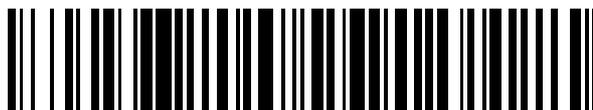


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 161**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2005 PCT/FR2005/003123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2006 WO06064121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2005 E 05825974 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 1824887**

54 Título: **Anticuerpo citotóxico dirigido contra las proliferaciones hematopoyéticas linfoides de tipo B**

30 Prioridad:

15.12.2004 FR 0413320

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2016

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
3 avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis , FR**

72 Inventor/es:

**DE ROMEUF, CHRISTOPHE;
GAUCHER, CHRISTINE;
TEILLAUD, JEAN-LUC y
PROST, JEAN-FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 588 161 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo citotóxico dirigido contra las proliferaciones hematopoyéticas linfoides de tipo B.

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20, caracterizado por que cada una de sus cadenas ligeras está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID N: 27 y por que cada una de sus cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19, así como a la utilización de este anticuerpo para activar los receptores FcγRIII de células inmunitarias efectoras, y para la fabricación de un medicamento, destinado en particular al tratamiento de una leucemia o de un linfoma.

Introducción y técnica anterior

15 El antígeno CD20 es una proteína transmembranaria hidrófoba de un peso molecular de 35-37 kDa presente en la superficie de los linfocitos B maduros (Valentine *et al.* 1987 Proc Natl Acad Sci USA. 84 (22): 8085-9; Valentine *et al.* 1989 J. Biol. Chem. 264 (19):11282-11287). Se expresa durante el desarrollo de los linfocitos B a partir de la fase pre-B precoz y hasta la diferenciación en plasmocito / fase en la que esta expresión desaparece. El antígeno CD20 está presente al mismo tiempo en los linfocitos B normales y en las células B malignas. Más particularmente, el antígeno CD20 se expresa en la mayoría de los linfomas de fenotipo B (80% de los linfomas): se expresa por ejemplo en más del 90% de los linfomas no-Hodgkinianos (NHL) de linfocitos B, y en más del 95% de las Leucemias Linfoides Crónicas de tipo B (LLC-B). El antígeno CD20 no se expresa en las células cepas hematopoyéticas ni en los plasmocitos.

20 La función de CD20 no está todavía totalmente elucidada, pero podría actuar como un canal cálcico e intervenir en la regulación de las primeras etapas de la diferenciación (Golay *et al.* 1985 J Immunol.; 135(6):3795-801) y de la proliferación (Tedder *et al.* 1986 Eur J Immunol. agosto de 1986; 16(8):881-7) de los linfocitos B.

25 Así, a pesar de que subsisten incertidumbres en cuanto a su papel en la activación y la proliferación de los linfocitos B, el antígeno CD20 es, debido a su localización, una diana importante para el tratamiento de las patologías que implican unos linfocitos B tumorales, como por ejemplo los NHL o la LLC-B por unos anticuerpos que reconocen específicamente el CD20. Además, este antígeno es una diana ideal ya que se trata de una proteína membranaria para la cual no se conoce ninguna modulación de expresión o de polimorfismo.

30 Un solo anticuerpo monoclonal anti-CD20 no radiomarcado, el Rituxan® (Genentech), está en la actualidad comercialmente disponible para el tratamiento de los linfomas de células B. Muestra en los pacientes que padecen NHL unos resultados clínicos esperanzadores cuando está asociado a una quimioterapia. Sin embargo, su eficacia sigue siendo variable y frecuentemente modesta cuando se utiliza como agente único (Teeling *et al.* 2004 Blood 104 (6): 1793-800).

35 Por otro lado, el Rituxan® tiene sólo un efecto modesto en los linfocitos B de LLC-B. Esta baja eficacia está relacionada con diferentes fenómenos: por un lado, los linfocitos B de LLC-B expresan el CD20 sólo en una cantidad relativamente baja, por otro lado, el Rituxan® induce sólo una muy baja actividad ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) frente a estas células *in vitro*. Estas dos observaciones podrían explicar la correlación constatada entre el grado de expresión del CD20 sobre el tumor (en citometría de flujo cuantitativa) y la respuesta al tratamiento. Se ha descrito un clon YB2/0 denominado KM3065, que produce una variante del Rituxan® que posee las mismas secuencias de aminoácidos, pero una glicosilación optimizada. Debido a su glicosilación optimizada, el anticuerpo producido por este clon posee una capacidad más fuerte para inducir una respuesta ADCC por parte de las células efectoras del sistema inmunitario (Shinkawa *et al.* 2003. J Biol Chem. 31 de enero de 2003; 278(5):3466-73).

40 Al ser la LLC-B la forma de leucemia más frecuente en los países occidentales, con unos tratamientos pesados por quimioterapia a veces insuficientes, que comprende unos efectos secundarios que llevan a una aplasia de las células hematopoyéticas y a una deficiencia inmunitaria, los anticuerpos monoclonales aparecen como un recurso innovador. Por lo tanto, es de principal importancia poner a punto unos anticuerpos capaces de tener como diana específicamente el antígeno CD20 y que permiten destruir las células tumorales que expresan solo débilmente este antígeno como la LLC-B.

45 Los anticuerpos 2F2 y 7D8 propuestos por Genmab (Teeling *et al.* 2004 Blood 104 (6). -1793-800) para tratar la LLC-B poseen una capacidad para activar el complemento superior a la generada por el Rituxan®. Sin embargo, estos anticuerpos poseen una actividad ADCC baja, similar al Rituxan®. Ahora bien, algunos clínicos muestran que la actividad complemento es la causa de efectos secundarios deletéreos ya que los anticuerpos inician entonces un sistema de activación que conduce a la producción de moléculas (en particular de anafilatoxinas) que tienen un amplio espectro de actividades no específicas (reacciones inflamatorias, alérgicas, vasculares, etc.). Además, estos anticuerpos están todavía en fase de investigación, y su eficacia clínica está todavía por evaluar.

50

El solicitante, en su solicitud FR 03/02713 (WO 2004/029092), describe un anticuerpo anti-CD20, susceptible de ser producido en la línea YB2/0, seleccionado por sus capacidades para inducir una fuerte ADCC y una fuerte tasa de producción de IL-2 por la célula Jurkat-CD16 en comparación con el Rituxan®. En efecto, existe una necesidad importante de nuevos anticuerpos anti-CD20, que permita ampliar la gama de tratamiento de enfermedades de los linfocitos B por inmunoterapia propuesta actualmente, muy particularmente para las patologías de los linfocitos B en las que el antígeno CD20 está débilmente expresado sobre las poblaciones de linfocitos B implicadas y para las cuales no existe un tratamiento por inmunoterapia satisfactorio.

Es con este objetivo que el solicitante ha puesto a punto nuevos anticuerpos anti-CD20, que presentan una actividad ADCC particularmente elevada comparada con el Rituxan®.

Descripción

Un primer objeto de la invención se refiere así a un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20, caracterizado por que cada una de sus cadenas ligeras está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 27 y por que cada una de sus cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19.

Los anticuerpos están constituidos por cadenas pesadas y por cadenas ligeras, unidas entre si por unos puentes disulfuros. Cada cadena está constituida, en posición N-terminal, por una región (o dominio) variable (codificada por los genes reorganizados V-J para las cadenas ligeras y V-D-J para las cadenas pesadas) específica del antígeno contra el cual está dirigido el anticuerpo, y en posición C-terminal, por una región constante, constituida por un solo dominio CL para las cadenas ligeras o por varios dominios para las cadenas pesadas.

Con los fines de la invención, las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos que poseen una especificidad idéntica y única.

El anticuerpo según la invención, del cual las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas pertenecen a una especie diferente de las regiones constantes de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas, se califica de anticuerpo "quimérico".

La presente descripción describe además un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20, del cual la región variable de cada una de las cadenas ligeras está codificada por una secuencia que posee al menos 70% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5, la región variable de cada una de las cadenas pesadas está codificada por una secuencia que posee al menos 70% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7, y las regiones constantes de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas son unas regiones constantes que proceden de una especie no-murina.

Las secuencias de ácido nucleico murinas SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 codifican para el dominio variable de cada una de las cadenas ligeras y el dominio variable de cada una de las cadenas pesadas respectivamente del anticuerpo producido por el hibridoma murino CAT-13.6E12, disponible en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bajo el número ACC 474. Este hibridoma produce un anticuerpo monoclonal murino de tipo IgG2a, κ dirigido contra el CD20.

Estas secuencias murinas se han seleccionado para derivar las secuencias de las regiones variables de los anticuerpos descritos en la presente memoria, debido a la especificidad del anticuerpo murino CAT-13.6E12 para el antígeno CD20, antígeno también conocido por Rituxan®. Las regiones variables de los anticuerpos descritos en la presente memoria comprenden al menos 70% de identidad con las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7, confiriendo esta identidad de secuencias una identidad de especificidad de los anticuerpos descritos en la presente memoria con el anticuerpo murino CAT-13.6E12. Preferiblemente, esta identidad de secuencias confiere asimismo una identidad de afinidad para la diana entre el anticuerpo descrito en la presente memoria y el anticuerpo murino CAT-13.6E12.

Además, el solicitante ha demostrado de manera sorprendente que el anticuerpo murino CAT-13.6E12 posee la capacidad de inducir la secreción de IL-2 en presencia de células Jurkat-CD16 que expresan los ectodominios del receptor Fc γ R111A (como se ilustra en la Figura 11), que indica una fuerte fijación del anticuerpo murino con el CD16 (Fc γ R111A) humano, lo cual ha motivado aún más el solicitante en su elección.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria poseen además unas regiones constantes de sus cadenas ligeras y pesadas que pertenecen a una especie no-murina. A este respecto, todas las familias y especies de mamíferos no-murinos son susceptibles de ser utilizadas, y en particular el ser humano, el simio, los muridos (salvo el ratón), los suidos, los bóvidos, los équidos, los félicos, los cánidos, por ejemplo, así como los pájaros.

El anticuerpo según la invención y los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser construidos utilizando las técnicas estándares del ADN recombinante, bien conocidas por el experto en la materia, y más particularmente utilizando las técnicas de construcción de los anticuerpos "quiméricos" descritas por ejemplo en

Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, p. 6851-55 (1984), en las que se utiliza la tecnología del ADN recombinante para reemplazar la región constante de una cadena pesada y/o la región constante de una cadena ligera de un anticuerpo que procede de un mamífero no-humano con las regiones correspondientes de una inmunoglobulina humana. Un modo de realización particular se ilustrará más adelante.

5 De manera ventajosa, la región variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo descritas en la presente memoria está codificada por una secuencia que posee al menos 80% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descritas en la presente memoria está codificada por una secuencia que posee al menos 80% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7.

15 De manera ventajosa, la región variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo descritas en la presente memoria está codificada por una secuencia que posee al menos 90% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descritas en la presente memoria está codificada por una secuencia que posee al menos 90% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7.

20 De manera ventajosa, la región variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo descritas en la presente memoria está codificada por una secuencia que posee al menos 95% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descritas en la presente memoria está codificada por una secuencia que posee al menos 95% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7.

25 De manera ventajosa, la región variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo descritas en la presente memoria está codificada por una secuencia que posee al menos 99% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descritas en la presente memoria está codificada por una secuencia que posee al menos 99% de identidad con la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7.

30 Ventajosamente, la presente descripción se entiende también de cualquier anticuerpo que posee unas regiones variables de sus cadenas pesadas y ligeras que presentan una o varias sustituciones, inserciones o deleciones de uno o varios ácidos nucleicos, respondiendo estas modificaciones de secuencias a los porcentajes de identidades de secuencias tales como se han definido anteriormente, y que no alteran ni la especificidad del anticuerpo para su diana, ni su afinidad para su diana.

35 Los anticuerpos descritos en la presente memoria se entienden también de cualquier anticuerpo que posee las regiones CDR (Complementary Determining Region) del anticuerpo CAT-13.6E12, asociadas a unas regiones FR (framework, regiones muy conservadas de las regiones variables, denominadas también "esqueleto"). Unos anticuerpos de este tipo poseen una afinidad y una especificidad muy comparables, preferiblemente idénticas, al anticuerpo murino CAT-13.6E12.

45 De manera preferida, la región variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo descrita en la presente memoria está codificada por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5 o por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 25, y la región variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descrita en la presente memoria está codificada por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7.

50 Un anticuerpo descrito en la presente memoria es por lo tanto un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20, del cual la región variable de cada una de las cadenas ligeras está codificada por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5, la región variable de cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7, y las regiones constantes de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas son unas regiones constantes que proceden de una especie no-murina.

55 Otro anticuerpo descrito en la presente memoria es por lo tanto un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20, del cual la región variable de cada una de las cadenas ligeras está codificada por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 25, la región variable de cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7, y las regiones constantes de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas son unas regiones constantes que proceden de una especie no-murina.

60 Estos dos anticuerpos difieren en su secuencia nucleotídica por un único nucleótido: el nucleótido situado en posición 318 de las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 25, que corresponde respectivamente a una citosina y a una adenina.

65 Estos dos anticuerpos poseen una especificidad comparable, preferiblemente idéntica con respecto al antígeno diana, el CD20, así como una afinidad comparable, preferiblemente idéntica con respecto al CD20.

De manera preferida, las regiones constantes de cada una de las cadenas ligeras y de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descrito en la presente memoria son unas regiones constantes humanas. Esto permite disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo en el ser humano y por lo tanto mejorar su eficacia en su administración terapéutica en el ser humano.

5 Preferiblemente, la región constante de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo descrito en la presente memoria es de tipo κ . Conviene cualquier alotipo, por ejemplo Km(1), Km(1, 2), Km(1, 2, 3) o Km(3) pero el alotipo preferido es Km(3).

10 De otra manera complementaria, la región constante de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo descrito en la presente memoria es de tipo λ .

15 En un aspecto particular, y particularmente cuando las regiones constantes de cada una de las cadenas ligeras y de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo son unas regiones humanas, la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descrito en la presente memoria es de tipo γ . Según esta variante, la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser de tipo $\gamma 1$, de tipo $\gamma 2$, de tipo $\gamma 3$, presentando estos tres tipos de regiones constantes la particularidad de fijar el complemento humano, o también de tipo $\gamma 4$. Los anticuerpos que poseen una región constante de cada una de las cadenas pesadas de tipo γ pertenecen a la clase de las IgG. Las inmunoglobulinas de tipo G (IgG), son unos heterodímeros constituidos por 2 cadenas pesadas y por 2 cadenas ligeras, unidas entre sí por unos puentes disulfuros. Cada cadena está constituida, en posición N-terminal, por una región o dominio variable (codificada por los genes reorganizados V-J para la cadena ligera y V-D-J para la cadena pesada) específica del antígeno contra el cual está dirigido el anticuerpo, y en posición C-terminal, por una región constante, constituida por un único dominio CL para la cadena ligera o por 3 dominios (CH1, CH2 y CH3) para la cadena pesada. La asociación de los dominios variables y de los dominios CH1 y CL de las cadenas pesadas y ligeras forma las partes Fab, que están conectadas a la región Fc por una región bisagra muy flexible que permite que cada Fab se fije a su diana antigénica mientras que la región Fc, mediadora de las propiedades efectoras del anticuerpo, permanece accesible para las moléculas efectoras tales como los receptores Fc γ R y el C1q. La región Fc, constituida por los 2 dominios globulares CH2 y CH3, está glicosilada a nivel del dominio CH2 con la presencia, en cada una de las 2 cadenas, de un N-glicano biantenado de tipo lactosamínico, unido a la Asn 297.

20 De manera preferida, la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descrito en la presente memoria es de tipo $\gamma 1$, ya que un anticuerpo de este tipo muestra una capacidad para generar una actividad ADCC en el mayor número de individuos (humanos). A este respecto, conviene cualquier alotipo, por ejemplo G1m(3), G1m(1, 2, 17), G1m(11, 17) o G1m(1, 3). De manera preferida, el alotipo es G1m(1, 17).

25 En un aspecto particular, la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo descrito en la presente memoria es de tipo $\gamma 1$, y está codificada por la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 23, estando la región constante de cada una de sus cadenas ligeras codificada por la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 21. Así, un anticuerpo de este tipo posee una región variable murina y una región constante humana, con unas cadenas pesadas de tipo $\gamma 1$. Este anticuerpo pertenece por lo tanto a la sub-clase de las IgG1.

