Q S P S S L S A

121  TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCCAGSTCAAGTGTAAGTTACATGCAC 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121  AGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTG
      S V G D R V T I T C S A R S S V S Y M H

181  TGGTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
181  ACCAAGGTCGTCTTTGGTCCCTTTGGGGATTTCGAGACCTAGATATCCTGTAGGTTGGAC
      W F Q Q K P G K A P K L W I Y R T S N L

241  GCTTCTGGGGTCCCATCTAGATTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACC 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
241  CGAAGACCCCGGGTAGATCTAAGTCGCCGTCACCTAGACCCTGTCTAATGTGAGAGTGG
      A S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T

301  ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTC 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
301  TAGTTGTCGGACGTCGGACTTCTAAAACGTTGAATGATAACGGTCGTTTCCTCATCAAAG
      I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

361  CCACTCACGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTGGATCC 412
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
361  GGTGAGTGCAAGCCGCCTCCCTGGTTCGACCTCTAGTTTGCACTCACCTAGG
      P L T F G G G T K L E I K

```

FIGURA 8


```

1  AAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
1  TTCGAACGGCGGTGGTACCTGTACTCCCAGGGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGACGAG
      M D M R V P A Q L L G L L L L

61  TGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
61  ACCGAGGGTCCACGGTTTACACTTTAACACAACCTGCGTCAGAGGTAGGAGGGACAGACGT
      W L P G A K C E I V L T Q S P S S L S A

121  TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACATGCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
121  AGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTG
      S V G D R V T I T C S A R S S V S Y M H

181  TGGTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
181  ACCAAGGTCGTCTTTGGTCCCTTTCCGGGATTCGAGACCTAGATATCCTGTAGGTTGGAC
      W F Q Q K P G K A P K L W I Y R T S N L

241  GCTTCTGGGGTCCCATCTAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACATCTTACTGTCTCACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
241  CGAAGACCCAGGGTAGATCTAAGTCGCCGTCACCTAGACCCTGTAGAATGACAGAGTGG
      A S G V P S R F S G S G S G T S Y C L T

301  ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTTACTATTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
301  TAGTTGTCCGACGTCGGACTTCTAAAACGTTGAATGATAACGGTCGTTTCCTCATCAAG
      I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

361  CCACTCACGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTGGATCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 412
361  GGTGAGTGCAAGCCGCCTCCCTGGTTCGACCTCTAGTTGCACTCACCTAGG
      P L T F G G G T K L E I K

```

FIGURA 9

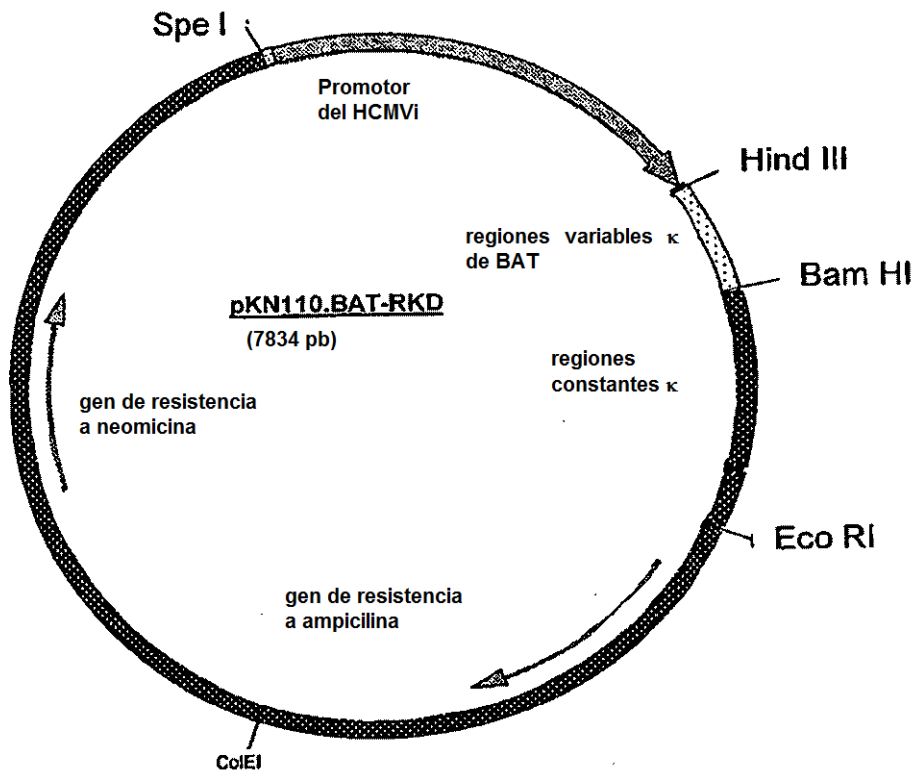


FIGURA 10

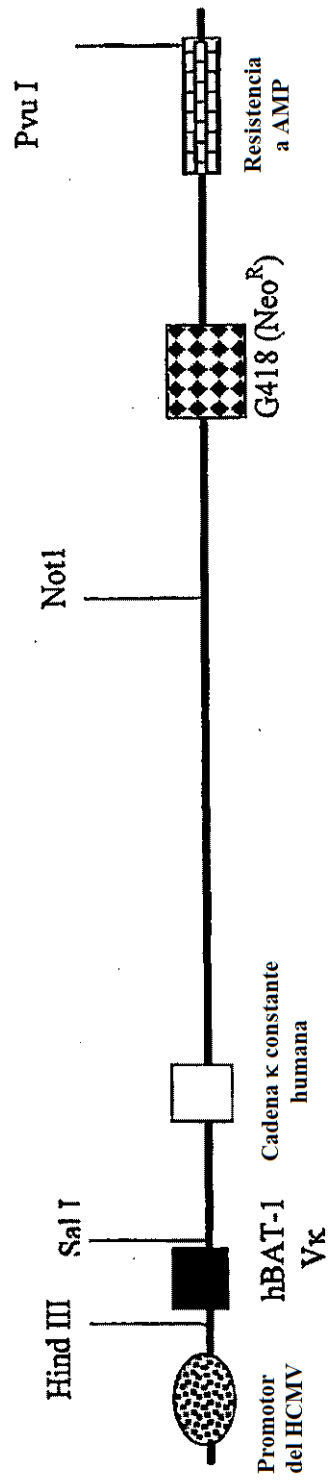


FIGURA 11

```

1  AAGCTTGCCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCAACA 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCGAACGGCGGTGGTACCTGACCTGGACCTCCTAGGAGAAGAACCACCGTCGTCGTTGT
           M D W T W R I L F L V A A A T

61  GGTGCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGC AATCTGGGCTCTGAGCTTAAGAAGCCTGGGGCC 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCACGGGTGAGGGTCCACGTCGACCACGTTAGACCCAGACTCGAATTCTTCGGACCCCGG
           G A H S Q V Q L V Q S G S E L K K P G A

121 TCAGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATCTTTCCCAACTATGGAATGAACTGG 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTCACTTCTAGAGGACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTGATACCTTACTTGACC
           S V K I S C K A S G Y S F S N Y G M N W

181 GTGCGACAGSCCCCTGGACAAGGGCTTCAGTGGATGGGATGGATAAACACCGACAGTGGA 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CACGCTGTCCGGGGACCTGTTCCCGAAGTCACCTACCTACCTATTTGTGGCTGTACCT
           V R Q A P G Q G L Q W M G W I N T D S G

241 GAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCTGCCAAACAGAAGAGGAACCTGTGGAGACAG
           E S T Y A E E F K G R F V F S L D T S V

301 AACACGGCATATCTGCAGATCACGAGCTCACGGCTGAGGACACTGGCATGTATTTCTGT 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTGTGCCGTATAGACGTCTAGTGGTGGAGTGCCGACTCCTGTGACCGTACATAAAGACA
           S T A Y L Q I T S L T A E D T G M Y F C

361 GCGAAGTCCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CACTCTCAGCCGATGCTACGAACCTGATGACCCCGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGG
           A K V G Y D A L D Y W G Q G T L V T V S

421 TCAGGTGAGTGGATCC 436
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTCCACTCACCTAGG

```

S.

FIGURA 12

```

1  AAGCTTGCEGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCAACA 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCGAACGGCGGTGGTACCTGACCTGGACCTCCTAGGAGAAGAACCACCGTCGTCGTTGT
       M D W T W R I L F L V A A A T

61  GGTGCCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGGTCTGAGCTTAAGAAGCCTGGGGCC 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCACGGGTGAGGGTCCACGTCGACCACGTTAGACCCAGACTCGAATTCTTCGGACCCCGG
       G A H S Q V Q L V Q S G S E L K K P G A

121 TCAGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACTTTCACAACTATGGAATGAACTGG 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTCACTTCTAGAGGACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTTTGATACCTTACTTGACC
       S V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W

181 GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTCAGTGGATGGGATGGATAAACACCGACAGTGGA 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CACGCTGTCCGGGGACCTGTTCCGAAGTCACCTACCCTACCTATTTGTGGCTGTACCT
       V R Q A P G Q G L Q W M G W I N T D S G

