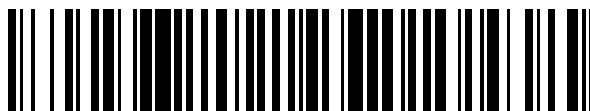


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 459**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01) C12Q 1/02	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) G01N 33/53	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) G01N 33/531	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01) C07K 14/73	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01) C07K 16/46	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)	
C12N 1/19	(2006.01)	
C12N 1/21	(2006.01)	
C12N 5/10	(2006.01)	
C12P 21/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.12.2009 PCT/JP2009/071681**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10074266**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.12.2009 E 09835062 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2374883**

54 Título: **Anticuerpo anti-CD4**

30 Prioridad:

26.12.2008 JP 2008331904

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

21.02.2017

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAGAWA, TOMOAKI;
HORI, SAYAKA;
NIWA, RINPEI;
KUBOTA, TSUGUO;
MASUDA, KAZUHIRO y
NAKAMURA, KAZUYASU**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 602 459 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 anti-CD4.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, que se une a la región extracelular de CD4 humana con una afinidad elevada y también muestra una elevada citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (en adelante denominada "actividad ADCC") o una elevada citotoxicidad celular dependiente del complemento (en adelante denominada "actividad CDC"); a un ADN que codifica el anticuerpo; a un vector que contiene el ADN; a un transformante obtenible introduciendo el vector; a un procedimiento para producir un anticuerpo utilizando el transformante; y a la utilización del anticuerpo para la preparación de un agente terapéutico o un agente diagnóstico.

Técnica anterior

El cúmulo de diferenciación 4 (en adelante denominado "CD4") es una glicoproteína que presenta un peso molecular de aproximadamente 55 kDa, que se expresa en la superficie celular de la mayoría de las células tímicas, alrededor de 2/3 de las células T de la sangre periférica, monocitos, y macrófagos. El CD4 es una proteína transmembránica de tipo I en la que cuatro dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas (denominados por orden D1 a D4 desde el término N hacia el lado de la membrana celular) están presentes en el exterior de las células, y en total dos cadenas de azúcar enlazadas mediante N están unidas a los dominios D3 a D4. El CD4 se une a la molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a través de los dominios D1 y D2, y entonces activa a las células T. Además, es conocido asimismo que CD4 se polimeriza a través de los dominios D3 y D4. Es conocido que el dominio D1 de CD4 actúa como receptor para un virus de la inmunodeficiencia humana (en adelante denominado "HIV") (bibliografía 1 no de patente).

El CD4 también es conocido como T4, y el gen se ha clonado en 1985 (bibliografía 2 no de patente), y la secuencia de ADN, la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de CD4 están públicamente disponibles a partir de una base de datos conocida. Por ejemplo, se pueden obtener mediante referencia a los números de acceso P01730 (SWISSPROT), M12807 (EMBL), y similares.

El anticuerpo monoclonal anti-CD4 OKT4 se confirmó por primera vez como un anticuerpo monoclonal (en adelante denominado "mAb") que se une a CD4 (bibliografía 3 no de patente). Desde entonces, se ha dado a conocer un gran número de anticuerpos monoclonales frente a CD4 (en adelante denominados "mAbs anti-CD4"). Es conocido que la mayoría de los mAbs anti-CD4 dados a conocer hasta ahora reconocen el dominio D1 (bibliografía 1 no de patente). Algunos mAbs anti-CD4 están en desarrollo clínico con el fin de tratar cánceres, enfermedades inmunitarias, e infecciones. Por ejemplo, basándose en que la unión entre CD4 y HIV es esencial para la infección de HIV, un anticuerpo que reconozca el dominio D1 de CD4 puede inhibir la infección de HIV, bajo el desarrollo como un agente terapéutico contra el HIV.

Los ejemplos del mAb anti-CD4 desarrollados como un agente terapéutico para cánceres y enfermedades inmunitarias incluyen zanolimumab (6G5) (bibliografía 4 no de patente), keliximab (CE9.1) (bibliografía 5 no de patente), y similares. Estos anticuerpos son anticuerpos que ejercen su eficacia médica atacando específicamente células que expresan CD4, que son las células diana, y se considera que el mecanismo de la eficacia médica es debido principalmente a la actividad ADCC (bibliografías 6 y 7 no de patente). Mientras tanto, se muestra que estos anticuerpos están desprovistos de una actividad CDC, que se sabe generalmente que es uno de los mecanismos principales de la eficacia médica de anticuerpos terapéuticos, como ADCC (bibliografías 6 y 7 no de patente).

La potencia de la actividad CDC es diferente dependiendo de la subclase de anticuerpos, y las subclases IgG1 e IgG3 humanas tienen una actividad CDC elevada. Es conocido que la intensidad de la actividad CDC entre las subclases está generalmente en el orden de $\text{IgG3} \geq \text{IgG1} > \text{IgG2} \approx \text{IgG4}$. Además, existe un caso en el que la actividad CDC de un anticuerpo se ejerce o no se ejerce dependiendo del antígeno al que se une el anticuerpo (bibliografía 11 no de patente). En consecuencia, cada anticuerpo no siempre puede mostrar la actividad CDC.

Entre los mAbs anti-CD4 confirmados hasta el momento, se sabe poco de los anticuerpos que tienen actividad CDC. Exclusivamente, incluso aunque se sabe que OKT4 muestra actividad CDC frente a una estirpe celular humana positiva para CD4 solamente cuando se usa suero de conejo que es rico en número de complementos (bibliografía 8 no de patente), no se han dado a conocer ejemplos de un anticuerpo que muestre actividad CDC frente a una estirpe celular humana positiva para CD4 cuando se usa un complemento humano.

Se ha dado a conocer una constante de disociación K_D de un anticuerpo para varios mAbs anti-CD4 conocidos. Por ejemplo, se ha dado a conocer que los anticuerpos mostrados en la siguiente tabla tienen una constante de disociación K_D de alrededor de 7 a 0,01 nM (Tabla 1). Al calcular las constantes de disociación, existe la posibilidad de que varíen los valores de medida dependiendo de los equipos de ensayo, métodos de ensayo y métodos de análisis. Por lo tanto, cuando se comparan constantes de disociación, se requieren los valores que se midieron y se analizaron en las mismas condiciones.