30 El anticuerpo según la invención posee dos cadenas ligeras de las cuales el dominio variable está codificado por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 25 y la región constante humana está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 21, y dos cadenas pesadas de las cuales el dominio variable está codificado por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7 y la región constante está codificada por la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 23.

35 Cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo según la invención está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ. ID NO: 27, y cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19.

40 La secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 27 que codifica para cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo se obtiene por fusión de la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 25 que codifica para el dominio variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo y de la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 21 que codifica para la región constante de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo.

45 La secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19 que codifica para cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo se obtiene por fusión de la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7 que codifica para el dominio variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo y de la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 23 que codifica para la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo.

50 Otro anticuerpo descrito en la presente memoria posee dos cadenas ligeras de las cuales el dominio variable está codificado por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5 y la región constante humana está codificada

por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 21, y dos cadenas pesadas de las cuales el dominio variable está codificado por la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7 y la región constante está codificada por la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 23.

5 Cada una de las cadenas ligeras de este anticuerpo está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 13, y cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19. La secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 13 que codifica para cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo se obtiene por fusión de la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5 que codifica para el dominio variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo y de la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 21 que codifica para la región constante de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo.

15 Cuando cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 13, y cuando cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19, la secuencia peptídica de cada una de las cadenas ligeras, deducida de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 13, es la secuencia SEQ ID NO: 14 y la secuencia peptídica de cada una de las cadenas pesadas, deducida de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 19, es la secuencia SEQ ID NO: 20.

20 En el anticuerpo de la invención, cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 27, y cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19, y la secuencia peptídica de cada una de las cadenas ligeras, deducida de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 27, es la secuencia SEQ ID NO: 28 y la secuencia peptídica de cada una de las cadenas pesadas, deducida de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 19, es la secuencia SEQ ID NO: 20.

25 Las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 28 difieren únicamente por el aminoácido presente en posición 106 de cada una de estas dos secuencias. El aminoácido situado en la posición 106 es una lisina (K) en la secuencia SEQ ID NO: 28; se trata de una asparagina (N) en la secuencia SEQ ID NO: 14.

30 La presente descripción se entiende también de los anticuerpos de los cuales cada una de las cadenas ligeras codificadas por una secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana posee al menos 70% de homología o de identidad con la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 13 y cada una de las cadenas pesadas codificadas por una secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana posee al menos 70% de homología o de identidad con la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19, no alterando estas modificaciones ni la especificidad del anticuerpo ni sus actividades efectoras, como la actividad ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity).

35 De manera particularmente ventajosa, el anticuerpo de la invención es producido por una línea celular de hibridoma de rata. La línea productora del anticuerpo según la invención es una característica importante ya que confiere al anticuerpo algunas de sus propiedades particulares. En efecto, el medio de expresión de los anticuerpos es el origen de las modificaciones post-traduccionales, en particular de las modificaciones de la glicosilación, que pueden variar de una línea celular a otra, y conferir así unas propiedades funcionales diferentes a unos anticuerpos que tienen no obstante unas estructuras primarias idénticas.

40 En un modo de realización preferido, el anticuerpo se produce en el hibridoma de rata YB2/0 (célula YB2/3HL.P2.GII.16Ag.20, depositada en la American Type Culture Collection bajo el número ATCC CRL-1662). Esta línea se eligió debido a su capacidad para producir unos anticuerpos que presentan una actividad ADCC mejorada con respecto a unos anticuerpos de igual estructura primaria producidos por ejemplo en CHO.

45 Un anticuerpo descrito en la presente memoria es el anticuerpo EMAB6 producido por el clon R509 depositado el 8 de noviembre de 2004 bajo el número de registro CNCM I-3314 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15). Cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo EMAB6 está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 13, y cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19. Este anticuerpo quimérico entra en competición con el anticuerpo murino CAT-13.6E12 para la fijación del CD20 y posee una actividad citotóxica muy superior a la del Rituxan®, que puede ser atribuida en parte a la glicosilación particular del N-glicano de la cadena pesada de estos anticuerpos (véase el ejemplo 4). En efecto, el clon R509 tiene como particularidad producir una composición de anticuerpos EMAB6 que poseen una relación tasa de fucosa /tasa de galactosa inferior a 0,6, para la cual se ha demostrado en la solicitud de patente FR 03 12229 que es óptima para conferir una fuerte actividad ADCC a los anticuerpos. Este anticuerpo es por lo tanto particularmente interesante como herramienta terapéutica para el tratamiento de patologías cuyas células a tener como diana expresan el CD20.

60 En un modo de realización particular, un anticuerpo preferido según la invención es el anticuerpo EMAB603 producido por el clon R603 depositado el 29 de noviembre de 2005 bajo el número de registro CNCM I-3529 en la

Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15). Cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo EMAB603 está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 27, y cada una de las cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19. Este anticuerpo quimérico entra en competición con el anticuerpo murino CAT-13.6E12 para la fijación del CD20 y posee una actividad citotóxica muy superior a la del Rituxan®, que puede ser atribuida en parte a la glicosilación particular del N-glicano de la cadena pesada de estos anticuerpos (véase el ejemplo 3). En efecto, el clon R603 tiene por particularidad producir una composición de anticuerpos EMAB603 que poseen una relación tasa de fucosa/tasa de galactosa inferior a 0,6 (véase el ejemplo 4), para la cual se ha demostrado en la solicitud de patente FR 03 12229 que era óptima para conferir una fuerte actividad ADCC a los anticuerpos. Este anticuerpo es por lo tanto particularmente interesante como herramienta terapéutica para el tratamiento de patologías cuyas células a tener como diana expresan el CD20.

Otro objeto descrito en la presente memoria se refiere al vector pEF-EMAB6-K de expresión de la cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente memoria, de secuencia SEQ ID NO: 12. Este vector es el vector que permite la expresión de un anticuerpo descrito en la presente memoria cuya cadena ligera está codificada por la secuencia de ácido nucleico SED ID NO: 13, cuya secuencia peptídica deducida es la secuencia SEQ ID NO: 14. Este vector es una molécula de ácido nucleico en la que se han insertado la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5 que codifica para el dominio variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo y la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 21 que codifica para la región constante de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo, con el fin de introducir las y mantenerlas en una célula hospedante. Permite la expresión de estos fragmentos de ácido nucleico extraños en la célula hospedante ya que posee unas secuencias indispensables (promotor, secuencia de poliadenilación, gen de selección) para esta expresión. Dichos vectores son bien conocidos por el experto en la materia, y pueden ser un adenovirus, un retrovirus, un plásmido o un bacteriófago, no siendo esta lista limitativa. Además, cualquier célula de mamífero puede ser utilizada como célula hospedante, es decir como célula que expresa el anticuerpo descrito en la presente memoria, por ejemplo, YB2/0, CHO, CHO dhfr- (por ejemplo, CHO DX B11, CHO DG44), CHO Lec3, SP2/0, NS0, 293, BHK o COS.

Otro objeto descrito en la presente memoria se refiere al vector pEF-EMAB6-H de expresión de la cadena pesada de un anticuerpo según la invención, de secuencia SEQ ID NO: 18. Este vector es el vector que permite la expresión de un anticuerpo según la invención cuya cadena pesada está codificada por la secuencia de ácido nucleico SED ID NO: 19, cuya secuencia peptídica deducida es la secuencia SEQ ID NO: 20. Este vector es una molécula de ácido nucleico en la que se han insertado la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7 que codifica para el dominio variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo y la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 23 que codifica para la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo, con el fin de introducir las y mantenerlas en una célula hospedante. Permite la expresión de estos fragmentos de ácido nucleico extraños en la célula hospedante ya que posee unas secuencias indispensables (promotor, secuencia de poliadenilación, gen de selección) para esta expresión. Tal como se ha indicado anteriormente, el vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, un adenovirus, un retrovirus o un bacteriófago, y la célula hospedante puede ser cualquier célula de mamífero, por ejemplo, YB2/0, CHO, CHO dhfr- (CHO DX B11, CHO DG44), CHO Lec3, SP2/0, NS0, 293, BHK o COS.

Un anticuerpo producido por coexpresión de los vectores pEF-EMAB6-K y pEF-EMAB6-H en la célula YB2/0 está ilustrado por el anticuerpo anti-CD20 EMAB6, producido por el clon R509 (depositado bajo el número de registro CNCM I-3314 en la CNCM). Este anticuerpo induce una citotoxicidad superior a la inducida por Rituxan® al mismo tiempo en las células de pacientes que padecen LLC-B (en los que el antígeno CD20 está más débilmente expresado) y en unas células Raji, utilizadas como modelo y que expresan el CD20 con una densidad más importante con respecto a las células de pacientes que padecen LLC-B. Además, el anticuerpo EMAB6 induce una secreción de IL-2 (interleucina 2) por las células Jurkat-CD16 mucho más fuerte que el anticuerpo Rituxan®. El anticuerpo EMAB6, que puede ser producido por cultivo del clon R509 en un medio de cultivo y en condiciones que permiten la expresión de los vectores descritos anteriormente, es por lo tanto una herramienta de las más interesantes susceptibles de hacer progresar la terapia y el diagnóstico de las patologías que implican el CD20, y más particularmente la LLC-B, así como la investigación en este campo.

Un objeto particular de la invención es una línea celular estable que expresa un anticuerpo según la invención. De manera ventajosa, la línea celular estable que expresa un anticuerpo según la invención se selecciona de entre el grupo que consiste en: SP2/0, YB2/0, IR983F, un mieloma humano como Namalwa o cualquier otra célula de origen humano como PERC6, las líneas CHO, en particular CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr- (CHO DX B11, CHO DG44), u otras líneas seleccionadas de entre Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NS0, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.

De manera preferida, la línea utilizada es el hibridoma de rata YB2/0. Esta línea se ha seleccionado debido a su capacidad para producir unos anticuerpos que presentan una actividad ADCC mejorada con respecto a unos anticuerpos de igual estructura primaria producidos por ejemplo en CHO.

En un aspecto particular descrito en la presente memoria, la línea celular estable que expresa un anticuerpo descrito en la presente memoria, y más particularmente seleccionada de entre el grupo descrito anteriormente, ha integrado los dos vectores de expresión pEF-EMAB6-K y pEF-EMAB6-H, tales como los descritos anteriormente.

5 Un aspecto particular descrito en la presente memoria se refiere al clon R509 depositado bajo el número de registro CNCM I-3314 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

Un aspecto particular de la invención se refiere al clon R603 depositado bajo el número de registro CNCM I-3529 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

10 Otro objeto descrito en la presente memoria se refiere a un fragmento de ADN de secuencia SEQ ID NO: 19 que codifica para la cadena pesada de un anticuerpo según la invención. La secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19 codifica para cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo. Se obtiene por fusión de la secuencia del ácido nucleico murina SEQ ID NO: 7 que codifica para el dominio variable de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo y de la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 23 que codifica para la región constante de cada una de las cadenas pesadas del anticuerpo.

20 Otro objeto particular descrito en la presente memoria se refiere a un fragmento de ADN de secuencia SEQ ID NO: 13 que codifica para la cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente memoria. La secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 13 codifica para cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo. Se obtiene por fusión de la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 5 que codifica para el dominio variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo y de la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 21 que codifica para la región constante de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo.

25 Otro objeto particular descrito en la presente memoria se refiere a un fragmento de ADN de secuencia SEQ ID NO: 27 que codifica para la cadena ligera de un anticuerpo según la invención. La secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 27 codifica para cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo. Se obtiene por fusión de la secuencia de ácido nucleico murina SEQ ID NO: 25 que codifica para el dominio variable de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo y de la secuencia de ácido nucleico humana SEQ ID NO: 21 que codifica para la región constante de cada una de las cadenas ligeras del anticuerpo.

35 Un objeto particular de la invención se refiere a la utilización del anticuerpo según la invención para activar *in vitro* los receptores FcγRIIIA de células inmunitarias efectoras. En efecto, el anticuerpo de la invención y los anticuerpos descritos en la presente memoria tienen la particularidad y la ventaja de ser citotóxicos. Por esta razón, presentan la capacidad de activar por su región Fc el receptor FcγRIIIA. Esto representa un interés considerable, ya que este receptor está expresado en la superficie de las células denominadas "células efectoras": la unión de la región Fc del anticuerpo a su receptor portado por la célula efectora provoca la activación del FcγRIIIA y la destrucción de las células dianas. Las células efectoras son, por ejemplo, unas células NK (Natural Killer), unos macrófagos, unos neutrófilos, los linfocitos CD8, los linfocitos Tγδ, las células NKT, los eosinófilos, los basófilos o los mastocitos.

40 En un aspecto particular, el anticuerpo de la invención se utiliza como medicamento. Ventajosamente, dicho medicamento está destinado a tratar las enfermedades cuyas células dianas son unas células que expresan el CD20, como los linfomas malignos de células B.

45 En un aspecto ventajoso, el anticuerpo según la invención se utiliza para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia o de un linfoma.

50 Un objeto particular de la invención es la utilización del anticuerpo según la invención, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una patología seleccionada de entre las leucemias agudas linfoblásticas B, los linfomas linfoblásticos B, los linfomas de linfocitos B maduros, entre los cuales, la leucemia linfoide crónica de tipo B (LLC-B), el linfoma linfocítico de pequeños linfocitos B, la leucemia prolinfocitaria B, el linfoma linfoplasmocitario, el linfoma de células del manto, el linfoma folicular, el linfoma de la zona marginal de tipo MALT, el linfoma ganglionario de la zona marginal con o sin célula B monocitoide, el linfoma esplénico de la zona marginal (con o sin linfocito vellosa), la leucemia de tricoleucocitos, el linfoma difuso de grandes células B, el linfoma de Burkitt así como cualquier patología desinmunitaria que implica unas células de la línea linfoide B entre las cuales, las enfermedades auto-inmunes.

60 Otro objeto de la invención es la utilización del anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia linfoide.

Otro objeto de la invención es la utilización del anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la leucemia linfoide crónica de tipo B (LLC-B). Además, el anticuerpo según la invención está particularmente adaptado para tratar unas patologías para las cuales el CD20 está más débilmente expresado en los linfocitos B, y de manera preferida la LLC-B (Leucemia Linfoide Crónica de tipo B). A este respecto, el anticuerpo según la invención se puede utilizar en combinación con uno o varios anticuerpos distintos, por ejemplo, monoclonales, dirigidos contra uno o varios antígenos distintos expresados en las células linfoides, como por

ejemplo los antígenos HLA-DR, CD19, CD23, CD22, CD80, CD32 y CD52, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia o de un linfoma. Así, el anticuerpo humanizado Campath-1H® (alantuzumab, MabCampathR®) que tiene como diana una molécula abundantemente expresada en las células linfoides, el antígeno CD52, y permite inducir una lisis celular movilizando los mecanismos efectores del hospedante (fijación del complemento, citotoxicidad dependiente de los anticuerpos) se utiliza en el tratamiento de la LLC (Moreton P, Hillmen P 2003 Semin. Oncol., 30(4):493-501; Rawstron AC *et al.* 2004 Blood, 103(6):2027-2031; Robak T 2004 Leuk. Linfoma, 45(2):205-219; Stanglmaier M *et al.* 2004 Ann Hematol., 83(10):634-645). Unos ensayos clínicos están también en curso para la evaluación de anticuerpos o de inmunotoxinas que tienen como diana los antígenos HLA-DR, CD22, CD23, CD80 en pacientes que padecen LLC (Mavromatis BH, Cheson BD 2004 Blood Rev. 18 (2): 137-148; Mavromatis B, Cheson BD 2003 J Clin. Oncol. 21(9):1874-1881, Coleman M *et al.* 2003 Clin. Cancer Res. 9:3991S-3994S; Salvatore G *et al.* 2002 Clin. Cancer Res. 8:995-1002).

En otro modo de realización, el anticuerpo según la invención se puede utilizar en asociación con unas células que expresan FcγR tales como las células NK, las células NKT (Natural Killers T), los linfocitos Tγδ, los macrófagos, los monocitos o las células dendríticas, es decir en asociación con una terapia celular (Peller S, Kaufman S Blood 1991, 78:1569, Platsoucas CD *et al.* J Immunol 1982, 129:2305; Kimby E *et al.* 1989 Leukemia 3 (7):501-504; Soorskaar D *et al.* 1988 Int Arch Allergy Appl Immunol 87(2)-159-164; Ziegler HW *et al.* 1981 Int J Cancer 27(3)-321-327; Chaperot L *et al.* 2000 Leukemia 14 (9):1667-77, Vuillier F, Dighiero G 2003 Bull Cancer. 90(8-9):744-50).