241 GAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCTGCCAACAGAAAGAGGAACCTGTGGAGACAG
       E S T Y A E E F K G R F V F S L D T S V

301 AGCACGGCATACTGCAGATCACCAGCCTCACGGCTGAGGACACTGGCATGTATTTCTGT 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TCGTGCCGTATAGACGTCTAGTGGTGGGAGTGCCGACTCCTGTGACCGTACATAAAGACA
       S T A Y L Q I T S L T A E D T G M Y F C

361 GTGAGAGTCCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCC 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGCTTTCAGCCGATGCTACGAAACCTGATGACCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGG
       V R V G Y D A L D Y W G Q G T L V T V S

421 TCAGGTGAGTGGATCC 436
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTCCACTCACCTAGG

```

S

FIGURA 13

```

1  AAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCAACA 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCGAACGGCGGTGGTACCTGACCTGGACCTCCTAGGAGAAGAACCACCGTCGTCGTTGT

           M D W T W R I L F L V A A A T

61  GGTGCCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGCTTAAGAAGCCTGGGGCC 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCACGGGTGAGGGTCCAGGTCGACCAAGTTAGACCCAGACTCGAATTCTTCGGACCCCGG

           G A H S Q V Q L V Q S G S E L K K P G A

121 ICAGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACTTTCACAAACTATGGAATGAACTGG 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTCACTTCTAGAGGACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTGTTGATACCTTACTTGACC

           S V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W

181 GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTCAGTGGATGGGATGGATAAACACCGACAGTGG 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CACGCTGTCCGGGGACCTGTTCCCGAAGTCACCTACCTACCTATTTGTGGCTGTACCT

           V R Q A P G Q G L Q W M G W I N T D S G

241 GAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCTGCCAAACAGAAGAGGAACCTGTGGAGACAG

           E S T Y A E E F K G R F V F S L D T S V

301 AACACGGCATATCTGCAGATCACCAGCCTCACGGCTGAGGACACTGGCATGTATTTCTGT 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTGTGCCGTATAGACGTCTAGTGGTCCGAGTGCCGACTCCTGTGACCGTACATAAAGACA

           N T A Y L Q I T S L T A E D T G M Y F C

361 GCGAAGTCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGAAACCCTGGTCACCGTCTCC 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CACTCTCAGCCGATGCTACGAAACCTGATGACCCCGTCCCTTGGGACCAGTGGCAGAGG