[Tabla 1]

Nombre del clon	Constante de disociación [M]
6G5*	$7,1 \times 10^{-9}$
CE9.1*	$3,2 \times 10^{-11}$
Leu-3a**	$1,0 \times 10^{-11}$
13B8.2***	$5,0 \times 10^{-9}$

*: documento WO97/13852, **: bibliografía 9 no de patente, ***: bibliografía 10 no de patente

- 5 La bibliografía 12 no de patente describe el anticuerpo anti-CD4 13B8.2, que muestra proliferación de células de linfoma CD4+ y muestra CDC y ADCC.

Listado de citas

10 Bibliografía no de patente

Bibliografía 1 no de patente: Leucocyte Typing VI, 49 (1997)

Bibliografía 2 no de patente: Cell, 42, 93 (1985)

15

Bibliografía 3 no de patente: Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4061 (1979)

Bibliografía 4 no de patente: Blood, 109, 4655 (2007)

20

Bibliografía 5 no de patente: Lancet, 352, 1109 (1998)

Bibliografía 6 no de patente: Clin Immunol Immunopathol, 84, 73 (1997)

25

Bibliografía 7 no de patente: Cancer Res, 67, 9945 (2007)

Bibliografía 8 no de patente: J Immunol, 164, 1925 (2000)

Bibliografía 9 no de patente: J Immunol, 145, 2839 (1990)

30

Bibliografía 10 No de patente: Clinical Immunology, 119, 38 (2006)

Bibliografía 11 no de patente: J. Immunol., 174, 5706(2005)

35

Bibliografía 12 no de patente: Journal of Immunotherapy, 30, 190 (2007)

Sumario de la invención

Problema técnico

40

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que se une a una región extracelular de CD4 con afinidad elevada, y que también muestra una actividad ADCC o actividad CDC elevada; un ADN que codifica el anticuerpo; un vector que contiene el ADN; un transformante obtenible introduciendo el vector; un procedimiento para producir un anticuerpo utilizando el transformante; y la utilización del anticuerpo para la fabricación de un agente terapéutico o un agente diagnóstico.

45

Solución al problema

La presente invención se refiere a los siguientes (1) a (11):

50

- (1) Un anticuerpo monoclonal frente a CD4 humana, anticuerpo el cual tiene una constante de disociación (en adelante denominada " K_D ") menor que 1×10^{-9} M, se une a una región extracelular de CD4 humana, y es:

55

- (i) un anticuerpo híbrido humano recombinante en el que la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12 pero excluyendo la secuencia señal secretora de aminoácidos 1 a 19 en SEC ID NO: 12, y la región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 22 pero excluyendo la secuencia señal secretora de aminoácidos 1 a 20 en SEC ID NO: 22; o

(ii) un anticuerpo humanizado recombinante en el que:

(a) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 96, y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 78;

(b) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 98, y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 78;

(c) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 77, y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 78;

(d) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 100, y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 78; o

(e) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 100, y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 102.

(2) El anticuerpo monoclonal según (1), en el que la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 96, y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 78.

(3) El anticuerpo monoclonal según (1) o (2), que se une a CD4 con una K_D menor que 7×10^{-10} M.

(4) El anticuerpo monoclonal según (1) o (2), que se une a CD4 con una K_D menor que 2×10^{-10} M.

(5) El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de (1) a (4), en el que el anticuerpo tiene una actividad CDC sobre una estirpe celular de cáncer humano que expresa CD4 humana.

(6) Un ADN que codifica el anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (5).

(7) Un vector recombinante que comprende el ADN según (6).

(8) Un transformante obtenible al introducir el vector recombinante según (7) en una célula hospedante.

(9) Un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de (1) a (5), que comprende cultivar el transformante definido en (8) en un medio para producir y acumular el anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (5) en el cultivo, y recoger el anticuerpo del mismo desde el cultivo.

(10) Utilización del anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (5) para la fabricación de un agente de diagnóstico o agente terapéutico para un cáncer positivo para CD4 humana.

(11) Un anticuerpo según uno cualquiera de (1) a (5) para la utilización para tratar cáncer positivo para CD4; detectar o medir inmunitariamente CD4 *in vivo*; o diagnosticar cáncer positivo para CD4 *in vivo*.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención puede proporcionar un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente una región extracelular de CD4 humana y se une a la región extracelular con una afinidad elevada, y también muestra una actividad ADCC elevada o una actividad CDC elevada; un ADN que codifica el anticuerpo; un vector que comprende el ADN; un transformante obtenible al introducir el vector; un procedimiento para producir un anticuerpo usando el transformante; y la utilización del anticuerpo para la fabricación de un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un procedimiento de construcción de un vector de expresión de CD4.

La figura 2 representa un procedimiento de construcción de un vector de expresión de CD4-Fc.

La figura 3 representa la reactividad de un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 y un anticuerpo de ratón anti-CD4 OKT4 para la estirpe celular de linfoma de células T humano HPB-ALL en el análisis de FCM. La gráfica se divide en (A) a (D) según la subclase de los anticuerpos. La abscisa representa una concentración de cada uno de los anticuerpos, y la ordenada representa el valor de la intensidad de fluorescencia media, MFI. (A) ● representa un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065, y X representa un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4069. (B) X representa un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4068. (C) ■ representa un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4066, y □ representa un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4067. (D) ● representa un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 OKT4.

La figura 4 representa citotoxicidad celular dependiente del complemento (actividad CDC) de un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 OKT4 sobre un transfectante que expresa CD4. La ordenada representa una tasa de citotoxicidad celular (%), y la abscisa representa una concentración de anticuerpo de un anticuerpo monoclonal anti-CD4. ● representa un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4066, ■ representa un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4067, - representa un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4068, y ◆ representa un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 OKT4.

La figura 5 representa un procedimiento de clonación de un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4.

La figura 6 representa un procedimiento de construcción de un vector de expresión de anticuerpo híbrido anti-CD4.

La figura 7 representa un procedimiento de construcción de vectores de expresión de anticuerpos humanos anti-CD4 6G5-1 y 6G5-113F.

La figura 8 representa la reactividad de diversos anticuerpos anti-CD4 en el ELISA de unión. La abscisa representa una concentración de cada uno de los anticuerpos, y la ordenada representa una actividad de unión de cada uno de los anticuerpos. Se muestra la reactividad de cada anticuerpo frente a CD4 humana recombinante. Δ en la línea discontinua representa un anticuerpo monoclonal 6G5-1, Δ en la línea continua representa un anticuerpo humano anti-CD4 6G5-P, ▲ representa un anticuerpo humano anti-CD4 6G5-113F, ● representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4045, ■ representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4046, □ representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4047, X en la línea discontinua representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4048, y X en la línea continua representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4049.