Por otro lado, el anticuerpo según la invención permite de manera ventajosa reducir las dosis administradas a los pacientes: ventajosamente, la dosis del anticuerpo administrada al paciente es 2 veces, 5 veces, o también 10 veces, 25 veces, 50 veces o de manera particularmente ventajosa 100 veces menos elevada que una dosis de Rituxan®.

De manera ventajosa, la dosis del anticuerpo administrada al paciente es entre 2 y 5 veces, entre 5 y 10 veces, entre 5 y 25 veces, entre 5 y 50 veces o también entre 5 y 100 veces menos elevada que una dosis de Rituxan®. Así, el anticuerpo según la invención, por ejemplo, el anticuerpo EMAB6, se puede administrar ventajosamente a una dosis inferior a 187,5 mg/m², a 75 mg/m², a 37,5 mg/m², 15 mg/m², 7,5 mg/m² o de manera particularmente ventajosa inferior a 3,75 mg/m². La dosis administrada está comprendida ventajosamente entre 187,5 mg/m² y 75 mg/m², o entre 75 mg/m² y 37,5 mg/m², entre 75 mg/m² y 15 mg/m², entre 75 mg/m² y 7,5 mg/m² o también entre 75 mg/m² y 3,75 mg/m².

La presente descripción se entiende también de un método de tratamiento de las enfermedades cuyas células dianas son unas células que expresan el CD20, como los linfomas malignos de células B, que comprende la administración a un paciente, a una dosis eficaz, de una composición que comprende un anticuerpo según la invención. Más particularmente, el método de tratamiento está particularmente adaptado al tratamiento de una leucemia o de un linfoma. De manera aún más específica, se trata de un método de tratamiento de una patología seleccionada de entre las leucemias agudas linfoblásticas B, los linfomas linfoblásticos B, los linfomas de células B maduras, entre los cuales, la leucemia linfoide crónica de tipo B (LLC-B), el linfoma linfocítico de pequeños linfocitos B, la leucemia prolinfocitaria B, el linfoma linfoplasmocitario, el linfoma de células del manto, el linfoma folicular, el linfoma de la zona marginal de tipo MALT, el linfoma ganglionario de la zona marginal con o sin célula B monocitoide, el linfoma esplénico de la zona marginal (con o sin linfocito veloso), la leucemia de tricolecocitos, el linfoma difuso de grandes células B, el linfoma de Burkitt así como cualquier patología desinmunitaria que implica unas células la línea linfoide B de las cuales las enfermedades auto-inmunes, que comprende la administración, a una dosis eficaz, de un anticuerpo o de una composición que comprende el anticuerpo según la invención.

Un objeto particular de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad crónica del injerto contra el hospedante con el fin de tratar las manifestaciones que implican los linfocitos B del receptor. Finalmente, un último objeto de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del rechazo de injertos de órganos, en particular de riñón.

En efecto, unos estudios recientes (Ratanatharathorn *et al.* 2003 Biol Blood Marrow Transplant. Agosto de 2003; 9(8):505-11; Becker *et al.* 2004 Am J Transplant. Junio de 2004; 4(6):996-1001) han mostrado el interés de anticuerpos anti-CD20 en el tratamiento de estas patologías.

Otros aspectos y ventajas de la invención se describirán en los ejemplos siguientes, que deben ser considerados como ilustrativos.

60 Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del vector CKHu utilizado para la quimerización de la cadena ligera kappa de los anticuerpos EMAB6 y EMAB603.

65 Figura 2: Representación esquemática del vector de expresión de cadena ligera pEF-EMABG-K utilizado para la producción del anticuerpo EMAB6.

Figura 3: Representación esquemática del vector GIHu utilizado para la quimerización de la cadena pesada de los anticuerpos EMAB6 y EMAB603.

5 Figura 4: Representación esquemática del vector de expresión de cadena pesada pEF-EMAB6-H utilizado para la producción del anticuerpo EMAB6.

Figura 5: Competición por el anticuerpo quimérico EMAB6 para la fijación del anticuerpo murino de origen CAT-13.6E12 (CAT13) al CD20 expresado en las células Raji.

10 Figura 6: Actividad citotóxica complemento dependiente de los anticuerpos anti-CD20 sobre las células Raji. (A) Rituxan® triángulo vacío, EMAB6 rombo lleno. La lisis de las células se estima por medición de la LDH intracelular liberada en el sobrenadante. Resultados expresados en porcentaje de lisis, siendo el 100% el valor obtenido con Rituxan® (a 5000 ng/ml de anticuerpos anti-CD20). Media de 5 ensayos. (B) Comparación de las actividades citotóxicas complemento dependiente de los anticuerpos EMAB6 (rombo lleno) y EMAB603 (rombo vacío).

15 Figura 7: ADCC inducida por los anticuerpos anti-CD20 frente a las células Raji. (A) Rituxan® triángulo vacío, EMAB6 rombo lleno. La lisis de las células se estima por medición de la LDH intracelular liberada en el sobrenadante. Resultados expresados en porcentaje de lisis, siendo el 100% el valor obtenido con Rituxan® (a 250 ng/ml de anticuerpos anti-CD20). Media de 3 ensayos. (B) Comparación del ADCC inducida por los anticuerpos EMAB6 (rombo lleno) y EMAB603 (rombo vacío).

20 Figura 8: ADCC inducida por los anticuerpos anti-CD20 en presencia de linfocitos B de pacientes que presentan una LLC-B.

25 Rituxan® triángulo vacío, EMAB6 rombo lleno. Relación E/T = 15. La lisis de las células se estima mediante medición de la calceína liberada en el sobrenadante. Resultados expresados en porcentaje, siendo el 100% el valor obtenido con Rituxan® (a 500 ng/ml de anticuerpos anti-CD20). Media de 4 experimentos que corresponden a 4 pacientes diferentes.

30 Figura 9: Activación del CD16 (FcγRIIIA) inducida por los anticuerpos anti-CD20 en presencia de células Raji. (A) Rituxan® triángulo vacío, EMAB6 rombo lleno. Resultados expresados en porcentaje de IL-2, siendo ésta medida en los sobrenadantes mediante ELISA; siendo el 100% el valor obtenido con Rituxan® (a 2500 ng/ml de anti-CD20). Media de 4 ensayos. (B) Comparación entre la activación del CD16 (FcγRIIIA) inducida por los anticuerpos EMAB6 (rombo lleno) y EMAB603 (rombo vacío).

35 Figura 10: Activación del CD16 (FcγRIIIA) inducida por los anti-CD20 en presencia de linfocitos B de pacientes que presentan una LLC-B. Rituxan® triángulo vacío, EMAB6 rombo lleno. Resultados expresados en porcentaje de IL-2, siendo ésta medida en los sobrenadantes mediante ELISA; siendo el 100% el valor obtenido con Rituxan® (a 2500 ng/ml de anticuerpos anti-CD20). Media de 12 pacientes.

Figura 11: Producción de IL-2 inducida por el anticuerpo murino CAT-13.6E12 en presencia de las células Jurkat-CD16 (FcγRIIIA).

45 Figura 12: Representación esquemática del vector de expresión de las cadenas pesada y ligera pRSV-HL-EMAB603 utilizado para la producción del anticuerpo EMAB603.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: Construcción de los vectores de expresión de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 EMAB6 y EMAB603

A. Determinación de la secuencia de las regiones variables del anticuerpo murino CAT-13.6E12

55 Se aisló el ARN total del hibridoma murino CAT-13.6E12 (proveedor: DSMZ, ref. ACC 474) que produce una inmunoglobulina de tipo IgG2a,κ (kit RNAeasy, Qiagen ref. 74104). Después de la transcripción inversa, los dominios variables de las cadenas ligeras (VK) y pesadas (VH) del anticuerpo CAT-13.6E12 se amplificaron mediante la técnica de 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (kit GeneRacer, Invitrogen ref. L1500-01). Los cebadores utilizados para estas dos etapas son los siguientes:

60 1. cebadores de transcripción inversa

a. Cebador antisentido específico Kappa murino (SEQ ID NO: 1)

5' - ACT GCC ATC AAT CTT CCA CTT GAC -3'

65

b. Cebador antisentido específico G2a murino (SEQ ID NO: 2)

5'- CTG AGG GTG TAG AGG TCA GAC TG -3'

2. cebadores de PCR 5'RACE

5

a. Cebador antisentido específico Kappa murino (SEQ ID NO: 3)

5'- TTGTTCAAGAAGCACACGACTGAGGCAC -3'

10

b. Cebador antisentido específico G2a murino (SEQ ID NO: 4)

5'- GAGTTCCAGGTCAAGGTCACTGGCTCAG -3'

15

Los productos de PCR VH y Vκ así obtenidos se clonaron en el vector pCR4Blunt-TOPO (Zéro blunt TOPO PCR cloning kit, Invitrogen, ref. K2875-20) y después se secuenciaron.

20

La secuencia nucleotídica de la región VA: del anticuerpo murino CAT-13.6E12 está indicada bajo la secuencia SEQ ID NO: 5 y la secuencia peptídica deducida es la secuencia SEQ ID NO: 6. El gen Vκ pertenece a la familia Vκ4 [Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", NIH Publication, 91-3242 (1991)].

20

La secuencia nucleotídica de la región VH de CAT-13.6E12 es la secuencia SEQ ID NO: 7 y la secuencia peptídica deducida es la secuencia SEQ ID NO: 8. El gen VH pertenece a la familia VH1 [Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", NIH Publication, 91-3242 (1991)].

25

B. Construcción de los vectores de expresión de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos quiméricos EMAB6 y EMAB603

1. Vector de cadena ligera Kappa

30

1.1 Vector de cadena ligera del anticuerpo EMAB6

La secuencia Vκ clonada en el vector de secuenciación pCR4Blunt-TOPO se amplificó con la ayuda de los cebadores de clonación siguientes:

35

a) cebador sentido Vκ (SEQ ID NO: 9)

5'-CTCAGTACTAGT**GCCGCC**ACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG -3'

40

La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción Spe I, la secuencia en negrita corresponde a una secuencia de Kozak consenso, el ATG iniciador está en cursiva.

b) cebador antisentido VA: (SEQ ID NO: 10)

45

5'-**TGAAGACA**CTTGGTGCAGCCACAGTCCGGTTTATTTCCAGCCTGGT-3'

Este cebador realiza la unión de las secuencias Vκ murina (en cursiva) y región constante (Cκ) humana (en negrita). La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción Dra III.

50

El producto de PCR Vκ; así obtenido contiene la secuencia que codifica el péptido señal natural del anticuerpo murino CAT-13.6E12. Esta PCR Vκ se clonó después entre los sitios Spe I y Dra III del vector de quimerización de cadena ligera (Fig. 1) que corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 11, en 5' de la región constante Cκ humana, cuya secuencia nucleica es la secuencia SEQ ID NO: 21 y la secuencia peptídica deducida es la secuencia SEQ ID NO 22. La secuencia Cκ humana de este vector de quimerización se modificó previamente por mutagénesis silenciosa con el fin de crear un sitio de restricción Dra III para permitir la clonación de las secuencias Vκ murinas. Este vector de quimerización contiene un promotor RSV y una secuencia de poliadenilación bGH (bovine Growth Hormone) así como el gen de selección dhfr (dihidrofolato reductasa).

60

La secuencia de la cadena ligera del anticuerpo quimérico EMAB6 codificada por este vector está representada en SEQ ID NO: 13 para la secuencia nucleotídica y corresponde a la secuencia peptídica deducida SEQ ID NO: 14.

60

1.2 Vector de cadena ligera del anticuerpo EMAB603

El protocolo es el mismo que para el vector de cadena ligera del anticuerpo EMAB6 (véase el ejemplo 1, B-I.1), salvo el cebador antisentido Vκ que es:

65

b') cebador antisentido VK (SEQ ID NO: 29)

5' - **TGAAGACACTTGGTGCAGCCACAGT**CCGTT*TTTATTTCCAGCCTGGT* -3'

5 Este cebador realiza la unión de las secuencias VK murina (en cursiva) y región constante (CK) humana (en negrita). La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción Dra III.

10 Este cebador introduce también la mutación AAC → AAA (nucleótido enmarcado en la secuencia del cebador antisentido SEQ ID NO: 29) que corresponde a la mutación N106K (véase la secuencia nucleotídica y la secuencia peptídica deducida SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26) con respecto a la secuencia natural Vk de CAT-13.6E12 (véase SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6).

La secuencia de la cadena ligera del anticuerpo quimérico EMAB603 codificada por este vector está representada en SEQ ID NO: 27 para la secuencia nucleotídica y corresponde a la secuencia peptídica deducida SEQ ID NO: 28.

15 2. Vector cadena pesada

Un método similar se aplicó para la quimerización de la cadena pesada de los anticuerpos EMAB6 y EMAB603.

20 La secuencia VH clonada en el vector pCR4Blunt-TOPO se amplificó en primer lugar con la ayuda de los cebadores de clonación siguientes:

a) cebador sentido VH (SEQ ID NO:15)

25 5'-CTCAGTACTAGT**GCCGCCACCA**TGGGATTCAGCAGGATCTTTCTC-3'

La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción Spe I, la secuencia en negrita corresponde a una secuencia de Kozak consenso, el ATG iniciador está en cursiva.

30 b) cebador antisentido VH (SEQ ID NO:16)

5'-**GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGC**TGAGGAGACGGT**ACTGAGGTTCC**-3'

35 Este cebador realiza la unión de las secuencias VH murina (en cursiva) y región constante G1 humana (en negrita). La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción Apa I.

40 El fragmento VH amplificado contiene la secuencia que codifica el péptido señal natural del anticuerpo murino CAT-13.6E12. Esta PCR VH se clonó después entre los sitios Spe I y Apa I del vector de quimerización de cadena pesada (Fig. 3) que corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 17, en 5' de la región constante γ 1 humana cuya secuencia nucleica es la secuencia SEQ ID NO: 23 y la secuencia peptídica deducida es la secuencia SEQ ID NO: 24. Este vector de quimerización contiene un promotor RSV y una secuencia de poliadenilación bGH (bovine Growth Hormone) así como el gen de selección neo.

45 La secuencia de la cadena pesada de los anticuerpos quiméricos EMAB6 y EMAB603 codificada por este vector se presenta en la SEQ ID NO: 19 para la secuencia nucleotídica y en la secuencia SEQ ID NO: 20 para la secuencia peptídica deducida.

3. Vectores de expresión finales

50 3.1 Vectores de expresión del anticuerpo EMAB6

Para la expresión del anticuerpo EMAB6, el promotor RSV del vector de quimerización de la cadena ligera kappa (véase el ejemplo. 1, B-1.1) ha sido sustituido por el promotor EF-1 alfa humano. El vector final de expresión de cadena ligera pEF-EMAB6-K se presenta en la Figura 2 y corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 12.

55 La secuencia de la cadena ligera del anticuerpo quimérico EMAB6 codificada por este vector está representada en SEQ ID NO: 13 para la secuencia nucleotídica y corresponde a la secuencia peptídica deducida SEQ ID NO: 14.

60 Para la expresión del anticuerpo EMAB6, el promotor RSV del vector de quimerización de la cadena pesada (véase el ejemplo 1, B-2) ha sido sustituido por el promotor EF-1 alfa humano. El vector final de expresión de cadena pesada pEF-EMAB6-H así obtenido se presenta en la Figura 4 y corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 18.

3.2 Vector de expresión del anticuerpo EMAB603

65 Un vector de expresión único que contiene las dos unidades de transcripción de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo anti-CD20 EMAB-603 se ha construido a partir de los dos vectores de quimerización de la cadena

ligera y de la cadena pesada (véanse respectivamente el ejemplo 1, B-1.2 y el ejemplo 1-B2) mediante subclonación, en el sitio Xho I del vector de cadena pesada, de un fragmento Bgl II-Pvu II del vector de cadena ligera que contiene la unidad de transcripción de cadena ligera y el gen dhfr. Este vector de expresión pRSV-HL-EMAB-603 presenta dos genes de selección neo (neo-fosfotransferasa II) y dhfr (dihidrofolato reductasa) así como dos unidades de transcripción de cadena pesada y de cadena ligera bajo el control de un promotor RSV (Figura 12).