           A K V G Y D A L D Y W G Q G T L V T V S

421 TCAGGTGAGTGGATCC 436
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AGTCCACTCACCTAGG

```

S

FIGURA 14

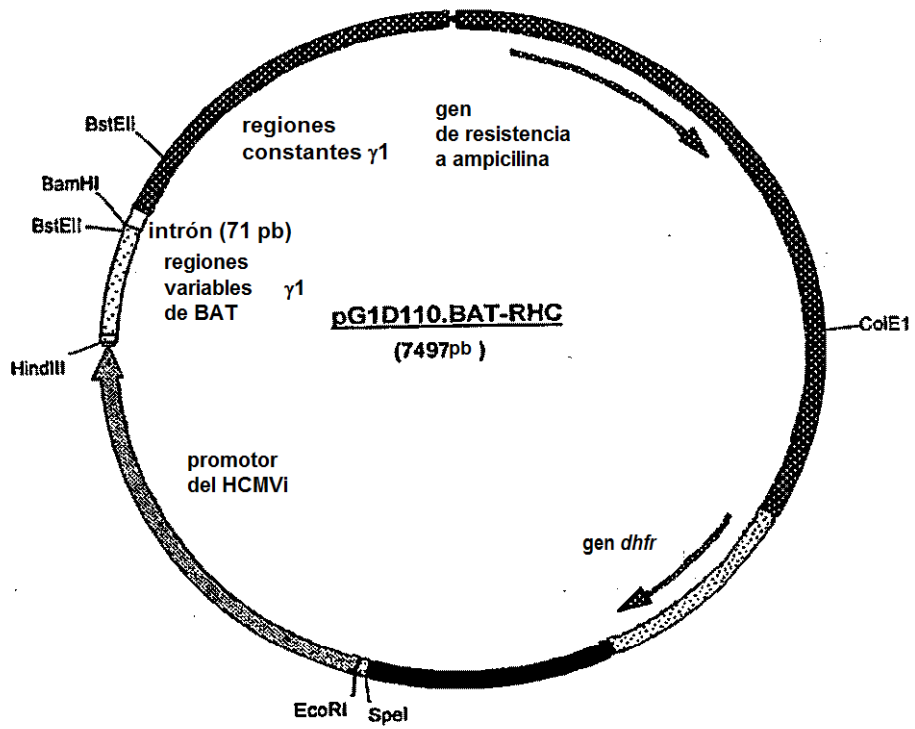


FIGURA 15

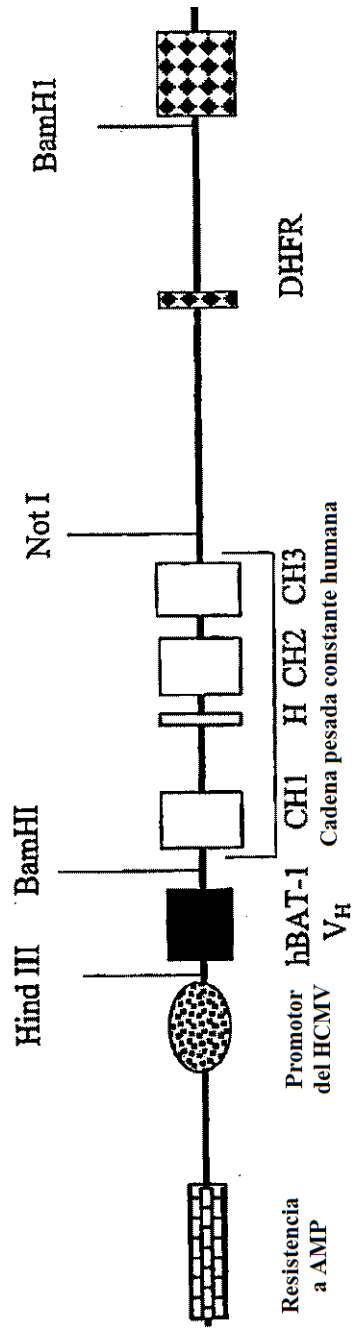


FIGURA 16