La figura 9 representa citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC) de diversos anticuerpos anti-CD4 sobre diversas estirpes de células T humanas. La ordenada representa una tasa de citotoxicidad celular (%), y la abscisa representa una concentración de anticuerpo de cada anticuerpo. Δ en la línea discontinua representa un anticuerpo monoclonal 6G5-1, Δ en la línea continua representa un anticuerpo monoclonal 6G5-P, ▲ representa un anticuerpo híbrido 6G5-113F, ● representa un anticuerpo híbrido KM4045, ■ representa un anticuerpo híbrido KM4046, □ representa un anticuerpo híbrido KM4047, X en la línea discontinua representa un anticuerpo híbrido KM4048, y X en la línea continua representa un anticuerpo híbrido KM4049. (A) muestra una actividad ADCC cuando se usó HPB-ALL como célula diana. (B) muestra una actividad ADCC cuando HUT78 se usó como célula diana. (C) muestra una actividad ADCC cuando se usó SUP-T1 como célula diana. (D) muestra una actividad ADCC cuando se usó HPB-ALL como célula diana.

La figura 10 representa citotoxicidad celular dependiente del complemento (actividad CDC) de diversos anticuerpos anti-CD4 sobre un transfectante que expresa CD4 o una estirpe celular de linfoma humano. La ordenada representa una tasa de citotoxicidad celular (%), y la abscisa representa una concentración de anticuerpo de cada anticuerpo. (A) muestra una actividad CDC sobre un transfectante que expresa CD4. (B) muestra una actividad CDC sobre la estirpe celular de linfoma humano HPB-ALL. ◆ en la línea discontinua representa un anticuerpo humano anti-CD4 6G5-1, ◆ en la línea continua representa un anticuerpo humano anti-CD4 6G5-113F, ▲ representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4045, ● representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4046, ■ representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4047, - representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4048, ■ representa un anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4049, y ■ en la línea discontinua representa un anticuerpo de ratón anti-CD4 OKT4.

La figura 11 representa la reactividad de diversos anticuerpos anti-CD4 para una estirpe celular de linfoma de células T HPB-ALL positiva para CD4 en el uso de un citómetro de flujo. La abscisa representa una concentración de anticuerpo (μg/ml), y la ordenada representa un valor de intensidad de fluorescencia media, MFI. ● representa un anticuerpo híbrido KM4045, □ representa un anticuerpo humanizado HVOLV0, ○ representa un anticuerpo humanizado HV2LV0, ◇ representa un anticuerpo humanizado HV3LV0, - representa un anticuerpo humanizado HV4LV0, X representa un anticuerpo humanizado HV4LV6, Δ en la línea discontinua representa un anticuerpo humano 6G5-1, y Δ en la línea continua representa un anticuerpo humano 6G5-P.

La figura 12 representa una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC) de diversos anticuerpos anti-CD4 sobre diversas estirpes de linfoma de células T humano. La ordenada representa una tasa de citotoxicidad celular (%), y la abscisa representa una concentración de anticuerpo (ng/ml). ● representa un anticuerpo híbrido KM4045, ○ representa un anticuerpo humanizado KM8045, ▲ en la línea discontinua representa un anticuerpo humano 6G5-1, y ▲ en la línea continua representa un anticuerpo humano 6G5-P. (A) muestra una actividad ADCC cuando se usó HPB-ALL como célula diana. (B) muestra una actividad ADCC cuando se usó HUT78 como célula diana. (C) muestra una actividad ADCC cuando se usó CCRF-CEM como célula diana.

La figura 13 representa el efecto antitumoral (modelo de cáncer de etapa temprana) de cada anticuerpo de la estirpe celular de linfoma de células T humano HH que se trasplantó en un ratón SCID. La abscisa representa el número de días después del trasplante del tumor, y la ordenada representa un volumen tumoral. X representa un grupo de control negativo, ▲ representa un grupo al que se le administró KM8045, y ● representa un grupo al que se le

administró 6G5-P. La barra representa una desviación estándar.

La figura 14 representa efectos antitumorales (modelo de metástasis) de anticuerpos individuales sobre células CD4/EL4 que se trasplantaron a un ratón C57BL/6. En (A), la ordenada representa una relación de peso del hígado. (B) la ordenada representa una relación de peso de riñón. La barra representa una desviación estándar.

La figura 15 representa efectos antitumorales (modelo de cáncer progresivo) de cada anticuerpo sobre una estirpe celular HH que se trasplantó en un ratón SCID. La abscisa representa el número de días después del trasplante del tumor, y la ordenada representa un volumen tumoral. X representa un grupo de control negativo, ▲ representa un grupo al que se administró 20 µg/cabeza de KM8045, ● representa un grupo al que se administró 100 µg/cabeza de KM8045, y □ representa un grupo al que se administró 200 µg/cabeza de KM8045. La barra representa una desviación estándar.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une con afinidad elevada a una región extracelular de CD4 y en consecuencia tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos elevada (en adelante denominada "actividad ADCC").

El CD4 incluye un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807; un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más restos de aminoácidos están suprimidos, sustituidos o añadidos a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807, y que tiene la actividad de CD4; un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de homología, preferentemente al menos 80% de homología, más preferentemente al menos 90% de homología, y muy preferentemente al menos 95% de homología, con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807, y que tiene la actividad de CD4; y similares.

El polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más restos de aminoácidos están suprimidos, sustituidos y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807 se puede obtener, por ejemplo, introduciendo una mutación específica del sitio en ADN que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 mediante mutagénesis específica del sitio [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997), Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985), o Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] o similar. El número de restos de aminoácidos que se suprimen, sustituyen o añaden no está particularmente limitado, y el número es preferentemente 1 a docenas, tal como 1 a 20, y más preferentemente 1 a varios, tal como 1 a 5.