Ejemplo 2: Creación de líneas celulares derivadas de la línea YB2/0 productoras del anticuerpo quimérico anti-CD20 EMAB6 y del anticuerpo quimérico anti-CD20 EMAB603

Se ha cultivado la línea de rata YB2/0 (ATCC # CRL-1662) en medio EMS (Invitrogen, ref. 041-95181M) que contiene 5% de suero de ternera fetal (JRH Biosciences, ref. 12107). Para la transfección, se han electroporado 5 millones de células (electroporador Biorad, modelo 1652077) en medio Optimix (Equibio, ref. EKITE 1) con 25 µg de vector de cadena ligera, pEF-EMAB6-K (Fig. 2), linealizado por Aat II, y 27 µg de vector de cadena pesada, pEF-EMAB6-H (Fig. 4), linealizado por Sca I para la expresión del anticuerpo EMAB6, o con el vector pRSV-HL-EMAB-603 para la expresión del anticuerpo EMAB603. Las condiciones de electroporación aplicadas eran de 230 voltios y 960 microfaradios para una cubeta de 0,5 ml. Cada cubeta de electroporación se ha repartido después sobre 5 placas P96 con una densidad de 5000 células/pocillo.

La puesta en medio selectivo RPMI (Invitrogen, ref. 21875-034) que contiene 5% de suero de diálisis (Invitrogen, ref. 10603-017), 500 µg/ml de G418 (Invitrogen, ref. 10131-027) y 25 nM de metotrexato (Sigma, ref. M8407), se ha realizado 3 días después de la transfección.

Los sobrenadantes de los pocillos de transfección resistentes se han cribado para la presencia de inmunoglobulina (Ig) quimérica mediante dosificación ELISA específica de las secuencias Ig humanas.

Los 10 transfectantes que producen más anticuerpos se han amplificado en placas P24 y su sobrenadante redosificado mediante ELISA con el fin de estimar su productividad y seleccionar los 3 mejores productores para la clonación por dilución límite (40 células/placa).

Al final de la clonación, el clon R509.6A4 (R509-33903/046-6H1(1)6A4, productividad: 17 µg/10⁶ células), denominado a continuación «R509», así como el clon R603 se han seleccionado respectivamente para la producción del anticuerpo quimérico EMAB6 y la del anticuerpo EMAB603 y adaptados progresivamente al medio de producción CD Hybridoma (Invitrogen, ref. 11279-023).

La producción de los anticuerpos quiméricos EMAB6 y EMAB603 se ha realizado por expansión del cultivo adaptado en medio CD Hybridoma, obtenido por dilución a 3x10⁵ células/ml en frascos de 75 cm² y 175 cm², y después por dilución a 4,5x10⁵ células/ml en frasco de tipo roller. Después de haber alcanzado el volumen máximo (1 l), el cultivo se prosiguió hasta que la viabilidad celular sea únicamente del 20%. Después de la producción, los anticuerpos quiméricos EMAB6 y EMAB603 se purificaron por cromatografía de afinidad sobre proteína A (pureza estimada por HPLC < 95%) y controlados por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Ejemplo 3: Caracterización de la actividad funcional de los anticuerpos quiméricos EMAB6 y EMAB603

A. Especificidad

La especificidad del reconocimiento antigénico del anticuerpo quimérico EMAB6 se ha evaluado mediante un estudio de competición con el anticuerpo murino de origen CAT-13.6E12 para la fijación al antígeno CD20 expresado por las células Raji.

Para ello, se ha incubado el anticuerpo EMAB6 (10 µl de 0,5 a 50 µg/ml) a 4°C con una cantidad fija del anticuerpo murino CAT-13.6E12 (10 µl a 5 µg/ml) durante 20 minutos en presencia de células Raji (50 µl a 4x10⁶/ml). Después del lavado, un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a la ficoeritrina (PE) ha sido añadido a las células Raji de manera que se detecte específicamente la fijación del anticuerpo murino CAT-13.6E12. Las MFI obtenidas en presencia de las diferentes concentraciones de EMAB6 son traducidas en porcentaje, correspondiendo el 100% a la fijación a las células de CAT-13.6E12 en ausencia del anticuerpo EMAB6.

Se obtiene así una curva de inhibición de la fijación del anticuerpo CAT-13.6E12 (CAT13) sobre las células Raji en presencia de concentraciones crecientes de EMAB6 (Fig. 5).

Este estudio demuestra que el proceso de quimerización no ha alterado la especificidad del anticuerpo EMAB6 que entra bien en competición con el anticuerpo murino parental CAT-13.6E12 para la fijación del CD20 expresado en la superficie de las células Raji.

La especificidad de reconocimiento antigénico del anticuerpo EMAB603 es comparable con la del anticuerpo EMAB6.

B. Actividad Citotóxica Dependiente del Complemento

La actividad citotóxica dependiente del complemento de los anticuerpos EMAB6 y EMAB603 se estudia con las células Raji en presencia de suero de conejillo como fuente de complemento; el anticuerpo anti-CD20 quimérico Rituxan® está incluido en un ensayo para comparación.

Para este ensayo, las células Raji se ajustan a 6×10^5 células/ml en IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 5% SVF. Los anticuerpos se diluyen en IMDM+0,5% SVF. La mezcla de reacción está compuesta por 50 µl de anticuerpos, 50 µl de suero de conejillo (dilución al 1/10 en IMDM 0,5% SVF del reactivo Cedarlane CL 3441), 50 µl de células dianas y 50 µl de medio IMDM 0,5% SVF. Las concentraciones finales de anticuerpos son de 5000, 1250, 250 y 50 ng/ml. Un control sin anticuerpos está incluido en el ensayo. Después de 1h de incubación a 37°C bajo atmósfera enriquecida con 5% de CO₂, las placas se centrifugan y las tasas de LDH intracelular liberada en el sobrenadante evaluadas mediante un reactivo específico (Cytotoxicity Detection Kit 1 644 793).

El porcentaje de lisis se estima utilizando una gama de calibración obtenida con diferentes diluciones de células dianas lisadas con triton X100 (2%), que corresponden a 100, 50, 25 y 0% de lisis respectivamente.

Los resultados presentados en la Figura 6 (A) indican que los anticuerpos EMAB6 y Rituxan® inducen ambos una lisis de las células Raji dependiente del complemento. Sin embargo, la actividad complemento del anticuerpo EMAB6 aparece ligeramente inferior a la de Rituxan®. Esta diferencia es aún más importante a las bajas concentraciones de anticuerpos utilizadas en este ensayo. Así, para las concentraciones de 50 y 250 ng/ml, la actividad del anticuerpo EMAB6 es del orden de 45% de la de Rituxan®. Esta diferencia disminuye cuando aumenta la concentración de anticuerpos, representando el porcentaje de la actividad citotóxica dependiente del complemento del anticuerpo EMAB6 el 92% de la de Rituxan® a la concentración más fuerte ensayada, es decir 5000 ng/ml.

Esta actividad citotóxica dependiente del complemento del anticuerpo EMAB6 más baja que la de Rituxan® puede ser considerada como una ventaja ya que limita la toxicidad potencial del EMAB6 *in vivo* comparado con Rituxan® unida a la activación de la vía clásica del complemento que conduce a la producción de diferentes moléculas que tienen unas actividades inflamatorias, alérgicas y vasculares indeseables.

La actividad complemento del anticuerpo EMAB603 aparece en la Figura 6 (B).

C. Actividad ADCC

La citotoxicidad del anticuerpo quimérico EMAB6 se ha evaluado en presencia de células Raji o bien de linfocitos B de pacientes que padecen LLC. El anticuerpo anti-CD20 quimérico Rituxan® está incluido en los ensayos para comparación.

La técnica de medición de ADCC en marcado calceína utilizada es la siguiente:

Se aíslan las células NK a partir de PBMC utilizando la técnica de separación sobre bolas magnéticas (MACS) de Myltenyi. Las células NK se lavan y se resuspenden en IMDM+5% SVF (45×10^5 células/ml). Las células efectoras y las células dianas se utilizan en una relación de 15/1. Las células Raji o PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) de pacientes que presentan LLC-B obtenidas después de Ficoll (>95% de linfocitos B) son previamente marcadas con calceína (1 ml de células a 3×10^6 células/ml en IMDM +5% SVF + 20 µl calceína (20 µM) incubación 20 min a 37°C y después lavado en HBSS (Hank's Buffered Saline Solution)) y ajustadas a 3×10^5 células/ml en IMDM 5% SVF. Los anticuerpos son diluidos en IMDM 0,5% SVF (concentración final 500; 50; 5; 0,5; 0,005 y 0,005 ng/ml).

La mezcla de reacción está compuesta por 50 µl de anticuerpos, 50 µl de células efectoras, 50 µl de células dianas y por 50 µl de medio IMDM en placa de microtitulación P96. Se establecen dos controles negativos:

- Lisis sin NK: las células efectoras NK son sustituidas por IMDM + 5% SVF.
- Lisis sin anticuerpos (Ac): los anticuerpos son sustituidos por IMDM + 5% SVF.

Después de 4h de incubación a 37°C bajo atmósfera enriquecida con 5% de CO₂, las placas son centrifugadas y la fluorescencia asociada al sobrenadante medida en un fluorímetro (excitación 485 nm / emisión 535 nm).

El porcentaje de lisis se estima utilizando una gama de calibración obtenida con diferentes diluciones de células dianas lisadas con Triton X100 (2%) que corresponde a 100, 50, 25 y 0% de lisis respectivamente.

Los resultados se calculan en un primer tiempo según la fórmula siguiente:

% de lisis = (% lisis con Anticuerpos y NK) - (% lisis sin Anticuerpos) - (% de lisis sin NK), y después expresados en porcentaje relativo, siendo el 100% el valor obtenido a la concentración más fuerte de Rituxan®.

Los resultados obtenidos para el anticuerpo EMAB6 en las células de la línea Raji, presentados en la Figura 7 (A), muestran que sea cual sea la concentración ensayada, la citotoxicidad inducida por el anticuerpo EMAB6 es superior a la inducida por Rituxan®. Esta diferencia es particularmente importante para las bajas concentraciones de anticuerpos. Así, a la concentración de 0,5 ng/ml, los porcentajes de lisis son de 96 y 4% para EMAB6 y Rituxan® respectivamente. Aumentando 500 veces la dosis (250 ng/ml) la diferencia se puede apreciar todavía ya que los porcentajes respectivos de ADCC son de 164 y 100% para EMAB6 y Rituxan® respectivamente. Cuando se calculan las EC50 (concentración de anticuerpos que corresponde al 50% del E Max, eficacia máxima obtenida a la concentración de anticuerpos más elevada y a la meseta) por estimación gráfica (en ng/ml) y según la hipótesis de que Rituxan® y EMAB6 alcanzan el mismo E Max, la relación EC50 Rituxan®/EC50 EMAB6 en este ensayo es entonces igual a 300.

La citotoxicidad del anticuerpo quimérico EMAB603 se ha evaluado en presencia de células Raji según el mismo procedimiento que para el anticuerpo EMAB6. Su actividad es comparable a la del anticuerpo EM[Alfa]B6 (véase la Figura 7 (B)).

Con los linfocitos de pacientes que presentan una LLC-B, los resultados obtenidos, presentados en la Figura 8, demuestran que - sea cual sea la concentración ensayada, la citotoxicidad inducida por el anticuerpo EMAB6 es superior a la inducida por Rituxan®. Como ya se ha observado con las células Raji, esta diferencia es particularmente importante para las bajas concentraciones de anticuerpos. Una concentración de 0,5 ng/ml de EMAB6 induce el mismo porcentaje de lisis que 500 ng/ml de Rituxan®, es decir una relación de concentraciones de 1000. A la concentración de 5 ng/ml, los porcentajes de lisis son de 269 y 9% para EMAB6 y Rituxan®, respectivamente. A la dosis máxima ensayada (500 ng/ml), la diferencia es todavía muy importante ya que los porcentajes de ADCC son de 350 y 100% para EMAB6 y Rituxan®, respectivamente. Un resultado interesante corresponde a las concentraciones que dan 50% de lisis. La relación EC50 Rituxan®/EC50 EMAB6 en este ensayo se estima en 10000 (estimación gráfica en ng/ml de EC50 según la hipótesis de que Rituxan® y EMAB6 alcanzan el mismo E Max).

En estos ensayos, las actividades citotóxicas de EMAB6 y la de EMAB603 son por lo tanto muy superiores a la de Rituxan®.

D. Activación del CD16 (secreción de IL-2)

La activación CD16 (FcγRIIIA) inducida por el anticuerpo quimérico EMAB6 se ha determinado en presencia de células Raji o bien de linfocitos B de pacientes que presentan una LLC. Este ensayo evalúa la capacidad del anticuerpo para fijarse sobre el receptor CD16 (FcγRIIIA) expresado en las células Jurkat-CD16 y para inducir la secreción de IL-2. El anticuerpo anti-CD20 quimérico Rituxan® está incluido en los ensayos para comparación.

La medición de la activación CD16 se realiza en la línea Jurkat-CD16 en presencia de células Raji o de linfocitos B de pacientes que presentan una LLC de la siguiente manera:

Mezclar en placa de 96 pocillos: 50 µl de una solución de anticuerpos (dilución a 10000, 1000, 100 y 10 ng/ml en IMDM 5% SVF para los linfocitos B de pacientes que presentan una LLC-B y 10000, 2000, 1000, 200, 100, 50 y 25 ng/ml para las células Raji), 50 µl de PMA (Phorbol Myristate Acetate, dilución a 40 ng/ml en IMDM 5% SVF), 50 µl de células Raji o de PBMC de pacientes que presentan una LLC-B obtenidas después de Ficoll (>95% de linfocitos B) diluidas a 6×10^5 /ml en IMDM 5% SVF, y 50 µl de células Jurkat-CD16 (20×10^6 /ml en IMDM 5% SVF). Unos controles sin anticuerpos están incluidos en todos los ensayos. Después de la incubación durante 1 noche a 37°C, las placas son centrifugadas, y la IL-2 contenida en los sobrenadantes es evaluada con el kit comercial (Quantikine de R/D). La lectura de la DO se realiza a 450 nm.

Los resultados son expresados en un primer tiempo en porcentaje de IL-2 en función de la concentración de anticuerpos (de 0 a 2500 ng/ml concentración final), y después en porcentaje relativo, siendo el 100% el valor obtenido con Rituxan® a la concentración más fuerte ensayada.

Los resultados obtenidos con las células de la línea Raji, presentados en la Figura 9 (A), indican que en presencia del del anticuerpo EMAB6 y de Rituxan®, las células Jurkat-CD16 segregan IL-2, lo que indica una activación celular a través de la fijación de la porción Fc de los anticuerpos sobre la CD16. Sin embargo, el anticuerpo EMAB6 posee una actividad inductora mucho más fuerte que el anticuerpo Rituxan®. Así, a la concentración de 6,25 ng/ml los porcentajes de IL-2 son de 112 y 21% para EMAB6 y Rituxan® respectivamente. A 50 ng/ml, la diferencia es todavía importante, siendo los porcentajes de IL-2 de 112 y 65% respectivamente. A las concentraciones más fuertes, esta diferencia disminuye, ya que a 2500 ng/ml, los porcentajes respectivos de IL-2 entre EMAB6 y Rituxan® son de 124 y 100%. La relación EC50 Rituxan®/EC50 EMAB6 en este ensayo se estima en 15 (estimación gráfica en ng/ml de EC50 según la hipótesis de que Rituxan® y EMAB6 alcanzan el mismo E Max).

Estos resultados confirman los resultados de ADCC, ambos dependientes de CD16. Indican que el acoplamiento de CD16 (FcγRIIIA) por la porción Fc del anticuerpo EMAB6 está seguido de una fuerte activación celular que conduce a la inducción de funciones efectoras.

La activación CD16 (FcγRIIIA) inducida por el anticuerpo quimérico EMAB603 en presencia de células Raji es comparable con la inducida por el anticuerpo EMAB6.