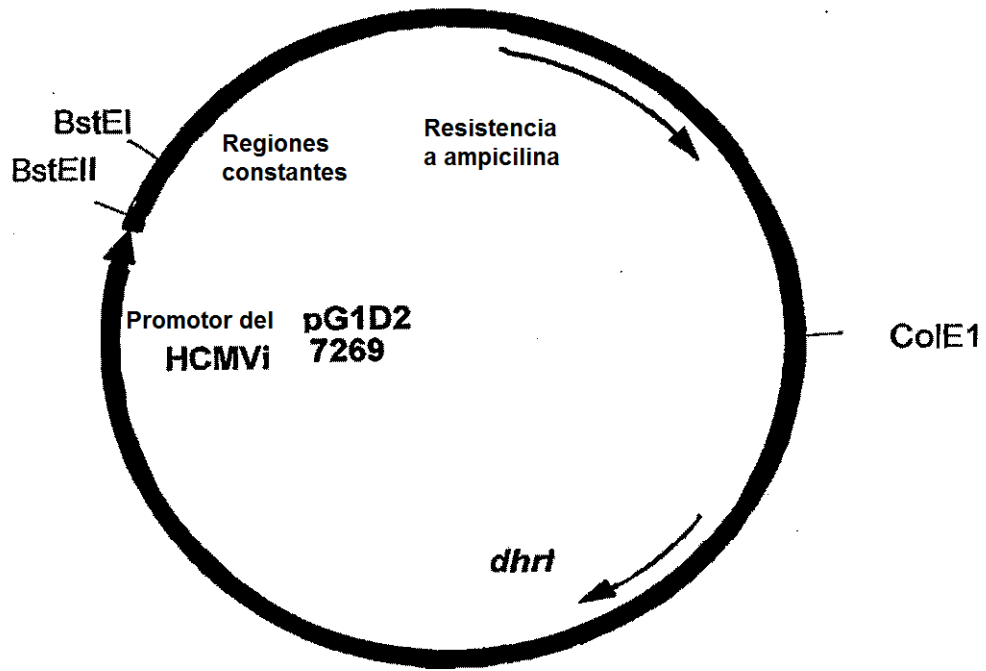


FIGURA 17

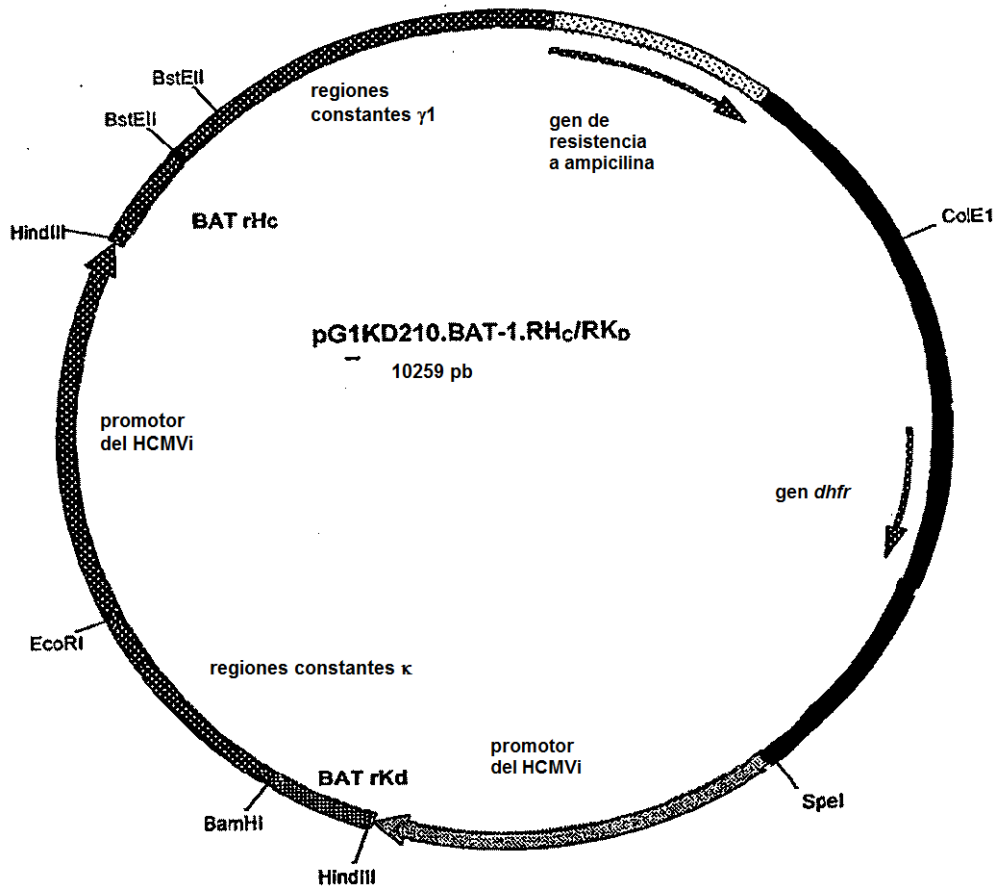


FIGURA 18

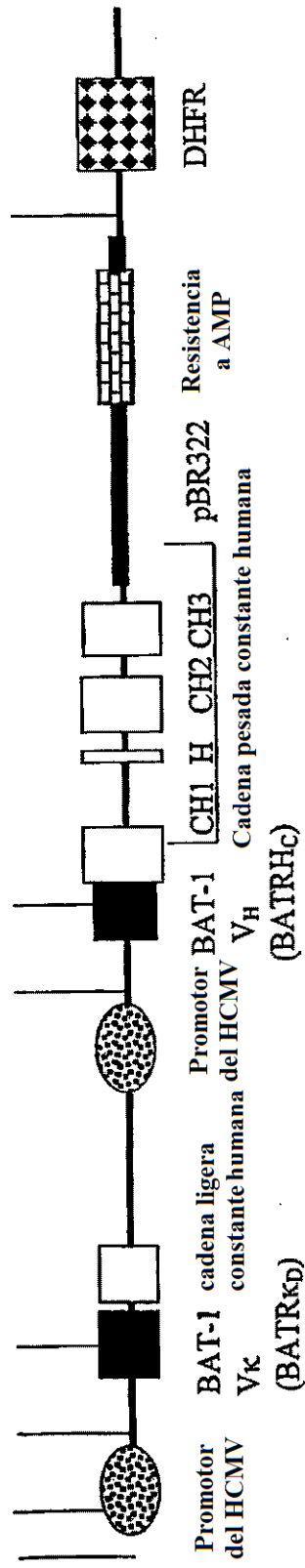


FIGURA 19

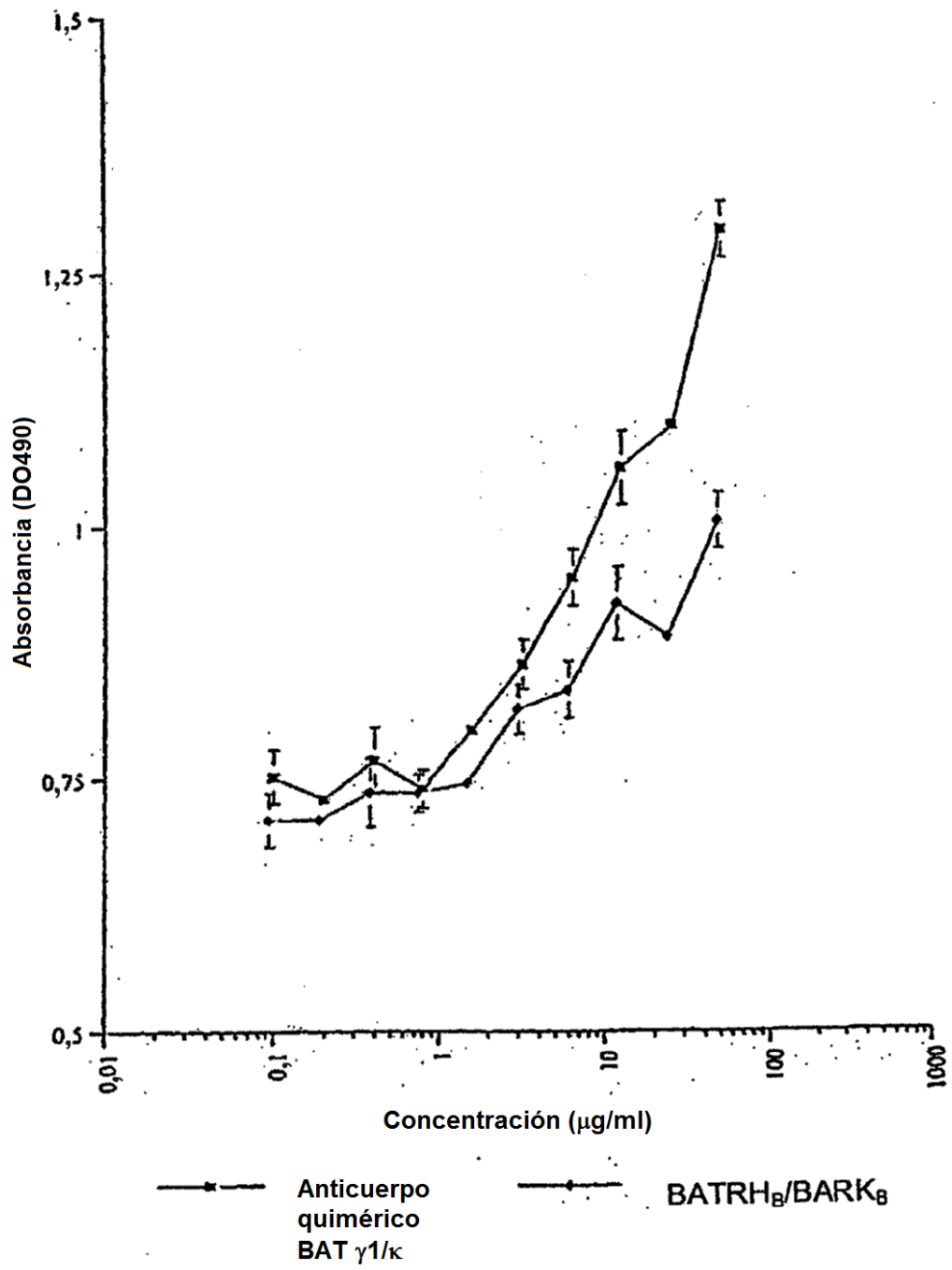


FIGURA 20

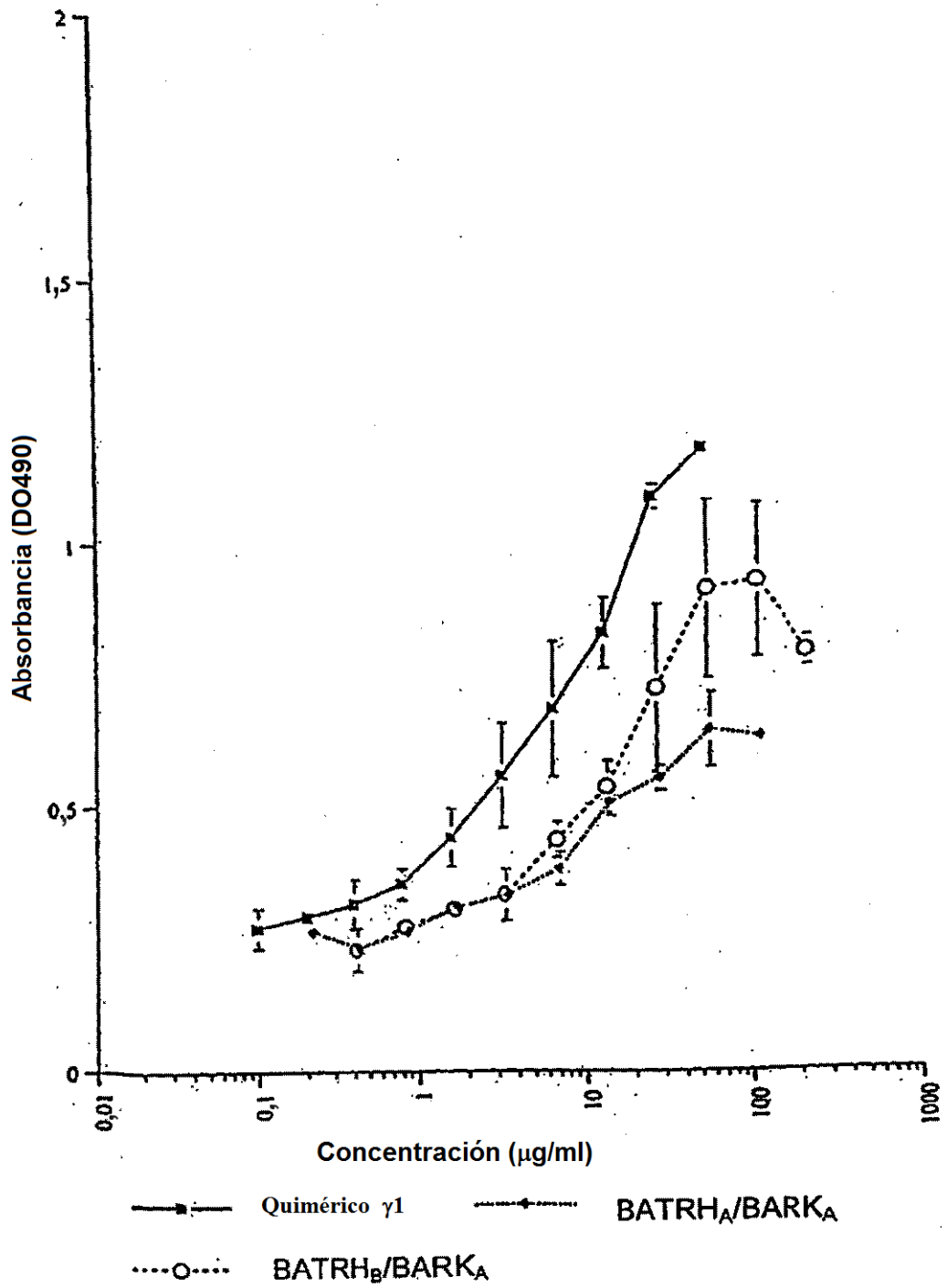


FIGURA 21