Como gen que codifica CD4, se puede ejemplificar la secuencia nucleotídica representada por SEC ID NO: 2 o el N° de Acceso de EMBL M12807. El gen que codifica CD4 también incluye un gen que contiene un ADN que comprende una secuencia nucleotídica que tiene una supresión o supresiones, una sustitución o sustituciones o una adición o adiciones de uno o más nucleótidos en la secuencia nucleotídica representada por SEC ID NO: 2 o el N° de Acceso de EMBL M12807, y que codifica también un polipéptido que tiene la función de CD4; un gen que contiene un ADN que consiste en una secuencia nucleotídica que tiene al menos 60% o más de homología, preferentemente 80% o más de homología, y más preferentemente 95% o más de homología, con la secuencia nucleotídica representada por SEC ID NO: 2 o el N° de Acceso de EMBL M12807, y que también codifica un polipéptido que tiene la función de CD4; un gen que consiste en un ADN que se hibrida con un ADN que tiene la secuencia nucleotídica representada por SEC ID NO: 2 o el N° de Acceso de EMBL M12807 en condiciones restrictivas y que también contiene un ADN que codifica un polipéptido que tiene la función de CD4; y similares.

El ADN que se hibrida en condiciones restrictivas se refiere a un ADN que se obtiene mediante hibridación en colonias, hibridación en placa, hibridación de transferencia Southern, micromatriz de ADN, o similar, usando como sonda un ADN que tiene la secuencia nucleotídica representada por SEC ID NO: 2 o el N° de Acceso de EMBL M12807. Un ejemplo específico de tal ADN es un ADN derivado de la hibridación en colonias o en placa que se puede identificar llevando a cabo la hibridación [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997); DNA Cloning 1: Core Technique, A Practical Approach, Segunda Edición, Oxford University (1995)] a 65°C en presencia de 0,7 a 1,0 moles/l de cloruro de sodio usando un filtro o portaobjetos de vidrio con el producto de la PCR u oligo ADN que lo tiene inmovilizado sobre él, y lavando entonces el filtro o portaobjetos de vidrio a 65°C con una disolución de SSC de concentración 0,1 a 2 veces (disolución de SSC de concentración 1 vez: 150 mmoles/l de cloruro de sodio y 15 mmoles/l de citrato de sodio). Específicamente, el ADN capaz de hibridarse incluye ADN que tiene al menos 60% o más de homología, preferentemente 80% o más de homología, más preferentemente 90% o más de homología, y lo más preferible 95% o más de homología con la secuencia nucleotídica representada por SEC ID NO: 2 o el N° de Acceso de EMBL M12807.

En la secuencia nucleotídica del gen que codifica una proteína de un eucariota, a menudo se reconoce el polimorfismo genético. El gen de CD4 también incluye un gen en el que se genera una pequeña modificación en la

secuencia nucleotídica mediante tal polimorfismo.

El número de la homología puede ser un número calculado usando un programa de búsqueda de homología conocido por la experto en la materia, excepto que se indique de otro modo. Con respecto a la secuencia nucleotídica, el número se puede calcular usando BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] con un parámetro por defecto o similar, y con respecto a la secuencia de aminoácidos, el número se puede calcular usando BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997); Genome Res., 7, 649 (1997), con un parámetro por defecto; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>] o similar.

Como parámetro por defecto, G (Coste por espacio vacío abierto) es 5 para la secuencia nucleotídica y 11 para la secuencia de aminoácidos; -E (Coste de espacio vacío extendido) es 2 para la secuencia nucleotídica y 1 para la secuencia de aminoácidos; -q (Penalización para error de apareamiento de nucleótidos) es -3; -r (recompensa para apareamiento de nucleótidos) es 1; -3 (valor esperado) es 10; -W (tamaño de palabra) es 11 restos para la secuencia nucleotídica y 3 restos para la secuencia de aminoácidos; -y [caída (X) para extensiones de blast en bits] es 20 para blastn y 7 para un programa distinto de blastn; -X (valor de caída X para el alineamiento con espacios vacíos en bits) es 15; y -Z (valor de caída X final para el alineamiento con espacios vacíos en bits) es 50 para blastn y 25 para un programa distinto de blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>).

El polipéptido que comprende una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807 se puede preparar según un método conocido por la experto en la materia. Por ejemplo, se puede preparar suprimiendo una parte del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 2 y cultivando un transformante en el que se introduce un vector de expresión que contiene el ADN. También, en base al polipéptido o ADN preparado usando el método anterior, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos o añadidos en una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807 se puede preparar de la misma manera como se describe anteriormente. Además, el polipéptido que comprende una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están suprimidos, sustituidos o añadidos en una secuencia parcial de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807, se puede producir mediante un método de síntesis química tal como el método de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) o el método de t-butiloxicarbonilo (tBoc).

En la presente invención, la región extracelular de CD4 incluye, por ejemplo, regiones predichas a partir de la secuencia de aminoácidos del polipéptido representado por SEC ID NO: 1 usando un programa de deducción de la región transmembránica generalmente conocida SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/SOSUI/SOSUI_submit.), TMHMM ver. 2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), ExPASy Proteomics Server (<http://Ca.expasy.org/>), o similar. Los ejemplos de la región extracelular de CD4 en la presente invención incluyen regiones que corresponden al término N hasta la posición 394 en el dominio extracelular predicho por SOSUI. La región extracelular comprende dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas (D1 a D4), y cada dominio está comprendido en el dominio extracelular predicho.

La región extracelular de CD4 en la presente invención puede tener cualquier estructura, en tanto que tenga una estructura equivalente a una estructura que se pueda tomar en un estado nativo por la región extracelular de CD4 que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 1 o el N° de Acceso de EMBL M12807. La expresión "estructura que se puede tomar en el estado nativo por la región extracelular de CD4" se refiere a una estructura (conformacional) tridimensional nativa de CD4 que se expresa en una membrana celular.

La función de CD4 en la presente invención significa que CD4 induce la activación o diferenciación de células T al actuar como un cofactor de un receptor de células T cuando CD4 se une a un complejo de MHC clase II-antígeno que se expresa en una célula presentadora de antígenos, a través del receptor de células T que se expresa en las células T. Además, los ejemplos de la función de CD4 incluyen su participación en la infección de células T con HIV de una forma tal que CD4 expresada sobre una membrana celular de células T se une a gp120, que es una de las proteínas de cubierta de un virus de inmunodeficiencia humana (HIV).