5 Con los linfocitos de pacientes que presentan una LLC-B, los resultados obtenidos, presentados en la Figura 10, muestran que, en presencia de los anticuerpos anti-CD20 Rituxan® y EMAB6, las células Jurkat-CD16 segregan IL-2, lo que indica una activación celular a través de la fijación de la porción Fc de los anticuerpos por el CD16. Sin embargo, el anticuerpo EMAB6 posee una capacidad inductora mucho más importante que el anticuerpo Rituxan®. En efecto, La actividad de inducción de secreción de IL-2 de Rituxan® es próxima a la línea de base para las concentraciones de 2,5 y 25 ng/ml, mientras que la del anticuerpo EMAB6 es significativa. Así, a la concentración de 25 ng/ml, los porcentajes de IL-2 son de 132 y 34% para EMAB6 y Rituxan® respectivamente. A la concentración más fuerte (2500 ng/ml), los porcentajes de IL-2 son de 148 y 100% respectivamente. La relación EC50 Rituxan®/EC50 EMAB6 en este ensayo es superior a 100: se estima en 300 (estimación gráfica en ng/ml de EC50 según la hipótesis de que Rituxan® y EMAB6 alcanzan el mismo E Max).

15 En conclusión, el conjunto de los ensayos efectuados en las células Raji demuestra que los anticuerpos EMAB6 y EMAB603, al contrario que Rituxan® son muy citotóxicos e inducen una activación de las células que expresan el CD16 (FcγRIIIA), particularmente a las concentraciones bajas de anticuerpos. Por el contrario, en estas mismas condiciones, la actividad citotóxica dependiente del complemento del anticuerpo EMAB6 disminuye en aproximadamente 50% comparada con la de Rituxan®.

20 Estos resultados están reforzados por los estudios realizados con unas células aisladas a partir de pacientes que presentan una LLC-B que indican que el anticuerpo EMAB6 es mucho más citotóxico que Rituxan® frente a los linfocitos B de pacientes que padecen LLC-B. Las diferencias entre los dos anticuerpos son más marcadas con las células procedentes de pacientes que padecen LLC-B que con las células Raji, lo que demuestra un interés terapéutico importante para EMAB6 comparado con Rituxan® en esta patología.

25 El origen de esta diferencia más importante puede, entre otros, deberse a la expresión antigénica más baja de CD20 sobre los linfocitos B de pacientes que padecen LLC-B con respecto a la de las células Raji.

30 Por analogía con las células Raji, se puede sugerir que la actividad citotóxica dependiente del complemento del anticuerpo EMAB6 frente a los linfocitos de pacientes que padecen LLC-B debe ser inferior a la inducida por Rituxan®, lo que presenta así la ventaja de ser menos tóxica *in vivo* debido a los efectos indeseables relacionados con una fuerte activación de la vía clásica del complemento.

35 Ejemplo 4: Análisis de los glicanos de EMAB6 y EMAB603 por HPCE-LIF

40 La estructura del N-glicano de la cadena pesada de los anticuerpos EMAB6 y EMAB603 se ha analizado por HPCE-LIF.

La estructura del N-glicano de la cadena pesada de Rituxan® se ha analizado también para comparación.

45 Para ello, los anticuerpos monoclonales anti-CD20 han sido desalados en una columna de Sephadex G-25 (HiTrap Desalting, Amersham Biosciences), secados por evaporación y resuspendidos en el tampón de hidrólisis de la PNGasa F (Glyko) en presencia de 50 mM de β-mercaptoetanol. Después de 16h de incubación a 37°C, la fracción proteica se ha precipitado mediante la adición de etanol absoluto y el sobrenadante, que contiene los N-glicanos, se ha secado por evaporación. Los oligosacáridos así obtenidos han sido marcados directamente por un fluorocromo: el APTS (1-amino-piren-3,6,8-trisulfonato), o bien sometidos a la acción de exoglicosidasas específicas antes del marcado por el APTS. Los oligosacáridos así marcados se inyectaron en un capilar N-CHO, separados y cuantificados por electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (HPCE-LIF).

50 La evaluación de la tasa de fucosa se ha realizado o bien por la adición de las formas fucosiladas aisladas, o bien más específicamente después de la acción simultánea de la neuraminidasa, la β-galactosidasa y la N-acetilhexosaminidasa, que permite obtener, en el electroforegrama, 2 picos que corresponden al pentasacárido [GlcNac2-Man3], fucosilado o no:

Tabla 1: análisis de los N-glicanos de los anticuerpos anti-CD20 EMAB603 y Rituxan®

Anti-CD20	% de fucosa	% de galactosa	Fuc/Gal
EMAB603	15	37	0,4
Rituxan®	93	57	1,63

60 La tasa de fucosa, expresada en %, se ha calculado utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Tasa de fucosa} = \frac{[\text{G1cNac2-Man3}] \text{ fucosilado} \times 100}{[\text{G1cNac2-Man3+ fucosilado}] + [\text{G1cNac2-Man3}]}$$

La tasa de galactosa, expresada en %, se ha calculado sumando los porcentajes de las formas oligosacáridicas que contienen galactosa obtenidas después de la acción de la neuraminidasa y de la fucosidasa. La fórmula utilizada es la siguiente:

$$\text{Tasa de galactosa} = (G1 + G1B) + 2x (G2 + G2B)$$

La relación tasa de fucosa/tasa de galactosa se obtiene dividiendo la tasa de fucosa por la tasa de galactosa, siendo las tasas calculadas como se ha descrito anteriormente.

Según este análisis (véase la Tabla 1), aparece que los anticuerpos EMAB6 y EMAB603 están poco fucosilados (% Fucosa inferior a 25) comparado con Rituxan® (% Fucosa = 0,93). Además, la relación Fuc/Gal (relación tasa de fucosa / tasa de galactosa) de EMAB6 y de EMAB603 es baja (relación Fuc/Gal inferior a 0,6) al contrario que los anticuerpos expresados en CHO como Rituxan (relación Fuc/Gal = 1,63).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Laboratoire Français du Fractionnement y des Biotechnologies (LFB)

<120> Anticuerpo monoclonal dirigido contra el CD20

<130> Anti-CD20

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 1

actgccatca atcttcact tgac 24

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 2

ctgagggtgt agagtcaga ctg 23

<210> 3

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 3

ttgtcaaga agcacacgac ttaggcac 28

<210> 4

<211> 28

<212> ADN

ES 2 588 161 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5 <400> 4
gagttccagg tcaaggtcac tggctcag 28

10 <210> 5
<211> 321
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 5
caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcaact ggtaccagca gaagccagga 120
tcctcccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttat tctttcacia tcagcagagt ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg acttttaacc caccacggt cggagggggg 300
accaggctgg aaataaacg g 321

15 <210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 6
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Asn Arg
100 105

25 <210> 7
<211> 354
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

30 <400> 7
caggcttatc tacagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaagcagaca 120
cctagacagg gcctggaatg gattggaggt atttatccag gaaatggtga tacttctctac 180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtaggca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagatatgac 300
tacaactatg ctatggacta ctggggctcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

ES 2 588 161 T3

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 8
 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

 Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

 ser Val Thr Val Ser Ser
 115
 10
 <210> 9
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador
 20
 <400> 9
 ctcagtacta gtgccgccac catggatttt caagtcaga ttttcag 47
 25
 <210> 10
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador
 35
 <400> 10
 tgaagacact tgggtcagcc acagtccggt ttattccag cctggt 46
 40
 <210> 11
 <211> 5289
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Vector
 <400> 11

ES 2 588 161 T3

gatctcccga tcccctatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa 60
gccagtatct gctccctgct tgtgtgttgg aggtcgctga gtagtgcgcg agcaaaattt 120
aagctacaac aaggcaaggc ttgaccgaca attgcatgaa gaatctgctt agggttaggc 180
gttttgcgct gcttcgcat gtacgggcca gatatacgcg tatctgaggg gactaggggtg 240
tgtttaggcg aaaagcgggg cttcggttgt acgcggttag gagtcccctc aggatatagt 300
agtttcgctt ttgcataggg agggggaaat gtagtcttat gcaatactct ttagtcttg 360
caacatggta acgatgagtt agcaacatgc cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg 420
ccgattggtg gaagtaaggt ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac agacgggtct 480
gacatggatt ggacgaacca ctgaattccg cattgcagag atattgtatt taagtgccta 540
gctcgataca ataaacgcca tttgaccatt caccacattg gtgtgcacct ccaagcttg 600
taccgagctc ggatccacta gtaacggccg ccagtgtgct ggaattctgc agatatccat 660
cacactggcg gccgctggct gcaccaagtg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt 720
tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgtgaataa cttctatccc agagaggcca 780
aagtacagtg gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag 840
agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag 900
actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg 960
tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtctagagc tcgctgatca gcctcgactg 1020
tgcttctag ttgccagcca tctgtgttt gccctccc cgtgccttcc ttgaccctgg 1080
aaggtgccac tcccactgct ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 1140
gtaggtgtca ttctattctg ggggtgtggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 1200
aagacaatag caggcatgct ggggatgctg tgggtctat ggcttctgag gcggaaagaa 1260
ccagctgggg ctcgactgtg gaatgtgtgt cagttagggg gtggaaagtc cccaggctcc 1320
ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag 1380
tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc 1440
atagtcccg cccctaactcc gcccatccc gccctaactc cgcccagttc cgcccattct 1500
ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct 1560
gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt ttggaggcc taggcttttg caaaaagctt 1620
gggggggggg acagctcagg gctgcatgtt cgcgcaaac ttgacggcaa tcctagcgtg 1680
aaggctggtg ggattttatc cccgctgcca tcattggtcg accattgaac tgcacgctcg 1740
ccgtgtcca agatatgggg attggcaaga acggagacct accctggcct ccgctcagga 1800
acgagttcaa gtacttccaa agaatgacca caacctctc agtgaaggt aacagaatc 1860

ES 2 588 161 T3

tggtgattat gggtaggaaa acctggttct ccattcctga gaagaatcga cttttaaagg 1920
 acagaattaa tatagttctc agtagagaac tcaaagaacc accacgagga gctcattttc 1980
 ttgccaaaag tttggatgat gccttaagac ttattgaaca accggaattg gcaagtaaag 2040
 tagacatggt ttggatagtc ggaggcagtt ctgtttacca ggaagccatg aatcaaccag 2100
 gccacctcag actctttgtg acaaggatca tgcaggaatt tgaaagtgac acgtttttcc 2160
 cagaaattga tttggggaaa tataaacttc tcccagaata cccaggcgtc ctctctgagg 2220
 tccaggagga aaaaggcatc aagtataagt ttgaagtcta cgagaagaaa gactaacagg 2280
 aagatgcttt caagtctctc gctcccctcc taaagctatg catttttata agaccatggg 2340
 acttttgctg gcttttagatc gatctttgtg aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa 2400
 ttggacaaac tacctacaga gatttaaagc tctaaggtaa atataaaatt ttttaagtga 2460
 taatgtgta aactactgat tctaattggt tgtgtatfff agattccaac ctatggaact 2520
 gatgaatggg agcagtggg gaatgccttt aatgagggaaa acctgttttg ctcagaagaa 2580
 atgccatcta gtgatgatga ggctactgct gactctcaac attctactcc tccaaaaaag 2640
 aagagaaaag tagaagacc caaggacttt ccttcagaat tgctaagttt tttgagtcac 2700
 gctgtgttta gtaatagaac tcttgcttgc tttgctatff acaccacaaa ggaaaaagct 2760
 gcactgctat acaagaaaat tatggaaaaa tattctgtaa cttttataag taggcataac 2820
 agttataatc ataacatact gttttttctt actccacaca ggcatagagt gtctgtctatt 2880
 aataactatg ctcaaaaatt gtgtaccttt agctttttta tttgtaaagg ggtaataaag 2940
 gaatatttga tgtatagtgc cttgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga 3000
 ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctcccctg aacctgaaac ataaaatgaa 3060
 tgcaattggt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 3120
 catcacaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagtgtg gtttgcctca 3180
 actcatcaat gtatcttatc atgtctggat ccgctgatgg tgcactctca gtacaatctg 3240
 ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcca acaccgctg acgcgccctg 3300
 acgggctgt ctgctcccg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct cggggagctg 3360
 catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgag agacgaaagg gcctcgtgat 3420
 acgcctattt ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac 3480
 ttttcgggga aatgtgcgag gaaccctat ttgtttatff ttctaaatac attcaaatat 3540
 gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 3600
 tatgagtatt caacatttc gtgtcgccct tattccctff tttgcggcat tttgccttcc 3660
 tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 3720
 acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 3780
 cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggatattatc 3840
 ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt 3900

ES 2 588 161 T3

ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt 3960
 atgcagtgt gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat 4020
 cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 4080
 tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat 4140
 gcctgtagca atggcaacaa cgttgacgaa actattaact ggcgaactac ttactctagc 4200
 ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg 4260
 ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc 4320
 tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta 4380
 cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agataggtgc 4440
 ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga 4500
 tttaaaactt ctttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataatctcat 4560
 gacaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat 4620
 caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 4680
 accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 4740
 ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt 4800
 aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt 4860
 accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata 4920
 gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt 4980
 ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac 5040
 gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcaggggtcg gaacaggaga 5100
 gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 5160
 ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa 5220
 aaacgccagc aacgggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat 5280
 ggctcgaca 5289

<210> 12
 <211> 6275
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Vector

10

<400> 12
 tcgaggagac ctgcaaagat ggataaagtt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaattg 60
 gaccttctag gtcttgaag gagtgggaat tggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg 120

ES 2 588 161 T3

cacatcgccc acagtccccg agaagttgtg gggagggggtc ggcaattgaa ccggtgccta 180
gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc 240
cgagggatgg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa 300
cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt 360
tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacc tggctgcagt acgtgattct 420
tgatcccagag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagtctg aggccttgcg ctttaaggagc 480
cccttcgctt cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggctg tggggccgcc gcgtgcgaat 540
ctggtggcac cttcgcgctt gtctcgtcgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt 600
ttgatgacct gctgcgacgc ttttttctg gcaagatagt cttgtaaag cgggccaaga 660
tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcgggctgc gacggggccc gtgcgtccca 720
gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgct agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta 780
gtctcaagct ggccggcctg ctctgggtgcc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc 840
ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc 900
cggccctgct gcagggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga 960
gtcaccaca caaaggaaaa gggcctttcc gtccctagcc gtcgcttcat gtgactccac 1020
ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg agcttttga gtacgtcgtc 1080
tttaggttg ggggaggggt tttatgcat ggagtttccc cacttgagt ggggtggagac 1140
tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta attctccttg gaatttgccc tttttgagtt 1200
tggatcttg ttcatttca agcctcagac agtggttcaa agttttttc ttccatttca 1260
ggtgtcgtga ggaattagct tggtaacaac agcaaagctt aaggtactag tgccgccacc 1320
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 1380
agaggacaaa ttgttctctc ccagctctca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 1440
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tgactggta ccagcagaag 1500
ccagatcct ccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcctt 1560
gctcgttca gtggcagtg gtctgggacc tcttattctt tcacaatcag cagagtggag 1620
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggactt ttaaccacc cacgttcgga 1680
ggggggacca ggtcggaaat aaaccggact gtggctgcac caagtgtctt catcttcccg 1740
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 1800
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 1860
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 1920
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 1980
ggcctgagct cggcgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtagtc tagagctcgc 2040
tgatcagcct cgactgtgct ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg 2100
ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 2160