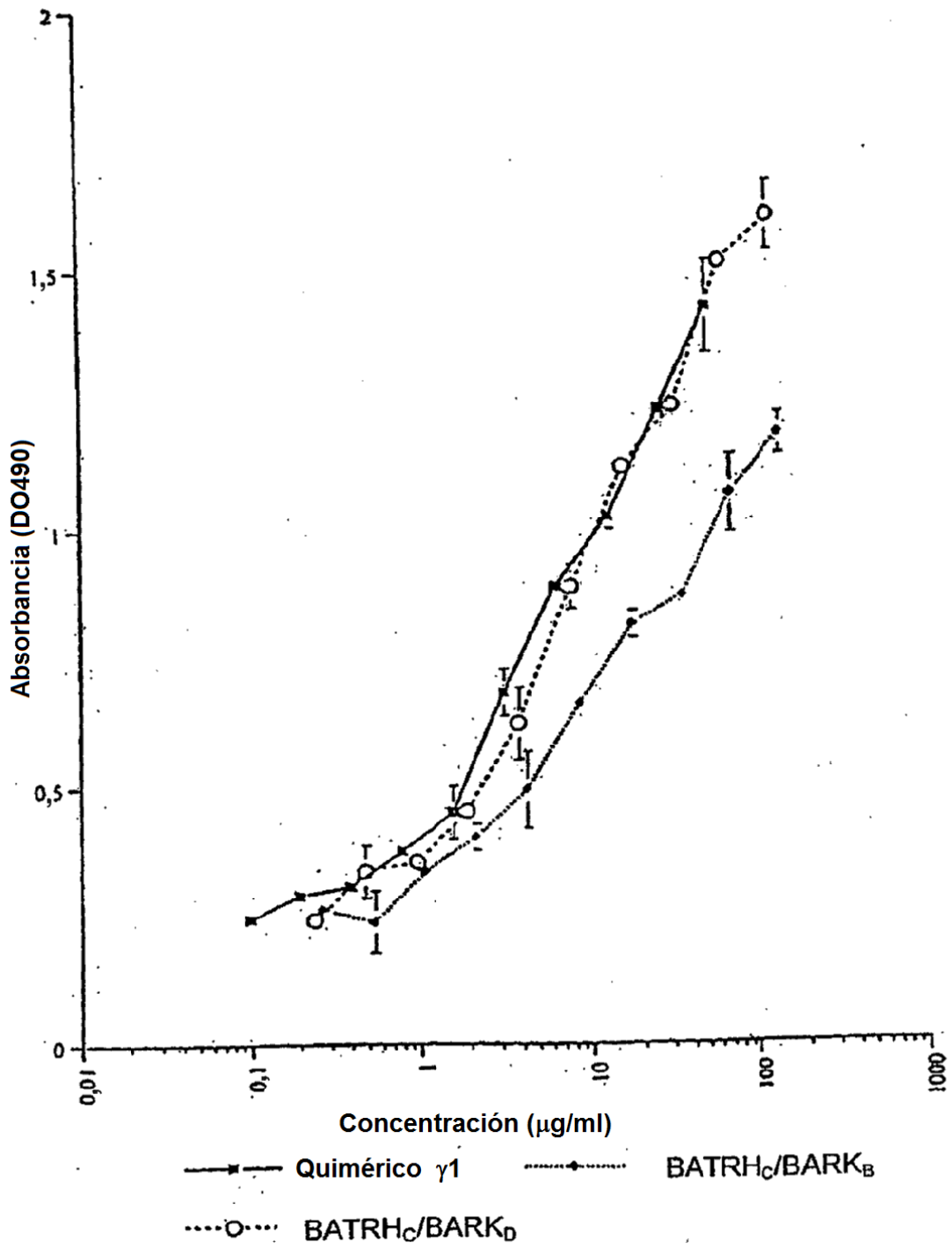


FIGURA 22

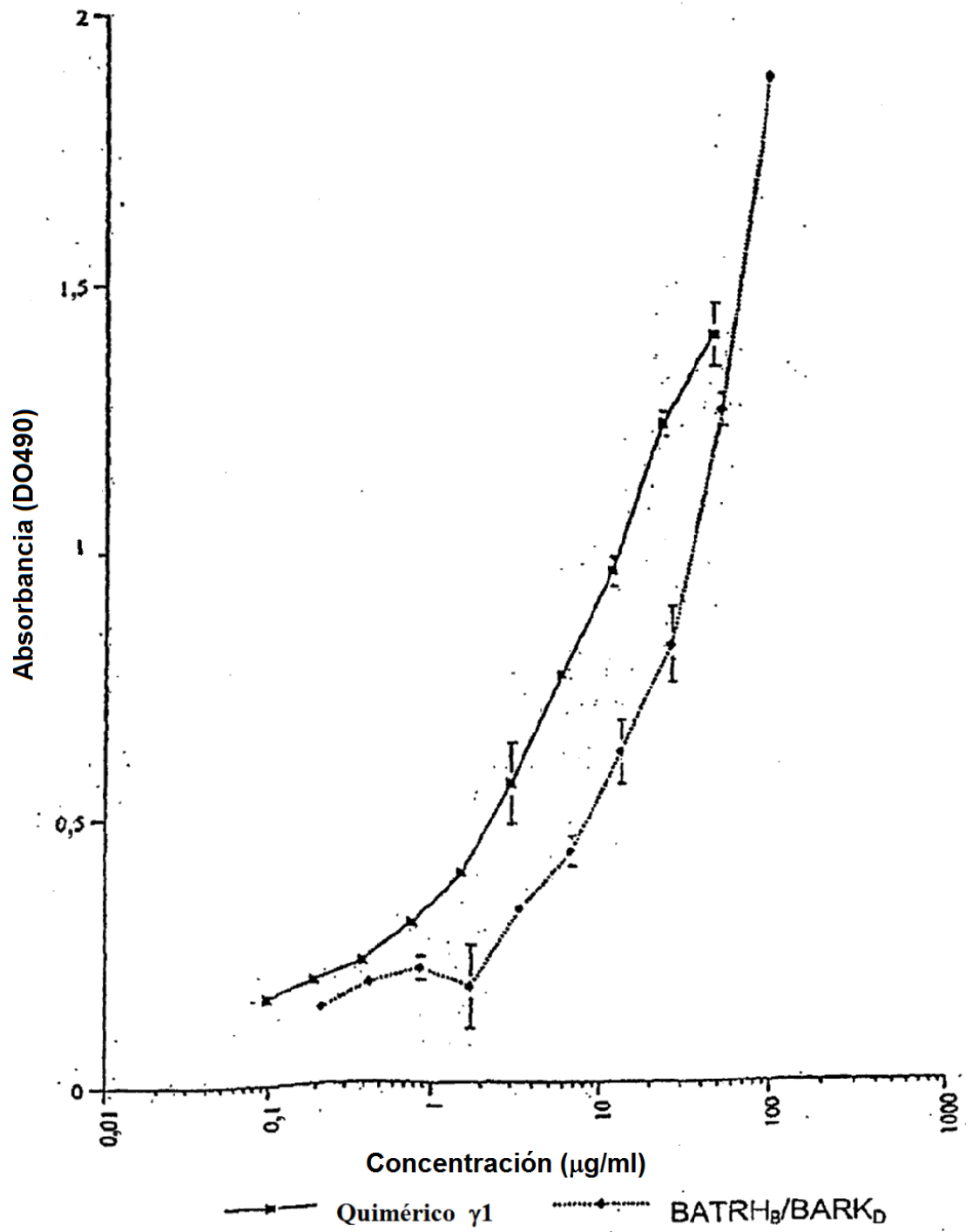


FIGURA 23

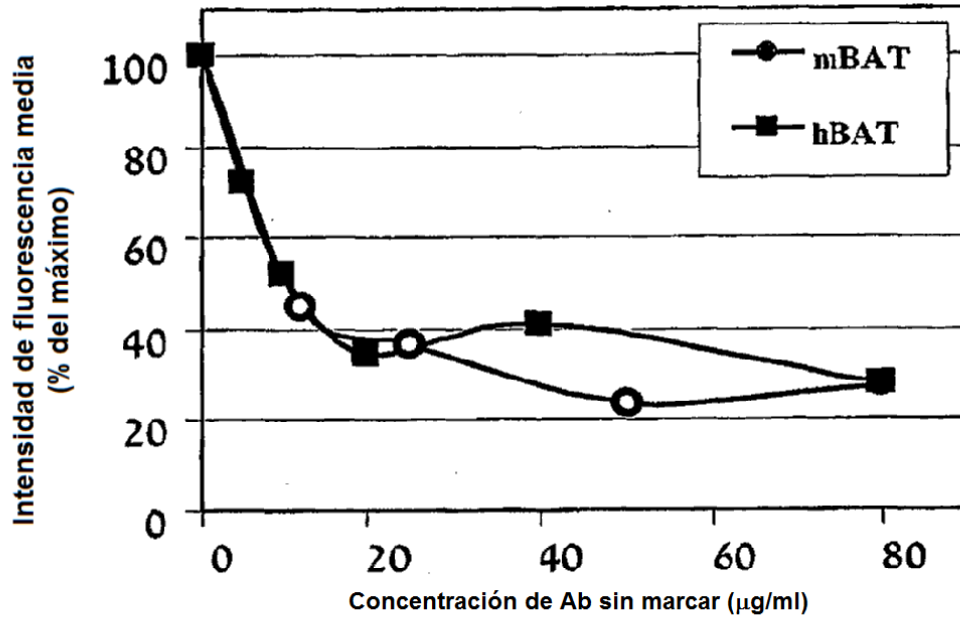


FIGURA 24

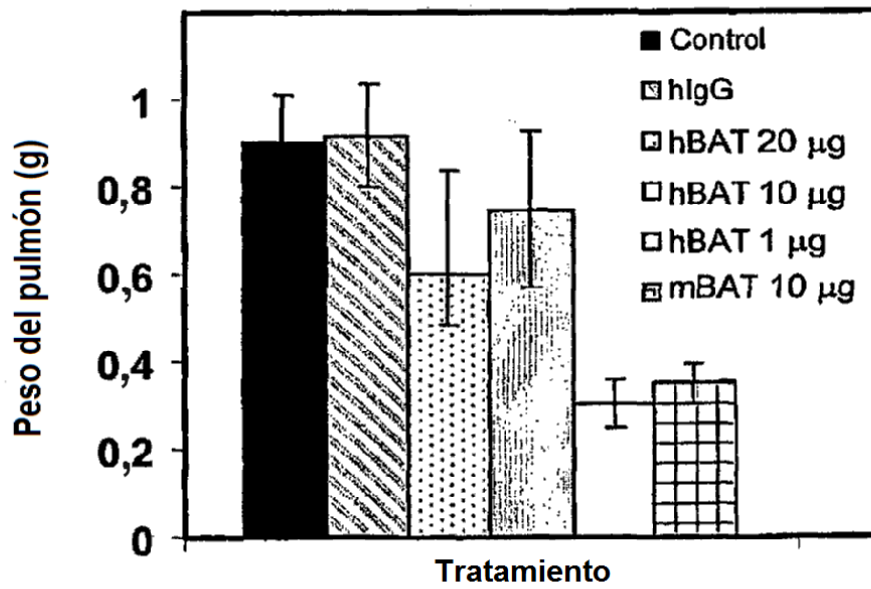


FIGURA 25

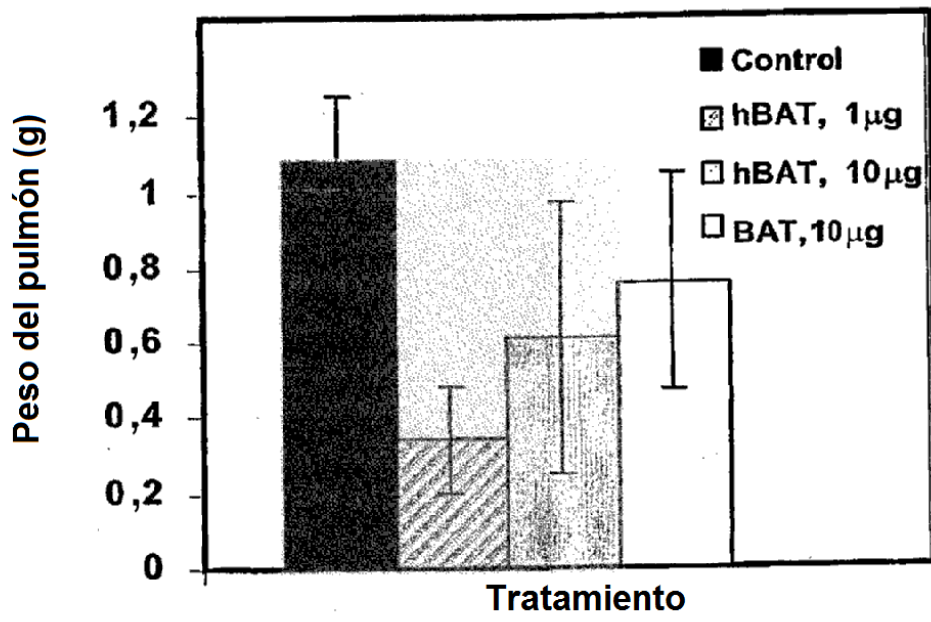


FIGURA 26

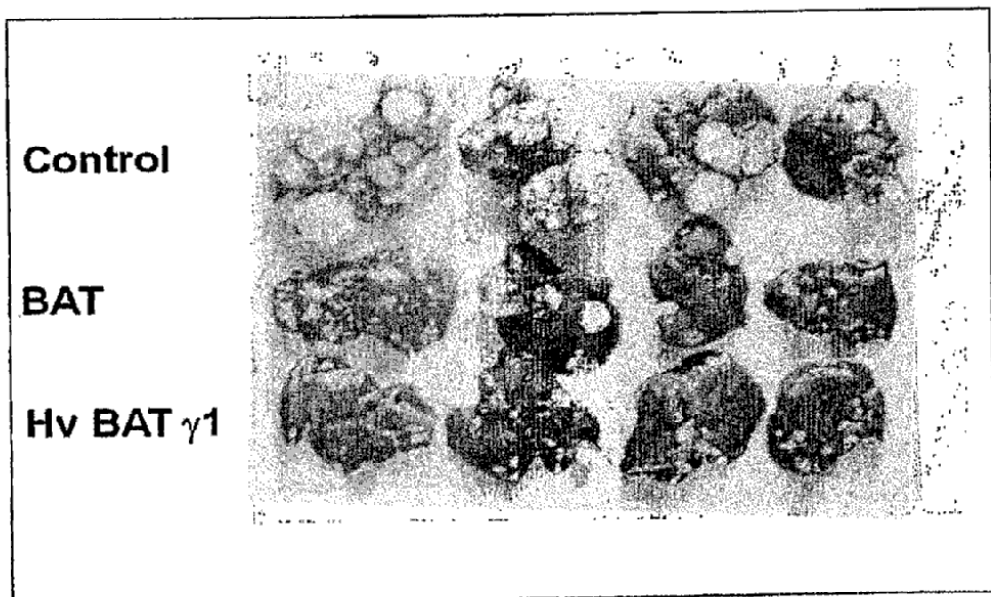