La unión del anticuerpo de la presente invención a la región extracelular de CD4 se puede confirmar mediante un método en el que se puede examinar la capacidad de unión de una célula que expresa un antígeno específico y un anticuerpo para el antígeno específico, por ejemplo mediante un radioinmunoensayo usando un método de sándwich en fase sólida o similar, o un método de detección inmunológica convencionalmente conocido para una célula que expresa CD4 usando un método de inmunoensayo enzimático (ELISA), preferentemente un método de tinción celular fluorescente o similar. Los ejemplos incluyen un método de tinción de anticuerpos fluorescente usando el sistema FMAT8100HTS (fabricado por Applied Biosystem), [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)], un método de tinción celular fluorescente que usa citometría de flujo, una resonancia de plasmones superficiales que usa el sistema de Biacore (fabricado por GE Healthcare), y similar. Además, también se puede confirmar mediante una combinación de métodos de detección inmunológica convencionalmente conocidos [Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, Tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Monoclonal Antibody Experiment Manual, Kodansha Scientific (1987)], y similares.

Como célula que expresa CD4, se incluyen cualesquiera células en tanto expresen CD4. Los ejemplos incluyen una célula que existe en el cuerpo humano, una estirpe celular que se establece a partir de una célula que existe de forma natural en el cuerpo humano, y una estirpe celular que se produce usando técnicas recombinantes de genes.

5 La célula que está presente de forma natural en el cuerpo humano incluye una célula que expresa CD4 en el cuerpo de un paciente que sufre enfermedad autoinmunitaria, un paciente alérgico y un paciente con cáncer. Los ejemplos incluyen una célula que expresa CD4 entre células tumorales obtenidas mediante biopsia, o similares.

10 La estirpe celular establecida a partir de la célula que está presente de forma natural en el cuerpo humano incluye una estirpe celular que expresa CD4 entre las estirpes celulares obtenidas estableciendo las células descritas anteriormente que expresan CD4 obtenidas a partir de un paciente con cáncer, tal como una estirpe celular de linfoma de células T humano (DSMZ NO: ACC483) o HUT78 (ATCC No: TIB16).

15 Los ejemplos específicos de la célula obtenida usando técnica de recombinación génica incluyen una célula que expresa CD4, que se prepara introduciendo un vector de expresión que comprende ADNc que codifica CD4 en una célula de insecto o en una célula de animal, etc., y similar.

20 Ejemplos del anticuerpo de la presente invención incluyen un anticuerpo monoclonal frente a CD4 humana que tiene una constante de disociación (en adelante denominada " K_D ") menor que 1×10^{-9} M del anticuerpo a CD4, se une a una región extracelular de CD4 humana con afinidad elevada, y tiene actividad ADCC elevada.

25 Además, los ejemplos del anticuerpo de la presente invención incluyen un anticuerpo monoclonal frente a CD4 humana que tiene una constante de disociación " K_D " del anticuerpo de 1×10^{-9} M o menos para el antígeno, y tiene una actividad ADCC elevada y una citotoxicidad celular dependiente del complemento (actividad CDC) elevada. Los ejemplos del anticuerpo de la presente invención también incluyen un anticuerpo que tiene actividad CDC sobre una estirpe celular de cáncer humano que expresa CD4 humana.

30 El anticuerpo monoclonal de la presente invención incluye un anticuerpo recombinante producido mediante un transformante transformado con un vector de expresión que contiene un gen que codifica el anticuerpo.

El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo segregado por una célula productora de anticuerpo de un solo clon, y reconoce solamente un epítipo (también denominado determinante antigénico) y tiene secuencia de aminoácidos uniforme (estructura primaria).

35 En la presente invención, el anticuerpo monoclonal presenta una estructura que comprende un heterotetramero que consiste en dos cadenas H y dos cadenas L. Una cadena H comprende una región variable de la cadena H (en adelante denominada "VH") y una región constante de cadena H (en adelante denominada "CH"); y una cadena L comprende una región variable de cadena L (en adelante denominada "VL") y una región constante de cadena L (en adelante denominada "CL"). Además, CH comprende cuatro dominios: dominio CH1, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3. Además, un dominio que consiste en el dominio CH2 y en el dominio CH3 juntos se define como "región Fc", "dominio Fc" o simplemente "Fc" de un anticuerpo.

40 Los ejemplos del epítipo incluyen una secuencia de un solo aminoácido, una estructura tridimensional formada por una secuencia de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos que tiene una cadena de azúcar unida a ella, una estructura tridimensional formada por una secuencia de aminoácidos que tiene una cadena de azúcar unida a ella, y similar, que un anticuerpo monoclonal reconoce y al que se une. El anticuerpo monoclonal de la presente invención reconoce un epítipo que comprende D3 o D4 de la región extracelular de CD4.

45 En la presente invención, un anticuerpo que se une a CD4 con afinidad elevada es un anticuerpo que tiene suficiente afinidad para un anticuerpo terapéutico, es decir, un anticuerpo que se une a CD4 con un valor de la constante de disociación K_D menor que 1×10^{-9} M, preferentemente menor que 7×10^{-10} M, más preferentemente menor que 2×10^{-10} M, en términos de afinidad. Zanolimumab (6G5), con el cual ya se ha comenzado un ensayo clínico, tiene afinidad con un valor de la constante de disociación K_D de $7,1 \times 10^{-9}$ M, y exhibe efectos terapéuticos elevados. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención puede exhibir efectos terapéuticos elevados.

La afinidad se mide mediante análisis cinético, y se puede medir, por ejemplo, usando un Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences), o similar.

60 En la presente invención, la expresión "disociaciones lentas" significa que un valor de una constante de velocidad de disociación k_d de un anticuerpo, calculado mediante Biacore T100, tiene un valor más pequeño. La menor constante de velocidad de disociación representa que un anticuerpo no se disocia fácilmente de una célula que expresa antígenos. Al incrementar la cantidad de un anticuerpo que se une a la superficie celular para prolongar de ese modo el tiempo de eficacia del anticuerpo, entonces se puede esperar una eficacia médica elevada. Una constante de velocidad de disociación k_d se mide, por ejemplo, usando un Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences), y se puede calcular mediante un software instalado en el aparato, software de evaluación de Biacore

T100 (fabricado por Biacore).

Como se usa en la presente memoria, la expresión “anticuerpo que tiene una actividad ADCC elevada” se refiere a un anticuerpo que tiene una actividad ADCC mayor que los anticuerpos anti-CD4 6G5 y CE9.1, los cuales se ha informado que tienen una actividad ADCC, cuando las actividades ADCC de varios anticuerpos se midieron simultáneamente para células que expresan CD4, usando un método de ensayo conocido [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)].