ES 2 588 161 T3

gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc 2220
aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcbggggg ctctatggct 2280
tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctcg actgtggaat gtgtgtcagt taggggtgtgg 2340
aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc 2400
aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct 2460
caattagtca gcaacatag tcccgccct aactccgcc atcccgcc taactccgcc 2520
cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga 2580
ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg 2640
cttttgcaaa aagctttatc cccgctgcca tcatggttcg accattgaac tgcacgtcg 2700
ccgtgtccca agatatgggg attggcaaga acggagacct accctggcct ccgctcagga 2760
acgagttcaa gtacttccaa agaatgacca caacctctc agtggagggt aacagaaatc 2820
tggtgattat gggtaggaaa acctggttct ccatcctga gaagaatcga cttttaaagg 2880
acagaattaa tatagttctc agtagagaac tcaaagaacc accacgagga gctcattttc 2940
ttgcaaaaag tttggatgat gccttaagac ttattgaaca accggaattg gcaagtaaag 3000
tagacatggt ttgatagtc ggaggcagtt ctgtttacca ggaagccatg aatcaaccag 3060
gccacctcag actctttgtg acaaggatca tgcaggaatt tgaaagtgac acgtttttcc 3120
cagaaattga tttggggaaa tataaacttc tcccagaata cccaggcgtc ctctctgagg 3180
tccaggagga aaaaggcátc aagtataagt ttgaagtcta cgagaagaaa gactaacagg 3240
aagatgcttt caagtctct gctccccctc taaagctatg ctttttata agaccatggg 3300
acttttgctg gcttttagatc gatctttgtg aaggaacctt acttctgtgg tgtgacataa 3360
ttggacaaac tacctacaga gatttaaagc tctaaggtaa atataaaatt tttaagtgtg 3420
taatgtgtta aactactgat tctaattggt tgtgtatttt agattccaac ctatggaact 3480
gatgaatggg agcagtggtg gaatgccttt aatgagggaaa acctgttttg ctcagaagaa 3540
atgccatcta gtgatgatga ggctactgct gactctcaac attctactcc tccaaaaaag 3600
aagagaaagg tagaagacc caaggacttt ccttcagaat tgctaagttt tttgagtcac 3660
gctgtgttta gtaatagaac tcttgcttgc tttgctattt acaccacaaa ggaaaaagct 3720
gcactgctat acaagaaaat tatggaaaaa tattctgtaa cttttataag taggcataac 3780
agttataatc ataacatact gttttttctt actccacaca ggcatagagt gtctgctatt 3840
aataactatg ctcaaaaatt gtgtaccttt agctttttaa tttgtaaagg ggtaataaag 3900
gaatatttga tgtatagtgc cttgactaga gatcataatc agccatacca cttttgtaga 3960
ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa 4020
tgcaattggt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 4080
catcaciaat ttcaciaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 4140
actcatcaat gtatcttatc atgtctggat ccgctgatgg tgactctca gtacaatctg 4200

ES 2 588 161 T3

ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgccca acacccgctg acgcgccctg 4260
acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg 4320
catgtgtcag aggtttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat 4380
acgcctatntt ttataggtta atgtcatgat aataatgggt tcttagacgt caggtggcac 4440
ttttcgggga aatgtgfcgcy gaaccctat ttgtttatntt ttctaaatac attcaaatat 4500
gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 4560
tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcygcat tttgccttcc 4620
tgntttttgct caccagaaa cgtggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 4680
acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 4740
cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cgttattatc 4800
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tgcgccata cactattctc agaatgactt 4860
ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt 4920
atgcagtgtc gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat 4980
cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 5040
tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc catacctaac gacgagcgtg acaccacgat 5100
gcctgtagca atggcaacaa cgttgcycaa actattaact ggcgaactac ttactctagc 5160
ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcy 5220
ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc 5280
tcgcygtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcy tagttatcta 5340
cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agataggtgc 5400
ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac ttagattga 5460
tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctagggtgaag atcctttttg ataactctcat 5520
gaccaaatac ccttaacgtg agttttcgtt ccaactgagcy tcagaccccg tagaaaagat 5580
caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 5640
accaccgcta ccagcggtyg tttgtytgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 5700
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgcy cttctagtgt agccgtagtt 5760
aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgctctgcy taatcctgnt 5820
accagtggct gctgccagty gcgataagtc gtgtcttacc gggtyggact caagacgata 5880
gntaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcytgcacac agcccagctt 5940
ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgcac 6000
gcttcccga a gggagaaagg cggacaggt a tccggtaacg ggcagggtyc gaacaggaga 6060
gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtyctg tcyggtytctg 6120
ccactctga cttgagcgtc gatntttgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatgga 6180
aaacgccagc aacgcgcct ttttacggtt ctyggccttt tyctgcyctt tygtcacat 6240
ggctcgcag atccgcgga tcyggagatc ctgac 6275

5 <210> 13
<211> 639
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Constructo sintético

ES 2 588 161 T3

<400> 13
 caaatgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
 atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt tacatgact ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctccccca aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttat tctttcaca tcagcagagt ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg acttttaacc caccacggt cggagggggg 300
 accaggctgg aaataaacccg gactgtggct gcaccaagtg tcttcatctt cccgccatct 360
 gatgagcagt tgaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600
 agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639

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

5
 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 14
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

ES 2 588 161 T3

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

- <210> 15
- <211> 45
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Cebador
- 10
- <400> 15
- ctcagtacta gtgccgccac catgggattc agcaggatct ttctc 45

- <210> 16
- 15 <211> 48
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 20 <223> Cebador

- <400> 16
- gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gacgggtgact gaggttcc 48

- 25 <210> 17
- <211> 5739
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> Vector

- <400> 17

ES 2 588 161 T3

catggctcga cagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgtatctgag	240
gggactaggg tgtgtttagg cgaaaagcgg ggcttcgggt gtacgcgggt aggagtcccc	300
tcaggatata gtagtttcgc ttttgcatag ggagggggaa atgtagtctt atgcaatact	360
cttgtagtct tgcaacatgg taacgatgag ttagcaacat gccttacaag gagagaaaa	420
gcaccgtgca tgccgattgg tggaaagtaag gtggtacgat cgtgccttat taggaaggca	480
acagacgggt ctgacatgga ttggacgaac cactgaattc cgcattgcag agatattgta	540
tttaagtgcc tagctcgata caataaacgc catttgacca ttcaccacat tgggtgtgac	600
ctccaagctt ggtaccgagc tcggatccac tagtaacggc cgccagtgtg ctggaattct	660
gcagatatcc atcacactgg cggccgctcc accaagggcc catcggctct cccctggca	720
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac	780
ttcccgaac cgggtgacggt gtcgtggaac tcaggcggc tgaccagcgg cgtgcacacc	840
ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc	900
tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc	960
aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	1020
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac	1080
accctcatga tctccgggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa	1140
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	1200

ES 2 588 161 T3

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1260
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1320
gccccatcg agaaaacat ctccaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1380
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1440
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1500
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag 1560
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcat 1620
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatagtct 1680
agagctcgct gatcagctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc 1740
tccccgtgc cttccttgac cctggaaggt gccactcca ctgtcctttc ctaataaaat 1800
gaggaattg catcgattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtggg 1860
caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtggg 1920
tctatggctt ctgaggcga aagaaccagc tggggctcga gcgtgggcca tcgccctgat 1980
agacggtttt tcgcccttg acgttgaggt ccacgttctt taatagtga ctctgttcc 2040
aaactggaac aacctcaac cctatctcgg tctattcttt tgattataa gggattttgc 2100
cgatttcggc ctattggta aaaaatgagc tgatttaaca aatatttaac gcgaatttta 2160
acaaaatatt aacgtttaca atttcgcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc 2220
ggtatttcac accgcatacg cggatctgcg cagcaccatg gcctgaaata acctctgaaa 2280
gaggaacttg gttaggtacc ttctgaggcg gaaagaacca gctgtggaat gtgtgtcagt 2340
taggggtggt aaagtcccc ggtccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2400
attagtcayc aaccagggtg gaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 2460
gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccct aactccgcc atcccgcc 2520
taactccgcc cagttccgc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 2580
cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggctttttg 2640
gaggcctagg cttttgcaaa aagcttgatt cttctgacac aacagtctcg aacttaaggc 2700
tagagccacc atgattgaac aagatggatt gcacgcagg tctccggccg cttgggtgga 2760
gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt 2820
ccggctgtca gcgcagggg gcccggttct tttgtcaag accgacctgt ccggtgccct 2880
gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg 2940
cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc ggaagggac tggctgctat tgggcaagt 3000
gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc 3060
tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc 3120
gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtctgtcg atcaggatga 3180
tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg 3240

ES 2 588 161 T3

catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat 3300
 ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg 3360
 ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc 3420
 tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta 3480
 tcgccttctt gacgagtctt tctgagcggg actctggggg tcgaaatgac cgaccaagcg 3540
 acgcccacc tgccatcacg atggccgcaa taaaatatct ttattttcat tacatctgtg 3600
 tgttggtttt ttgtgtgaat cgatagcgat aaggatcgat cctctagcta gagtcgatcg 3660
 acctgcaggg atccgcgtat ggtgactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 3720
 aagccagccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgcc tgacgggctt gtctgtccc 3780
 ggcattccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 3840
 accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat tttataggt 3900
 taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg 3960
 cggaaccctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca 4020
 ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt 4080
 ccgtgtcgc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctcaccaga 4140
 aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga 4200
 actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat 4260
 gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca 4320
 agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt 4380
 cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac 4440
 catgagtgat aacctgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct 4500
 aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaaccgga 4560
 gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac 4620
 aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat 4680
 agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg 4740
 ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc 4800
 actggggcca gatgtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc 4860
 aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg 4920
 gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcattttta 4980
 atttaaaagg atctagtgga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg 5040
 tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 5100
 tcctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg 5160
 ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 5220
 agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 5280

ES 2 588 161 T3

ctctgtagca ccgcctacat acctcgcctc gctaactcctg ttaccagtgg ctgctgccag 5340
 tggcgataag tcgtgtccta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 5400
 gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 5460
 cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa 5520
 ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc 5580
 agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg 5640
 tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 5700
 ctttttacgg ttcttgccct tttgctggcc ttttctca 5739

<210> 18
 <211> 6824
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Vector

<400> 18
 tcgaggagac ctgcaaagat ggataaagt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaattg 60
 gaccttctag gtcttgaag gagtgggaat tggctccggg gcccgctcagt gggcagagcg 120
 cacatcgcgc acagtcctcc agaagtgtg gggaggggtc ggcaattgaa ccgggtgccta 180
 gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaa tgatgctcgt tactggctcc gcctttttcc 240
 cgaggggtgg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa 300
 cgggtttgcc gccagaacac agtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt 360
 tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttcacc tggctgcagt acgtgattct 420
 tgatcccag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc 480
 cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggccc tggggccgcc gcgtgcgaat 540
 ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgtgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt 600
 ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg gcaagatagt cttgtaaattg cgggccaaga 660
 tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcgggccc gacggggccc gtgctccca 720
 gcgcacatgt tcggcgaggc gggcctgcg agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta 780
 gtctcaagct ggccggcctg ctctgggtgcc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc 840
 ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc agttgctgta gcgaaagat ggccgcttcc 900
 cggccctgct gcaggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga 960
 gtcaccaca caaaggaaa gggccttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac 1020
 ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg agcttttggg gtacgtcgtc 1080

ES 2 588 161 T3

tttaggttgg ggggaggggt tttatgcat ggagtttccc cacttgagt gggaggagac 1140
 tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta attctccttg gaatttgccc tttttgagtt 1200
 tggatcttgg ttcattctca agcctcagac agtggttcaa agtttttttc ttccatttca 1260
 ggtgtcgtga ggaattagct tggtaaaaac agcaaagctt aaggtagtag tgccgccacc 1320
 atgggatca gcaggatcct tctcttcctc ctgtcagtaa ctacaggtgt cactcccag 1380
 gcttatctac agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcctcagt gaagatgtcc 1440
 tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct 1500
 agacagggcc tggaatggat tggaggtatt tatccaggaa atgggtgatac ttctacaat 1560
 cagaagtca agggcaaggc cacttgact gtaggcaaat cctccagcac agcctacatg 1620
 cagctcagca gcctgacatc tgaagactct gcggtctatt tctgtgcaag atatgactac 1680
 aactatgcta tggactactg ggtcaagga acctcagtca ccgtctctc agcctccacc 1740
 aagggcccat cggcttctcc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 1800
 gccctgggct gcctggctca ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 1860
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac 1920
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 1980
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 2040
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcttggggg accgtcagtc 2100
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 2160
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 2220
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgaggagg agcagtaca cagcacgtac 2280
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 2340
 tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caagccaaa 2400
 gggcagccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 2460
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 2520
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 2580
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 2640
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 2700
 ctctccctgt ctccgggtaa atagtctaga gctcgtgat cagcctcgac tgtgccttct 2760
 agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc 2820
 actcccactg tctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt 2880
 cattctattc tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat 2940
 agcagcatg ctgggatgc ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg 3000
 ggctcgagcg tggccatcg ccctgataga cggttttctg cccttgacg ttggagtcca 3060
 cgttctttaa tagtgactc ttgttcaaaa ctggaacaac actcaaccct atctcgtct 3120

ES 2 588 161 T3

attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 3180
 ttttaacaaat atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt tcgcctgatg 3240
 cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatacgcgg atctgcgcag 3300
 caccatggcc tgaataaacc tctgaaagag gaacttggtt aggtaccttc tgaggcggaa 3360
 agaaccagct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtgaaa gtccccaggc tccccagcag 3420
 gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac cagggtgtgga aagtccccag 3480
 gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accatagtcc 3540
 cgcccctaac tccgcccac ccccccctaa ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc 3600
 atggctgact aatttttttt atttatgcag aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat 3660
 tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag gcctaggcct ttgcaaaaag cttgattctt 3720
 ctgacacaac agtctcgaac ttaaggctag agccacatg attgaacaag atggattgca 3780
 cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac 3840
 aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt 3900
 tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc 3960
 gtggctggcc acgacgggag ttccctgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg 4020
 aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctcctgtcat ctcaccttgc 4080
 tcctgccgag aaagtatcca tcattggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc 4140
 ggctacctgc ccattcagcc accaagcgaa acatcgcac gagcgagcac gtactcggat 4200
 ggaagccggt cttgtcagtc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc 4260
 cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcac gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca 4320
 tggcagtgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga 4380
 ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat 4440
 tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc 4500
 tcccgattcg cagcgcacg ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gagcgggact 4560
 ctggggttcg aatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgatg gccgcaataa 4620
 aatatcttta tttcattac atctgtgtgt tggtttttg tgtgaatcga tagcgataag 4680
 gatcgcctct ctgactagag tcgatcgacc tgcagggatc cgcgtatggt gcaactctag 4740
 tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagccccga caccgcca caccgctga 4800
 cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc 4860
 cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcacaccg aaacgcgcga gacgaaaggg 4920
 cctcgtgata cgcctatttt tatagggtta tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc 4980
 aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca 5040
 ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 5100
 aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctttt ttgcggcatt 5160

ES 2 588 161 T3

ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca 5220
 gttgggtgca cgagtggggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 5280
 ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc 5340
 ggtattatcc cgtattgacg cgggcaaga gcaactcggc cgccgatac actatttctca 5400
 gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 5460
 aagagaatta tgcagtgctg ccataacatc gagtgataac actgaggcca acttacttct 5520
 gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt 5580
 aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga 5640
 caccagatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact 5700
 tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc 5760
 acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga 5820
 gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggagatg ggtaagccct cccgtatcgt 5880
 agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtgta 5940
 gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact 6000
 ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 6060
 taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttctgctc cactgagcgt cagaccccgt 6120
 agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaactc gctgcttgca 6180
 aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct 6240
 ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtta 6300
 gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 6360
 aatcctgta ccagtggtct ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttgactc 6420
 aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca 6480
 gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga 6540
 aagcggcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg 6600
 aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt 6660
 cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 6720
 cctatggaaa aacgccagca acgcgcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt 6780
 tgctcacatg gctcgacaga tccgacggat cgggagatcc tagc 6824

<210> 19
 <211> 1344
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

10 <400> 19

ES 2 588 161 T3

caggcttatac tacagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaagcagaca 120
 cctagacagg gcctggaatg gattggaggt atttatccag gaaatggtga tacttcctac 180
 aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtaggca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagatatgac 300
 tacaactatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcgggtctt cccctgggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccttg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcggcc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagtga gcccaaactc 660
 tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720
 gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
 aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag 1320
 agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 20
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Constructo sintético

10

<400> 20

ES 2 588 161 T3

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

ES 2 588 161 T3

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 21
 <211> 318
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 actgtggctg caccaagtgt cttcatcttc ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aagggtgata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgt 318

10 <210> 22
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 22

ES 2 588 161 T3

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

<210> 23
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 23
 gcttccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 120
 tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tctcttccc ccaaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

10

agcacgtacc gtgtggctcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggtcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaà ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 24
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 24

ES 2 588 161 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 25
 <211> 321
 <212> ADN
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 25
 caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
 atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctccccc aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttat tctttcacia tcagcagagt ggaggctgaa 240
 gatgctgcc cttattactg ccagcagtgg acttttaacc caccacggt cggagggggg 300
 accaggctgg aaataaacg g 321

 10 <210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15 <400> 26
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

 20 <210> 27
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Constructo sintético