FIGURA 27

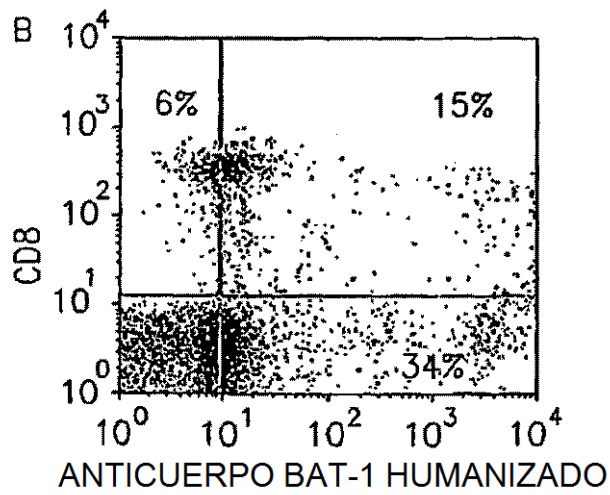
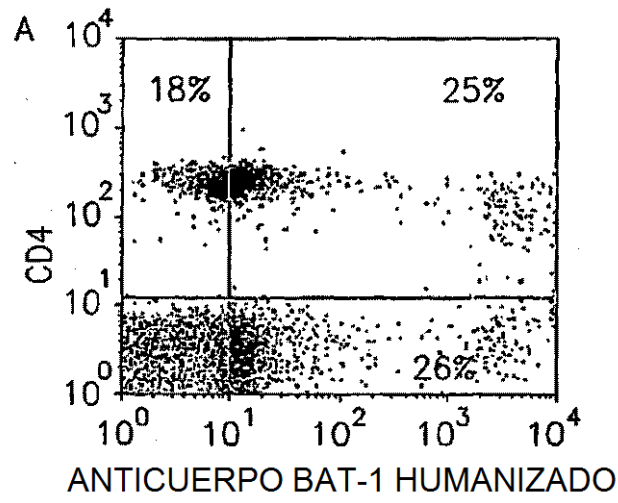


FIGURA 28

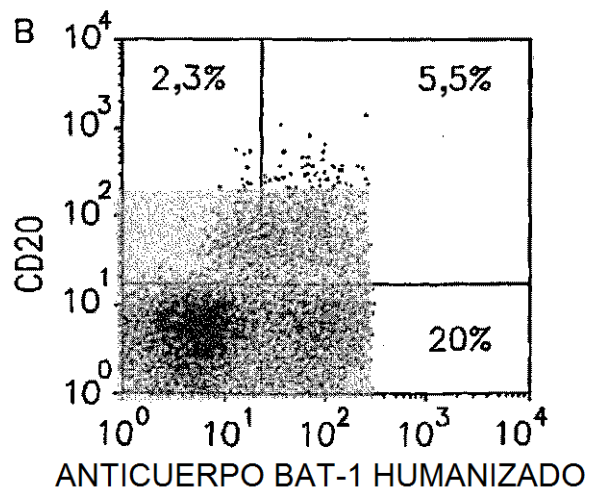
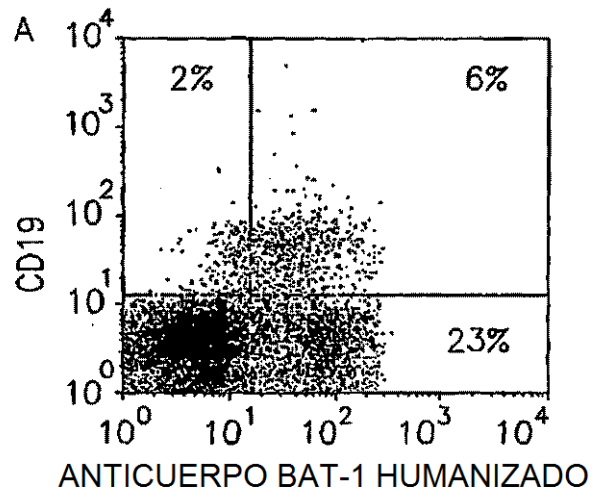


FIGURA 29

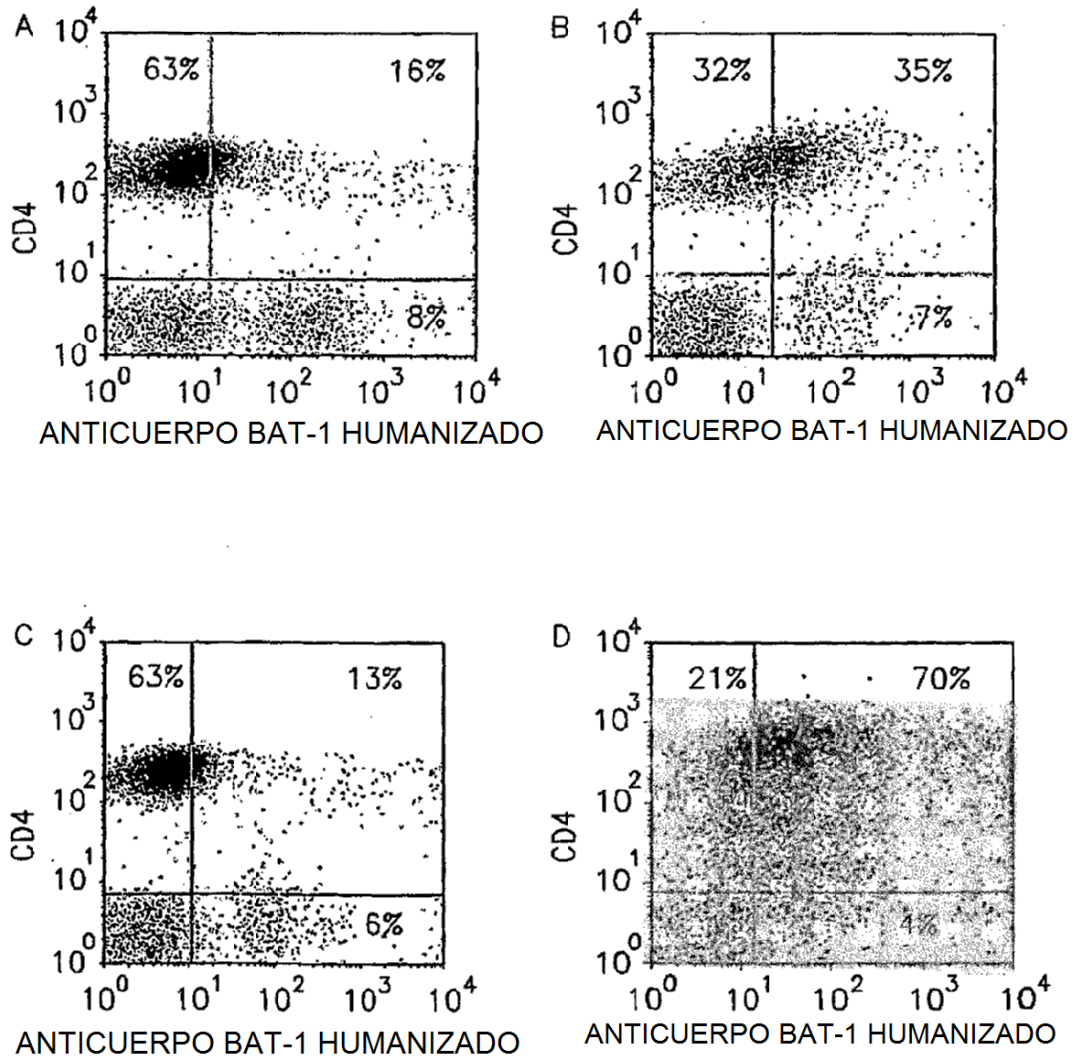


FIGURA 30