La expresión “actividad ADCC” significa una actividad que conduce a la citotoxicidad a una célula diana de una manera tal que un anticuerpo unido a un antígeno en la célula diana se une a un receptor Fc de una célula inmune a través de una región Fc del anticuerpo, dando en consecuencia como resultado la activación del sistema inmunitario (célula asesina natural, etc.).

Un receptor Fc (en adelante denominado “FcR”) es un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo y conduce a diversas actividades efectoras mediante la unión al anticuerpo. Un FcR corresponde a una subclase de un anticuerpo, e IgG, IgE, IgA e IgM se unen específicamente a FcγR, FcεR, FcαR y FcμR, respectivamente. Además, un FcγR tiene subtipos de FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), y éstos tienen isoformas de FcγRIA, FcγRIB, FcγRIC, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB, respectivamente. Los diferentes FcγRs diferentes anteriores existen en diferentes células (Annu. Rev. Immunol., 9:457-492 (1991)). En el ser humano, FcγRIIIB se expresa específicamente sobre un neutrófilo, y FcγRIIIA se expresa sobre un monocito, una célula asesina natural (célula NK) y cierta parte de la célula T. La unión de un anticuerpo a través de FcγRIIIA conduce a una actividad ADCC dependiente de las células NK.

En la presente invención, la expresión “anticuerpo que tiene una actividad CDC elevada” se refiere a un anticuerpo que tiene una actividad CDC mayor que los anticuerpos anti-CD4 convencionales, cuando las actividades CDC de varios anticuerpos se miden simultáneamente para células que expresan CD4, usando un complemento humano y un método de ensayo de CDC conocido [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]. Es más preferido un anticuerpo que tiene una actividad CDC mayor que anticuerpos anti-CD4 convencionales, cuando una actividad CDC del anticuerpo se mide de la misma manera que antes para una célula que expresa CD4 que está presente de forma natural en el cuerpo humano o una estirpe celular de cáncer positiva para CD4. Más específicamente, tal anticuerpo es aquel que exhibe una actividad CDC mayor que un anticuerpo anti-CD4 convencional 6G5 u OKT4, en el mismo sistema experimental.

La expresión “actividad CDC” se refiere a una actividad que conduce a la citotoxicidad a una célula diana de una manera tal que un anticuerpo unido a un antígeno en la célula diana activa una serie de cascadas (rutas de activación del complemento) que contienen en la sangre grupos proteicos relacionados con el complemento. Además, fragmentos proteicos generados mediante la activación de un complemento pueden inducir la migración y activación de células inmunitarias.

Los anticuerpos de la presente invención reconocen el dominio D3 o D4, y tienen una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de CDRs 1 a 3 representadas por SEC ID NOs: 27 a 29, respectivamente, y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de CDRs 1 a 3 representadas por SEC ID NOs: 30 a 32, respectivamente.

Además, ejemplos específicos del anticuerpo monoclonal de la presente invención son un anticuerpo monoclonal en el que la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 12 pero excluyendo la secuencia señal secretora de aminoácidos 1 a 19 en SEC ID NO: 12, y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 22 pero excluyendo la secuencia señal secretora de aminoácidos 1 a 20 en SEC ID NO: 22.

Además, un anticuerpo que se une a CD4 tiene actividad inductora de apoptosis.

Los hibridomas se pueden preparar, por ejemplo, preparando la célula anterior que expresa CD4 como antígeno, induciendo una célula productora de anticuerpos que tiene especificidad por el antígeno procedente de un animal inmunizado con el antígeno, y fusionando la célula productora del antígeno con una célula de mieloma. El anticuerpo monoclonal anti-CD4 se puede obtener cultivando el hibridoma o administrando la célula de hibridoma a un animal para producir tumor ascítico en el animal, y separando y purificando el cultivo o la ascitis.

El animal inmunizado con un antígeno puede ser cualquier animal, en tanto que se pueda preparar un hibridoma, y se usa de forma adecuada un ratón, rata, hámster, pollo, conejo o similar.

En la presente invención, el anticuerpo recombinante incluye un anticuerpo producido mediante recombinación génica, y es un anticuerpo híbrido humano o un anticuerpo humanizado (anticuerpo con región determinante de la complementariedad (en adelante denominada CDR) injertada). Entre los anticuerpos recombinantes, como agente terapéutico es preferido aquel que presente caracteres de un anticuerpo monoclonal, baja inmunogenicidad y

semivida prolongada en la sangre. Los ejemplos del anticuerpo recombinante incluyen un anticuerpo en el que el anticuerpo monoclonal anterior de la presente invención se modifica mediante tecnología de recombinación génica.

5 La CH del anticuerpo recombinante de la presente invención es preferentemente de origen humano, e incluye el dominio CH1, el dominio CH2 y el dominio CH3.

La región Fc del anticuerpo recombinante de la presente invención puede incluir una o más modificaciones de aminoácidos, en tanto que tenga actividad de unión a FcγR.

10 El anticuerpo híbrido humano es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada VH y una región variable de cadena ligera VL de un anticuerpo de un animal no humano, y CH y CL de un anticuerpo humano. Específicamente, el anticuerpo híbrido humano de la presente invención se puede producir obteniendo los ADNc que codifican VH y VL de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente CD4 y se une a la región extracelular, insertando cada uno de ellos en un vector de expresión para una célula de animal que
15 comprende los ADN que codifican CH y CL del anticuerpo humano para construir de ese modo un vector de expresión de anticuerpo híbrido humano, e introduciendo después el vector en una célula de animal para expresar el anticuerpo.

20 Como la CH del anticuerpo híbrido humano, se puede usar cualquier CH, en tanto que pertenezca a inmunoglobulina humana (en adelante denominada "hIg"), y se prefieren aquellas que pertenezcan a la clase hIgG, y se puede usar una cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase hIgG, tales como hIgG1, hIgG2, hIgG3 y hIgG4. Como la CL del anticuerpo híbrido humano, se puede usar cualquier CL, en tanto que pertenezca a la clase hIg, y se pueden usar aquellas que pertenezcan a la clase κ o a la clase λ.

25 El anticuerpo híbrido humano de la presente invención es un anticuerpo híbrido humano en el que VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 12 pero excluyendo la secuencia señal secretora de los aminoácidos 1 a 19 en SEC ID NO: 12, y VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 22 pero excluyendo la secuencia señal secretora de los aminoácidos 1 a 20 en SEC ID NO: 22.