 25 <400> 27
 caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
 atgacttgca gggccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctccccc aaccctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttat tctttcacia tcagcagagt ggaggctgaa 240
 gatgctgcc cttattactg ccagcagtgg acttttaacc caccacggt cggagggggg 300
 accaggctgg aaataaacg gactgtggct gcaccaagtg tcttcatctt cccgccatct 360

ES 2 588 161 T3

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600
 agctcgcccc tcacaagag cttcaacagg ggagagtgtt agtga 645

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

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 28
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 29
 <211> 46
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5

<400> 29

tgaagacact tggcagcc acagccggt ttattccag cctggt 46

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20, caracterizado por que cada una de sus cadenas ligeras está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 27, y por que cada una de sus cadenas pesadas está codificada por la secuencia de ácido nucleico quimérica murina-humana SEQ ID NO: 19.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que la secuencia peptídica deducida de la secuencia SEQ ID NO: 27 es la secuencia SEQ ID NO: 28, y por que la secuencia peptídica deducida de la secuencia SEQ ID NO: 19 es la secuencia SEQ ID NO: 20.
- 15 3. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que está producido por una línea celular de hibridoma de rata.
- 20 4. Anticuerpo según la reivindicación 3, caracterizado por que está producido en el hibridoma de rata YB2/0 que es la célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, depositada en la American Type Culture Collection bajo el número ATCC CRL-1662.
- 25 5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se trata del anticuerpo EMAB603 producido por el clon R603 depositado bajo el número de registro CNCM I-3529 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).
- 30 6. Línea celular estable que expresa un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 7. Línea celular estable según la reivindicación 6, seleccionada de entre el grupo que consiste en: SP2/0, YB2/0, IR983F, el mieloma humano Namalwa, PERC6, las líneas CHO, en particular CHO-K-1, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NS0, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.
- 40 8. Clon R603 depositado bajo el número de registro CNCM I-3529 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).
- 45 9. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para activar *in vitro* los receptores FcγRIII de células inmunitarias efectoras.
- 50 10. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su utilización como medicamento.
- 55 11. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia o de un linfoma.
- 60 12. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una patología seleccionada de entre las leucemias agudas linfoblásticas B, los linfomas linfoblásticos B, los linfomas de células B maduras, entre los cuales, la leucemia linfocítica crónica de tipo B (LLC-B), el linfoma linfocítico de pequeños linfocitos B, la leucemia prolinfocitaria B, el linfoma linfoplasmocitario, el linfoma de células del manto, el linfoma folicular, el linfoma de la zona marginal de tipo MALT, el linfoma ganglionario de la zona marginal con o sin célula B monocitoide, el linfoma esplénico de la zona marginal (con o sin linfocito vellosa), la leucemia de tricoleucocitos, el linfoma difuso de grandes células B, el linfoma de Burkitt, así como cualquier patología desinmunitaria que implica unas células de la línea linfocítica B de las cuales, las enfermedades autoinmunes.
- 65 13. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia linfocítica.
14. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de tipo B (LLC-B).
15. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad del injerto contra el hospedante crónico.
16. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del rechazo de injertos de órganos, en particular de riñón.
17. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en combinación con uno o varios anticuerpos distintos dirigidos contra uno o varios antígenos distintos expresados en las células linfocíticas, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia o de un linfoma.

18. Utilización de un anticuerpo según la reivindicación 17, caracterizada por que dicho antígeno expresado en las células linfoides se selecciona de entre el HLA-DR, el CD19, el CD23, el CD80, el CD22, el CD32 y el CD52.

5 19. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en asociación con unas células que expresan FcγR, tales como las células NK (Natural Killer), las células NKT (Natural Killers T), los linfocitos Tγδ, los macrófagos, los monocitos o las células dendríticas, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia o de un linfoma.

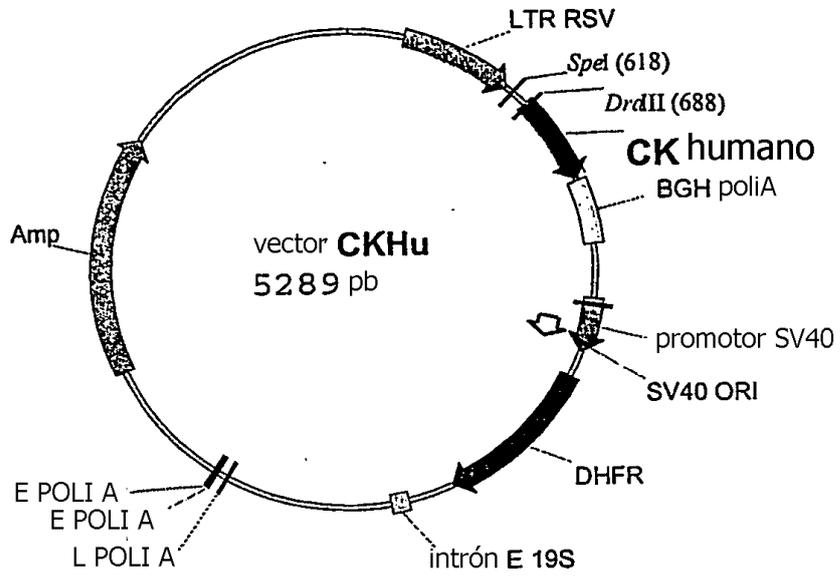


Fig. 1

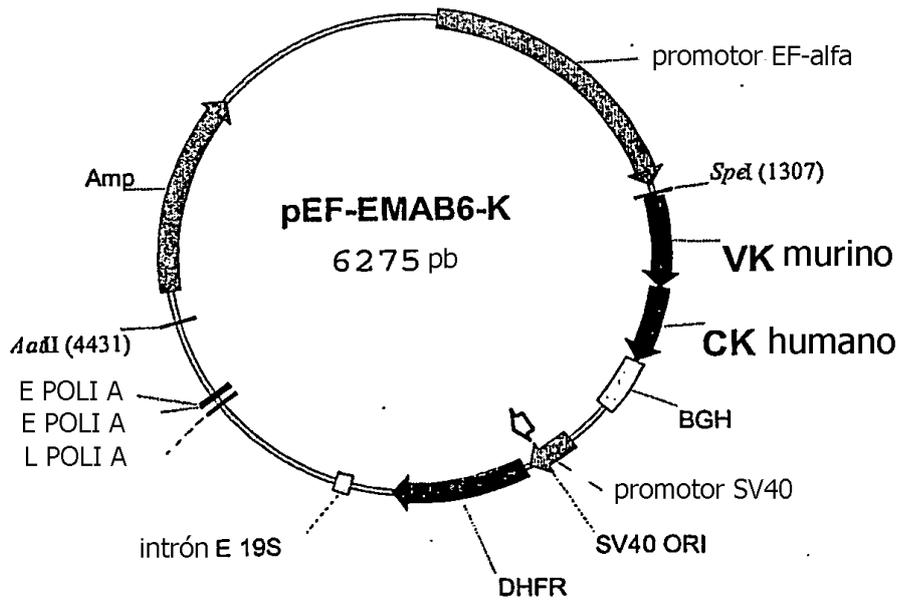


Fig. 2

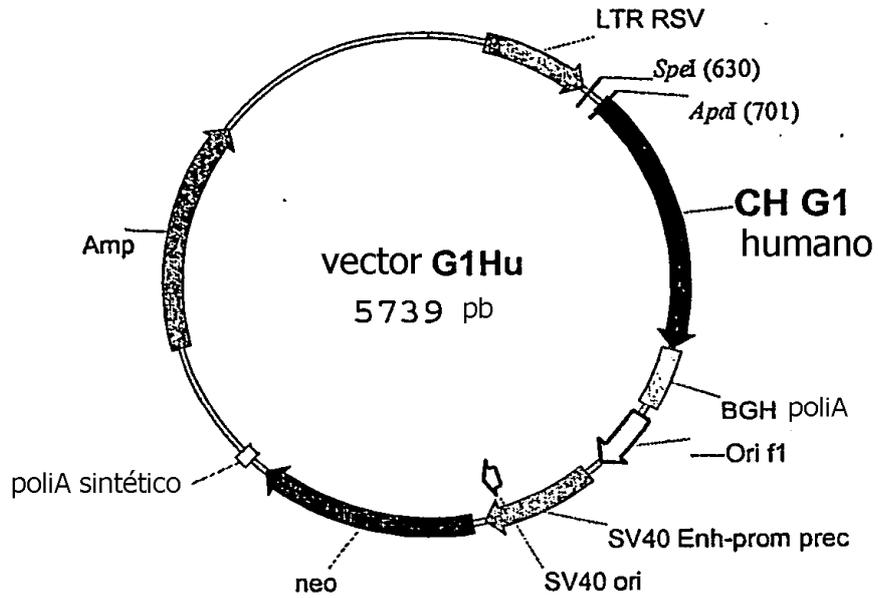


Fig. 3

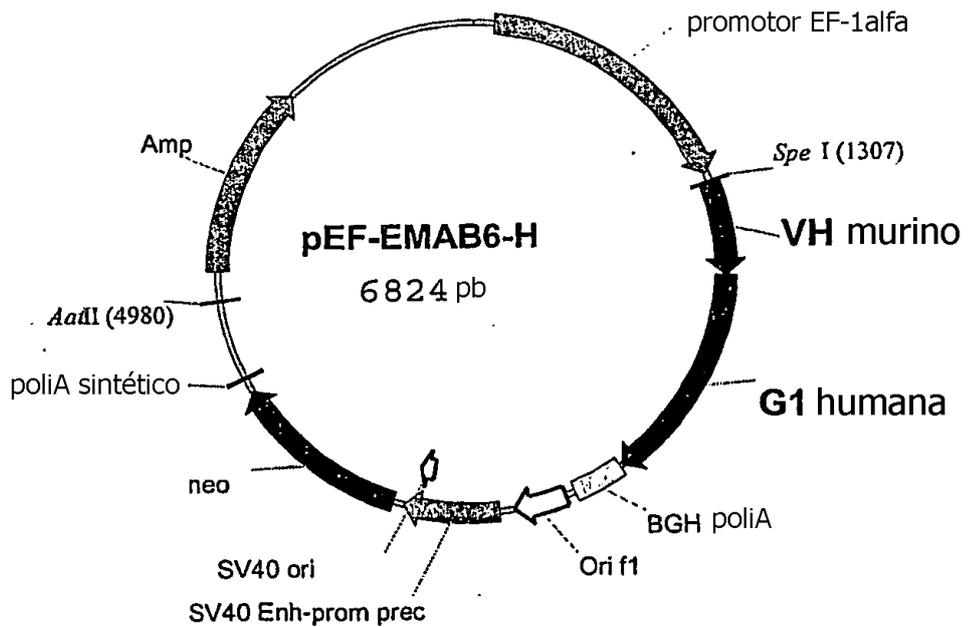


Fig. 4

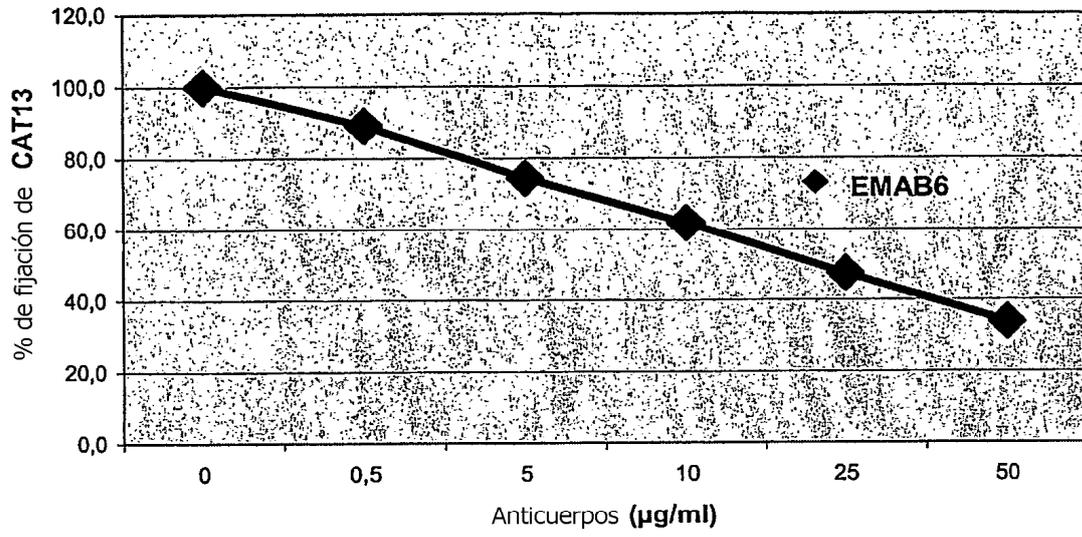


Fig. 5

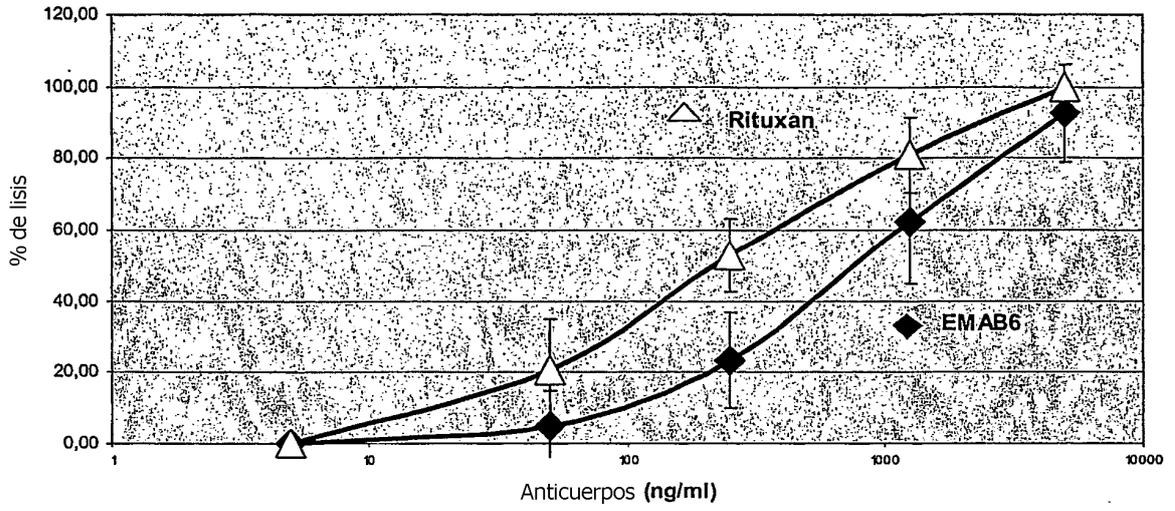


Fig. 6 (A)

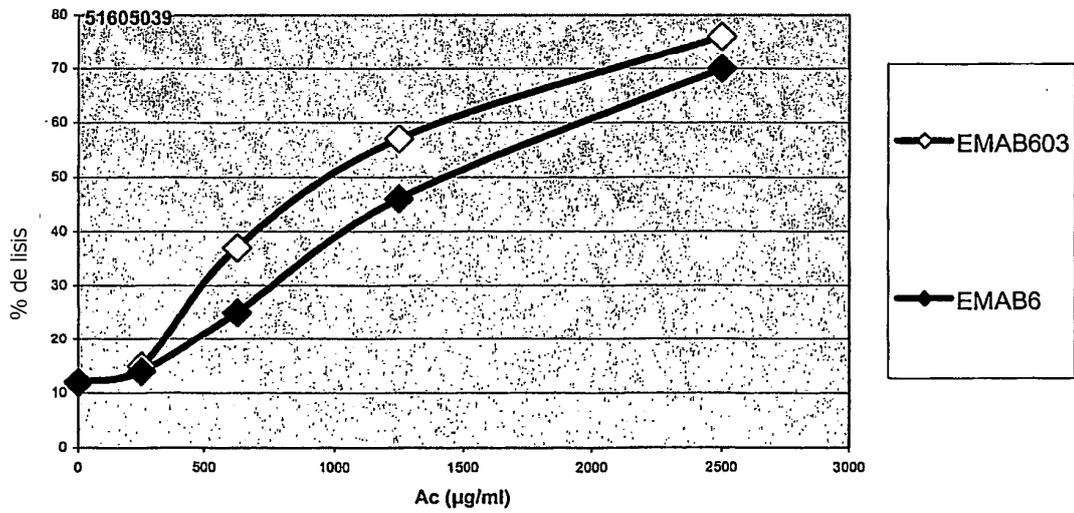


Fig. 6 (B)