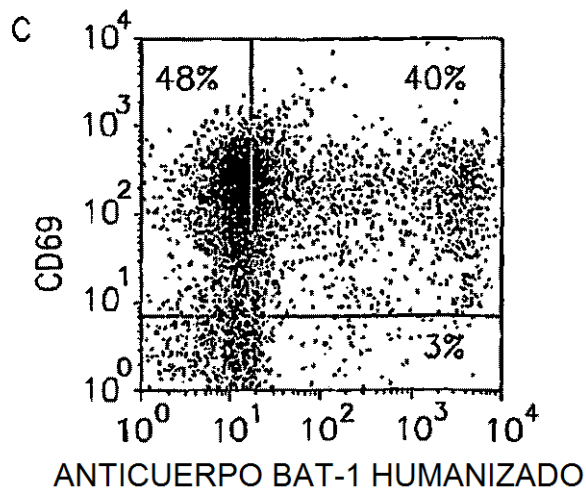
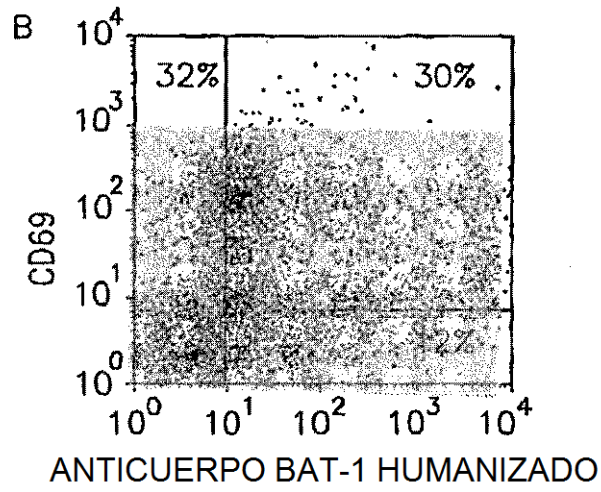
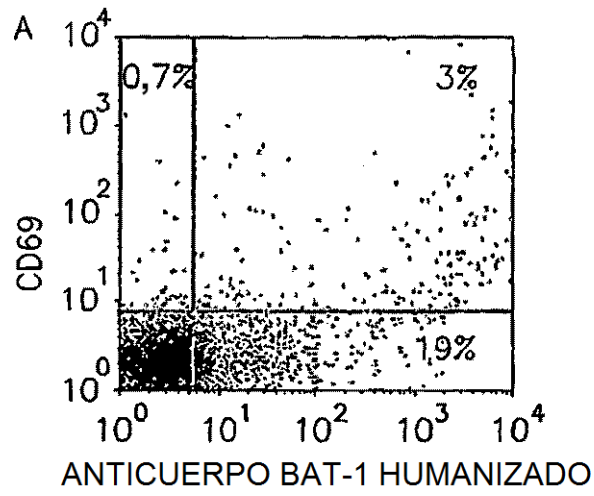


FIGURA 31

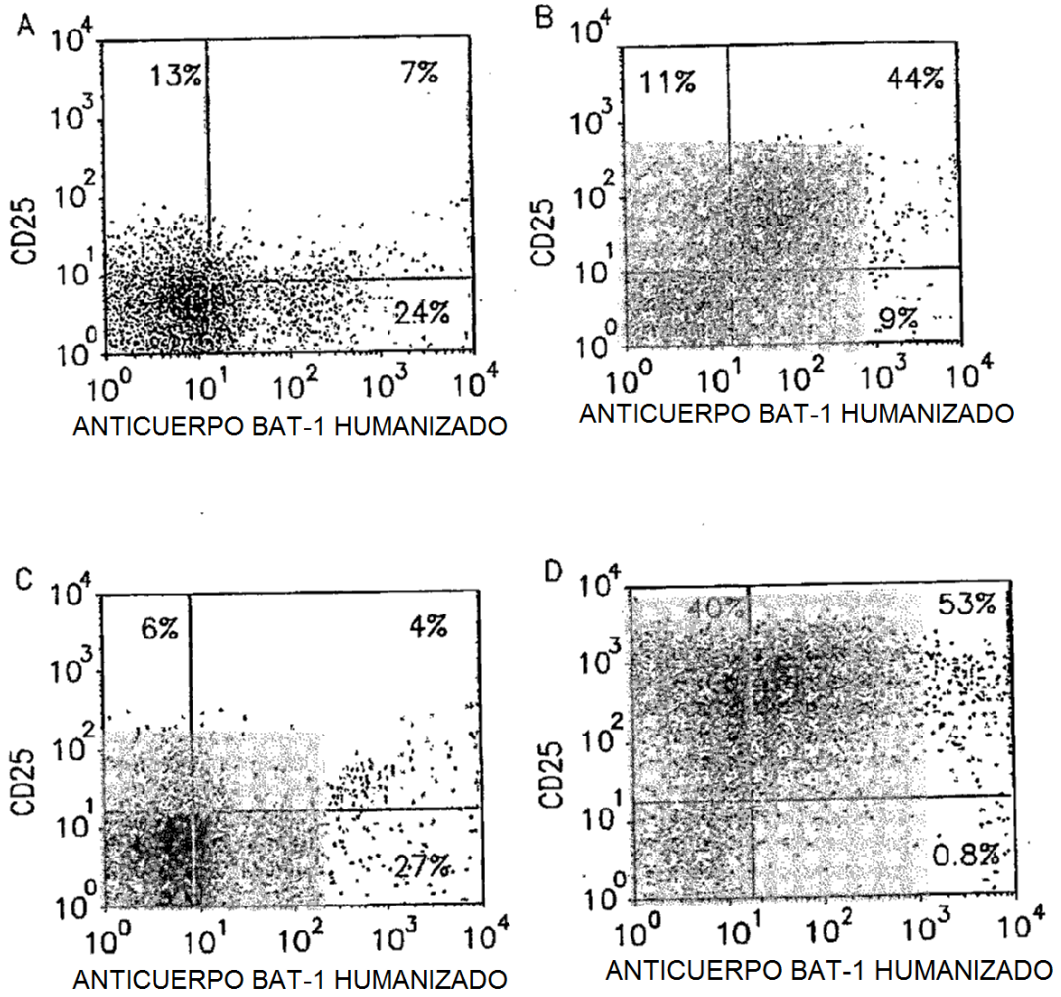


FIGURA 32

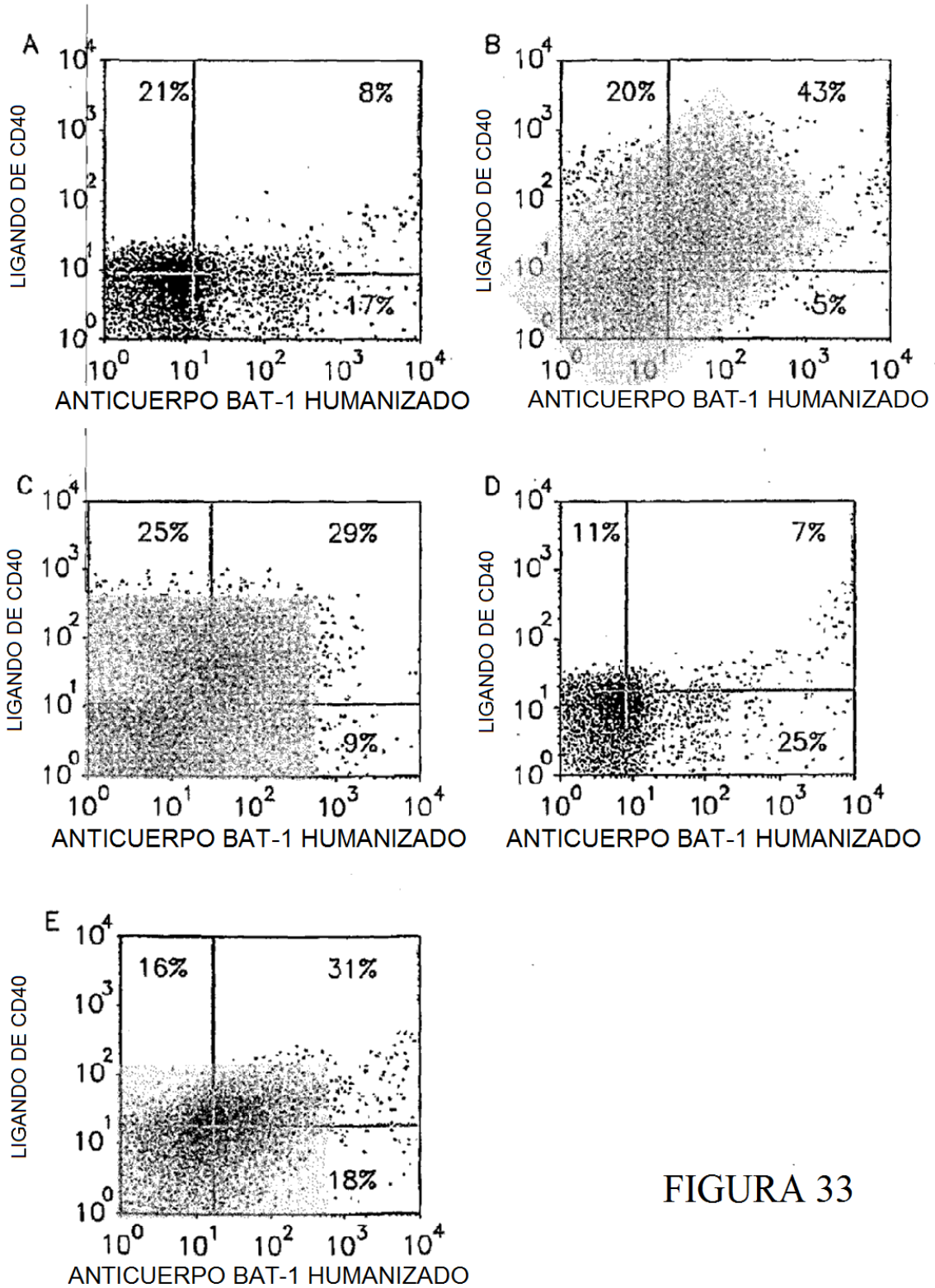
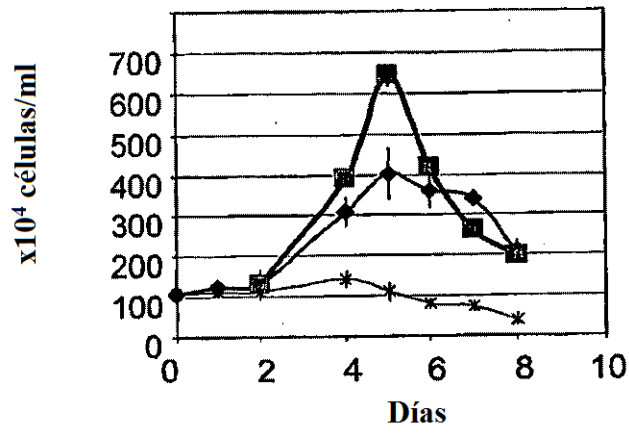


FIGURA 33

A



B