30 Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo en el que las secuencias de aminoácidos de CDRs de VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano se injertan en posiciones apropiadas de VH y VL de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado de la presente invención se puede producir construyendo ADNc que codifican una región V en la que las secuencias de aminoácidos de CDRs de VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal
35 no humano producido mediante un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente CD4 y se une a la región extracelular se injertan en la región de estructura (en adelante denominada "FR") de VH y VL de cualquier anticuerpo humano, insertando cada uno de ellos en un vector de expresión de una célula de animal que comprende genes que codifican CH y CL de un anticuerpo humano para construir de ese modo un vector para la expresión de anticuerpo humanizado, e introduciéndolo en una célula de animal para expresar y producir de ese
40 modo el anticuerpo humanizado.

45 Como la CH del anticuerpo humanizado, se puede usar cualquier CH, en tanto que pertenezca a la clase hIg, y se prefieren aquellas de la clase hIgG, y se puede usar una cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase hIgG, tales como hIgG1, hIgG2, hIgG3 y hIgG4. Como la CL del anticuerpo humanizado, se puede usar cualquier CL, en tanto que pertenezca a la clase hIg, y se pueden usar aquellas que pertenezcan a la clase κ o a la clase λ.

En el anticuerpo humanizado de la presente invención, las CDRs 1 a 3 de VH del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOS: 27 a 29, respectivamente, y las CDRs 1 a 3 de VL del anticuerpo comprenden las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOS: 30 a 32, respectivamente.

50 Además, ejemplos específicos del anticuerpo humanizado de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos humanizados:

55 con respecto a la secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo, un anticuerpo humanizado en el que VH del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos en la que Leu en la posición 18, Val en la posición 93, Ala en la posición 97 y Thr en la posición 114 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 77 están sustituidos por otros restos de aminoácidos,

60 preferentemente, un anticuerpo humanizado en el que VH del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos en la que Val en la posición 93, Ala en la posición 97 y Thr en la posición 114 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 77 están sustituidos por otros restos de aminoácidos,

65 preferentemente, un anticuerpo humanizado en el que VH del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos en la que Leu en la posición 18, Ala en la posición 97 y Thr en la posición 114 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 77 están sustituidos por otros restos de aminoácidos,

preferentemente, un anticuerpo humanizado que tiene una secuencia de aminoácidos en la que Ala en la posición 97 y Thr en la posición 114 están sustituidos por otros restos de aminoácidos.

Un ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de VH en la que se introducen cuatro modificaciones es una secuencia de aminoácidos en la que en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 77 se introducen sustituciones de Leu en la posición 18 por Met, Val en la posición 93 por Thr, Ala en la posición 97 por Thr, y Thr en la posición 114 por Ile.

Un ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de VH en la que se introducen tres modificaciones es una secuencia de aminoácidos en la que en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 77 se introducen sustituciones de Val en la posición 93 por Thr, Ala en la posición 97 por Thr, y Thr en la posición 114 por Ile.

Un ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de VH en la que se introducen dos modificaciones es una secuencia de aminoácidos en la que en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 77 se introducen sustituciones de Ala en la posición 97 por Thr, y Thr en la posición 114 por Ile.

Con respecto a VL del anticuerpo, los ejemplos incluyen una secuencia de aminoácidos en la que Ala en la posición 13, Val en la posición 15, Val en la posición 19, Ala en la posición 47, Val en la posición 62, y Leu en la posición 82 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 78 están sustituidos por otros restos de aminoácidos.

Un ejemplo específico de la secuencia de aminoácidos de VL en la que se introducen seis modificaciones es una secuencia de aminoácidos en la que en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 78 se introducen sustituciones de Ala en la posición 13 por Val, Val en la posición 15 por Leu, Val en la posición 19 por Ala, Ala en la posición 47 por Gln, Val en la posición 62 por Ile, y Leu en la posición 82 por Val.

Los anticuerpos humanizados de la presente invención son anticuerpos humanizados en los que VH comprende la secuencia de aminoácidos representada por aquella seleccionada de SEC ID NOs: 77, 96, 98 y 100, y VL comprende la secuencia de aminoácidos representada por aquella seleccionada de SEC ID NOs: 78 y 102.

Además, los anticuerpos humanizados de la presente invención son: un anticuerpo humanizado en el que la cadena H de la región variable comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 77 y la cadena L de la región variable comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 78; un anticuerpo humanizado en el que VH comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 96 y VL comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 78; un anticuerpo humanizado en el que VH comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 98 y VL comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 78; un anticuerpo humanizado en el que VH comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 100 y VL comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 78; un anticuerpo humanizado en el que VH comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 100 y VL comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No: 102.

En la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal, se pueden suprimir, sustituir, insertar o añadir uno o más aminoácidos, mientras se retiene actividad similar al anticuerpo.

El número de aminoácidos que se suprime, sustituye, inserta y/o añade es uno o más, y no está limitado específicamente, pero está en el intervalo en el que sea posible la supresión, sustitución o adición por métodos conocidos tales como la mutagénesis dirigida al sitio [Molecular Cloning 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997), Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985), Pro. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)] o similar. Por ejemplo, el número es 1 a docenas, preferentemente 1 a 20, más preferentemente 1 a 10, y lo más preferible 1 a 5.

La expresión "se suprimen, sustituyen, insertan o añaden uno o más aminoácidos", en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anterior, significa lo siguiente. Es decir, significa que existe una supresión, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en posiciones opcionales en la misma secuencia y una o más secuencias de aminoácidos. También, la supresión, sustitución, inserción o adición puede ocurrir al mismo tiempo, y al aminoácido que se sustituye, inserta o añade puede ser de tipo natural o de tipo no natural. El aminoácido de tipo natural incluye L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, L-cisteína y similares.

A continuación se muestran ejemplos preferidos de aminoácidos mutuamente sustituibles. Los aminoácidos en el mismo grupo son mutuamente sustituibles.

Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, O-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina, ciclohexilalanina

Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido 2-aminosubérico

Grupo C: asparagina, glutamina

Grupo D: lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico

Grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina

Grupo F: serina, treonina, homoserina

Grupo G: fenilalanina, tirosina

El anticuerpo monoclonal de la presente invención que reconoce específicamente una estructura tridimensional de una región extracelular de CD4 y se une a la región extracelular puede estar unido química o genéticamente a un radioisótopo, un agente que tiene un peso molecular bajo, un agente que tiene un peso molecular elevado, una proteína, un anticuerpo terapéutico, o similar.