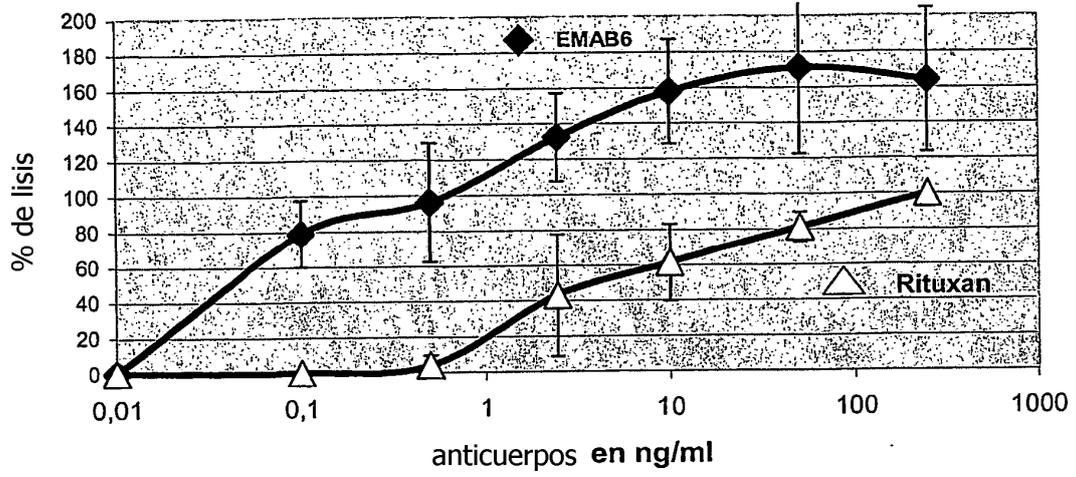


Fig. 7 (A)

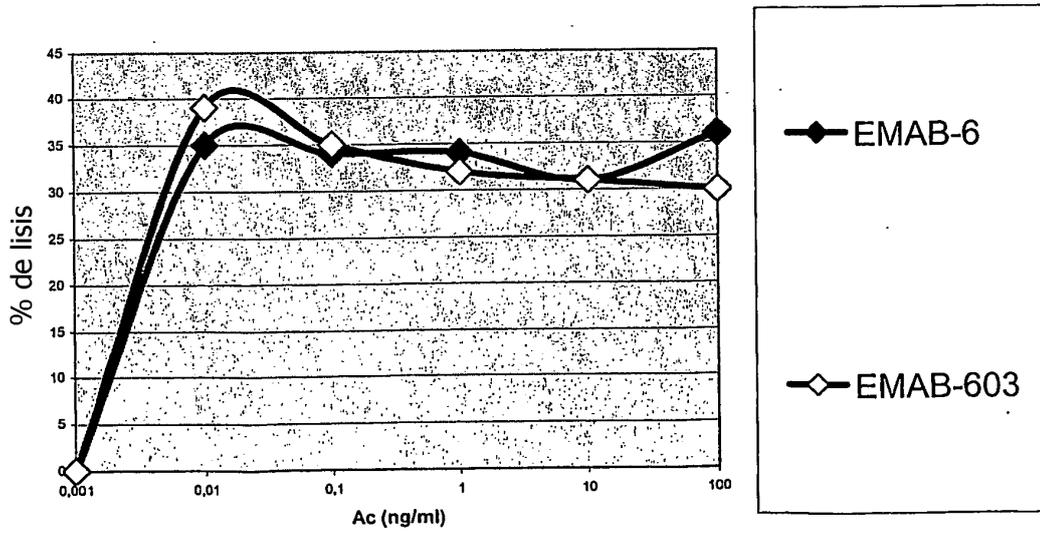


Fig.7 (B)

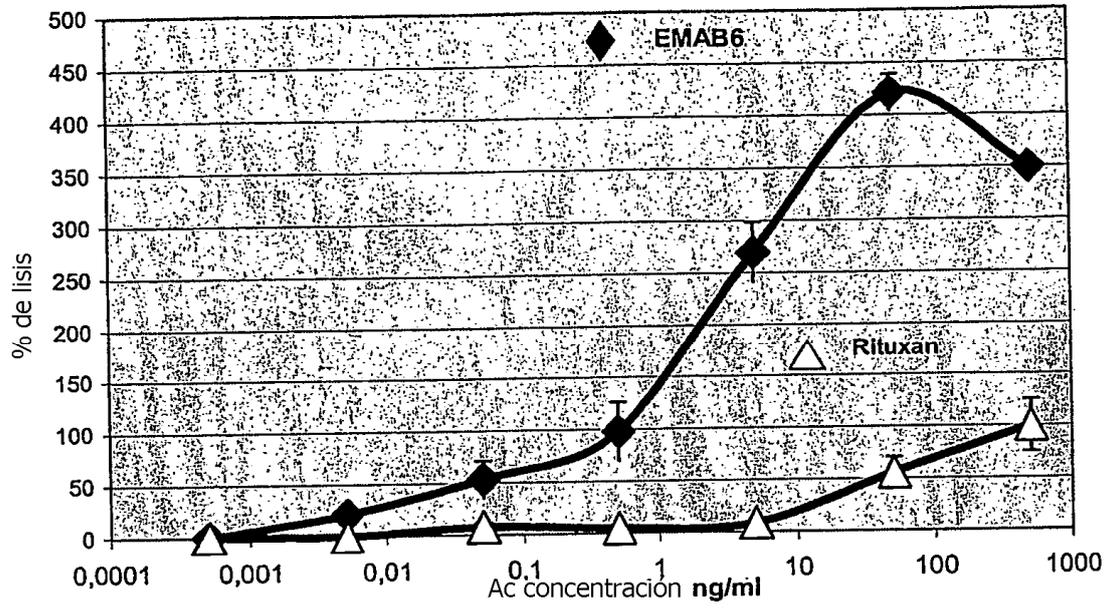


Fig. 8

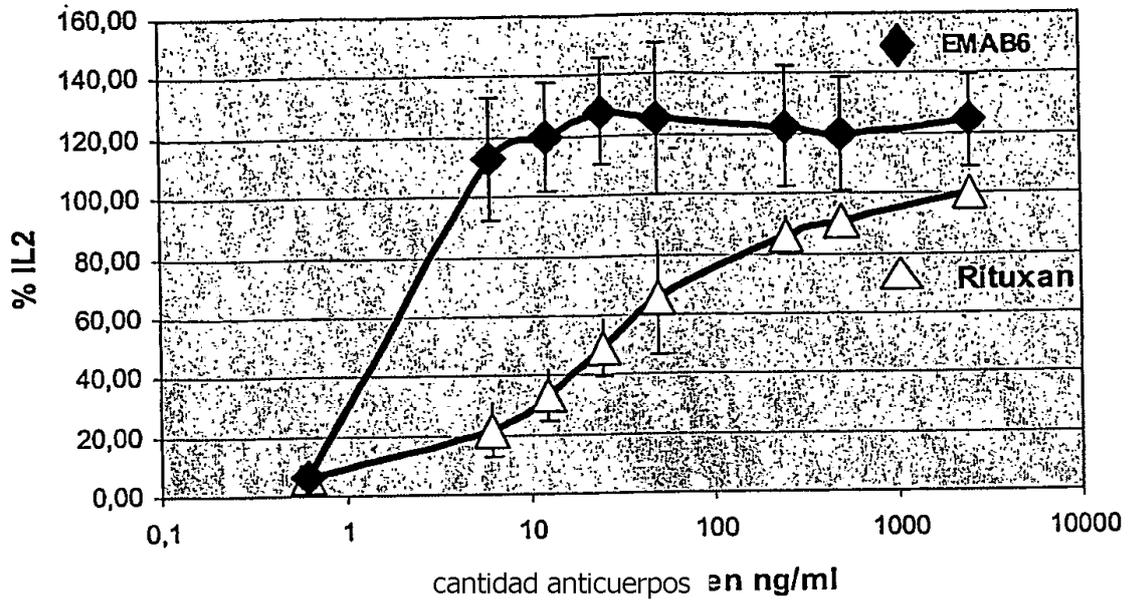


Fig. 9 (A)

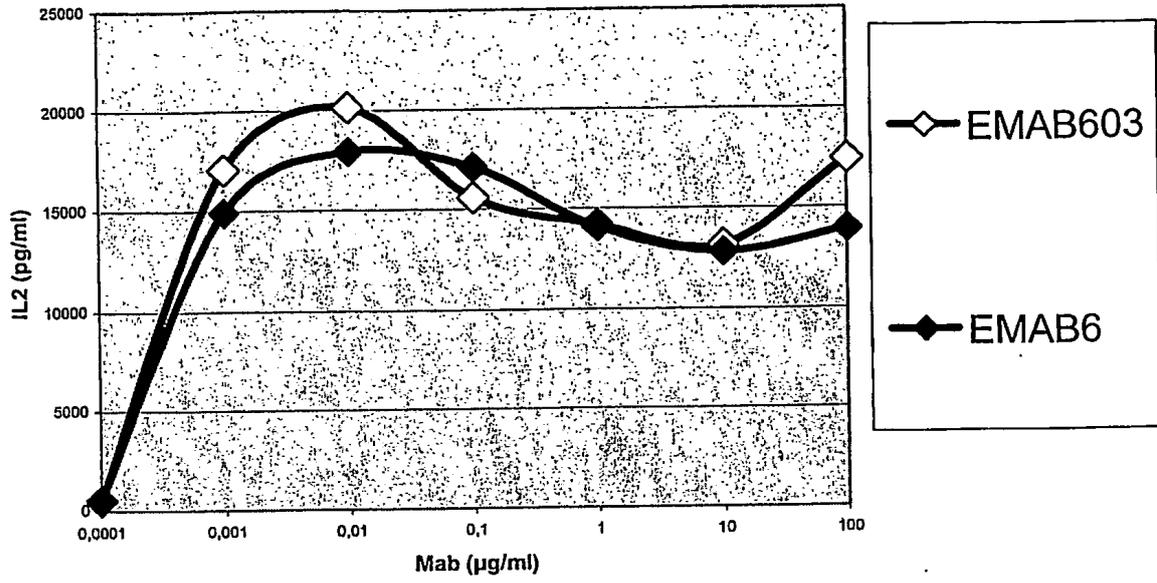


Fig.9 (B)

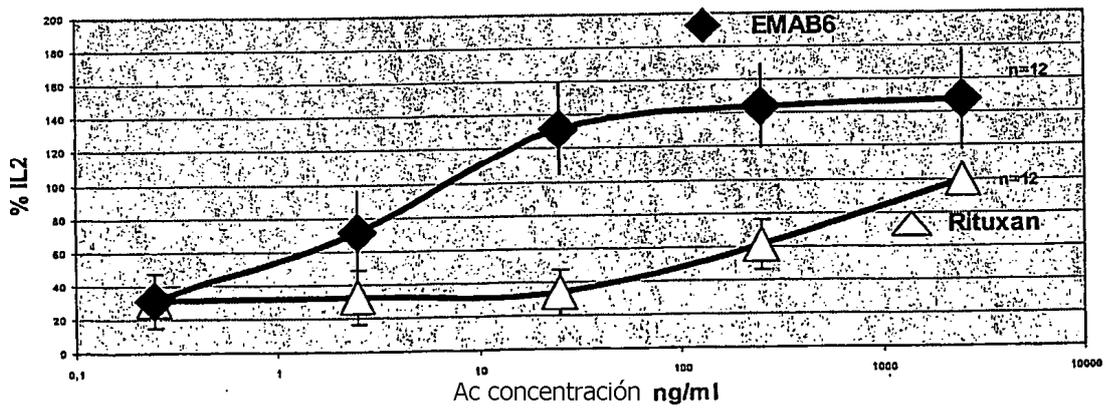


Fig. 10

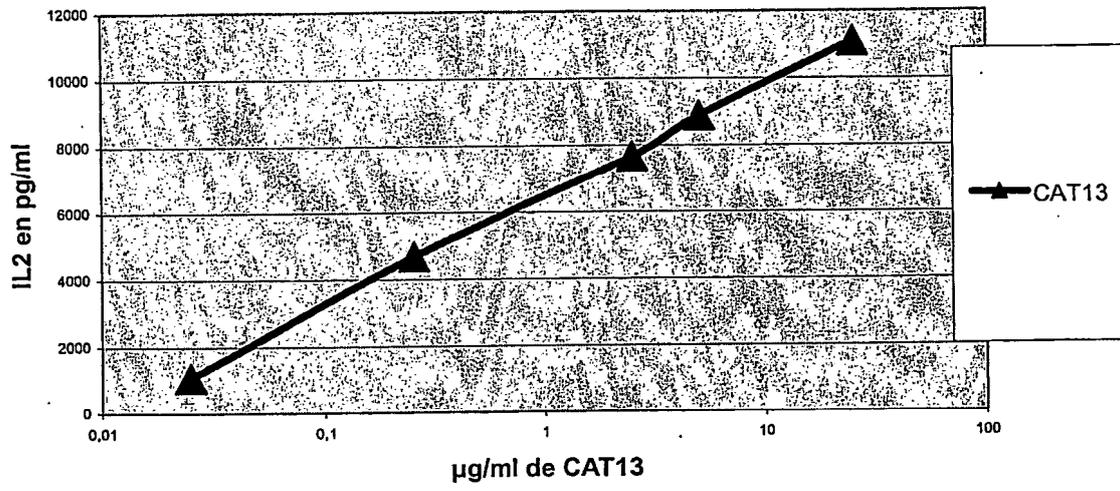


Fig. 11

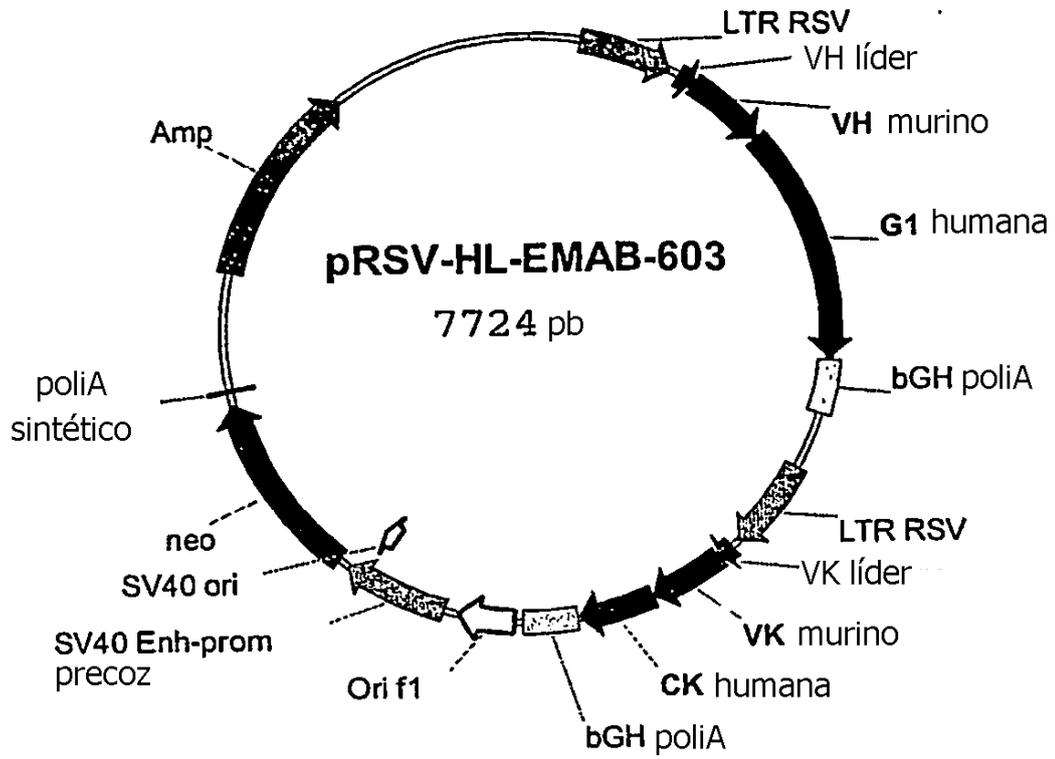


Fig.12