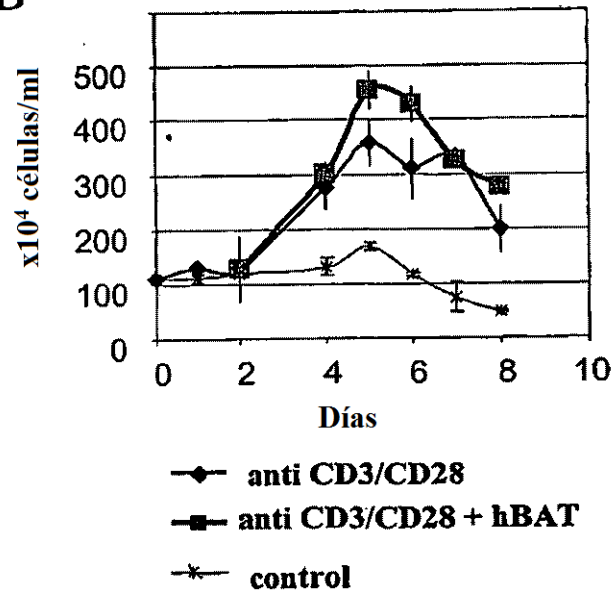


FIGURA 34

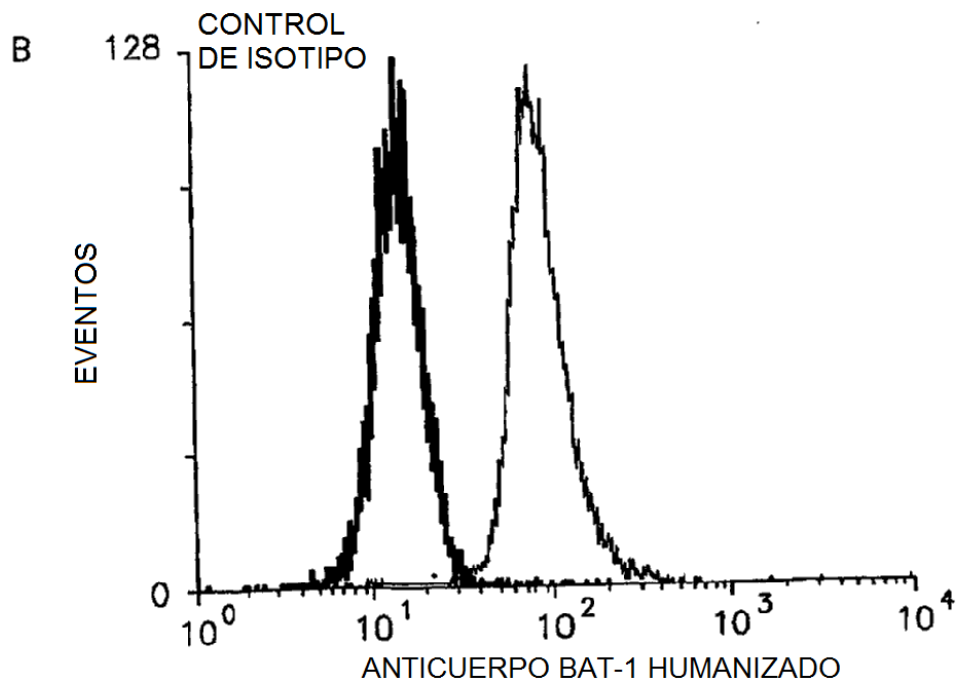
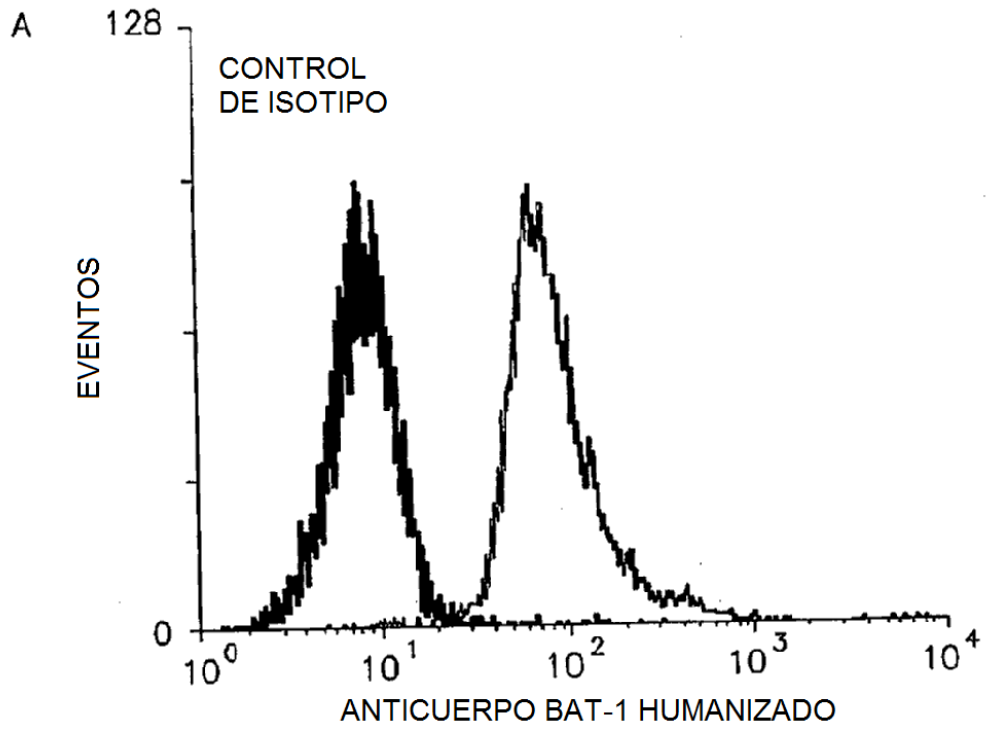


FIGURA 35

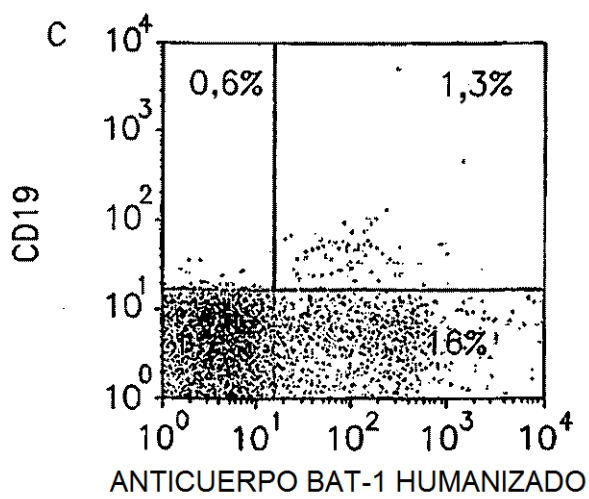
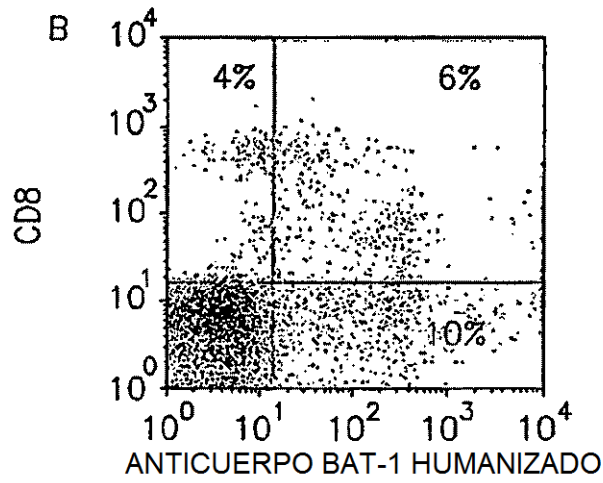
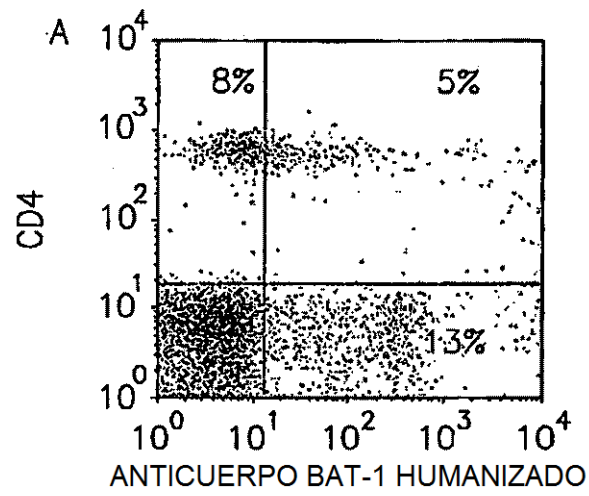


FIGURA 36