El conjugado del anticuerpo se puede producir conjugando químicamente un radioisótopo, un agente que tiene un peso molecular bajo, un agente que tiene un peso molecular elevado, una proteína, un anticuerpo terapéutico, o similar, al lado N-terminal o al lado C-terminal de una cadena H o una cadena L del anticuerpo monoclonal, un sustituyente o cadena lateral apropiado del anticuerpo, una cadena de azúcar en el anticuerpo, que reconoce específicamente una estructura tridimensional de una región extracelular de CD4 y se une a la región extracelular [Antibody Engineering Handbook, publicado por Chijin Shokan (1994)].

También, el conjugado del anticuerpo se puede producir genéticamente enlazando ADN, que codifica el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la estructura tridimensional de una región extracelular de CD4 y se une a la región extracelular en la presente invención, a otro ADN que codifica una proteína o un anticuerpo terapéutico a conjugar, insertando el ADN en un vector para la expresión, e introduciendo el vector de expresión en una célula hospedante apropiada.

Los radioisótopos incluyen ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu , ^{211}At y similares. El radioisótopo se puede conjugar directamente con el anticuerpo mediante el método de Cloramina-T. También, una sustancia quelante del radioisótopo se puede conjugar con el anticuerpo. El agente quelante incluye ácido 1-isotiocianato bencil-3-metildietilen-triaminopentaacético (MX-DTPA) y similar.

El agente que tiene un peso molecular bajo incluye un agente antitumoral tal como un agente alquilante, un agente de nitrosourea, un antagonista del metabolismo, una sustancia antibiótica, un alcaloide derivado de una planta, un inhibidor de topoisomerasa, un agente para hormonoterapia, un antagonista hormonal, un inhibidor de aromatasas, un inhibidor de glicoproteína P, un derivado de complejo de platino, un inhibidor de la fase M y un inhibidor de cinasas [Rinsho Syuyo-gaku (Clinical Oncology), Gan to Kagaguryoho-Sha (1996)], un agente esteroide tal como hidrocortisona y prednisona, un agente no esteroideo tal como aspirina e indometacina, un agente inmunorregulador tal como aurotiomalato, penicilamina, un agente inmunosupresor tal como ciclofosfamida y azotioprina, un agente antiinflamatorio tal como un agente antihistamínico, por ejemplo maleato de clorfeniramina y clemastina [Ensho to Koatensho-Ryoho (Inflammation and Anti-inflammation Therapy), Ishiyaku Shuppan (1982)] y similares. Ejemplos del agente antitumoral incluyen amifostina (Ethyol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), epirubicina, gemcitabina (Gemsal), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, daunomicina, peplomycin, estramustina, paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotex), aldesleukina, asparaginasa, busulfano, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, hidroxiurea, ifosfamida, idarubicina, mesna, irinotecán (CPT-11), nogitecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalano, mercaptopurina, hidroxycarbamida, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, estreptozocina, tamoxifeno, goserelina, leuprorrelina, flutamida, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, vindesina, nimustina, semustina, capecitabina, Tomudex, azacitidina, UFT, oxaliplatino, gefitinib (Iressa), imatinib (STI 571), elrotinib, inhibidor de tirosina cinasa 3 similar a FMS (Flt3), inhibidor del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), inhibidor del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tal como Iressa y Tarceva, radicicol, 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina, rapamicina, amsacrina, ácido todo-trans-retinoico, talidomida, anastrozol, fadrozol, letrozol, exemestano, tiomalato de oro, D-penicilamina, bucilamina, azatioprina, mizorribina, ciclosporina, rapamicina, hidrocortisona, bexaroteno (Targretin), tamoxifeno, dexametasona, sustancias progestágenas, sustancias estrogénicas, anastrozol (Arimidex), Leuplin, aspirina, indometacina, celecoxib, azatioprina, penicilamina, tiomalato de oro, maleato de clorfeniramina, clorfeniramina, clemastina, tretinoína, bexaroteno, arsénico, voltezosomib, alopurinol, caliqueamicina, ibritumomab tiuxetano, Targretin, ozogamicina, claritromicina, leucovorina, ifosfamida, ketoconazol, aminoglutetimida, suramina, metotrexato, maitansinoide y sus derivados.

El método para conjugar el agente que tiene un peso molecular bajo con el anticuerpo incluye un método en el que el agente y un grupo amino del anticuerpo se conjugan a través de glutaraldehído, un método en el que un grupo amino del agente y un grupo carboxilo del anticuerpo se conjugan a través de carbodimida soluble en agua, y similar.

El agente que presenta un peso molecular elevado incluye polietilenglicol (en adelante denominado "PEG"), albúmina, dextrano, polioxietileno, copolímero de estireno-ácido maleico, polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, hidroxipropilmetacrilamida, y similar. Al unir estos compuestos que tienen un peso molecular elevado a un anticuerpo, se esperan los siguientes efectos: (1) mejora de la estabilidad frente a diversos factores químicos, físicos o biológicos, (2) prolongación notable de la semivida en sangre, (3) desaparición de la inmunogenicidad, supresión de la producción de anticuerpos, y similares [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten (1993)]. Por ejemplo, el método para unir PEG a un anticuerpo incluye un método en el que se permite que un anticuerpo reaccione con un reactivo modificador de PEG [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten (1993)]. El reactivo modificador de PEG incluye un agente modificador del grupo ϵ -amino de lisina (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 178926/86), un agente modificador de un grupo carboxilo de ácido aspártico y ácido glutámico (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 23587/81), un agente modificador de un grupo guanidino de arginina (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 117920/90) y similar.

El inmunoestimulador puede ser cualquier producto natural conocido como inmunoadyuvantes. Los ejemplos de un agente que potencia el inmunógeno incluyen $\beta(1\rightarrow3)$ glucano (lentinano, esquizofilano), α -galactosilceramida, y similar.

La proteína incluye una citocina o un factor de crecimiento que activa una célula inmunocompetente, tal como célula NK, macrófago o neutrófilo, y una proteína tóxica, y similar.

Los ejemplos de la citocina o del factor de crecimiento incluyen interferón (en adelante denominado "INF")- α , INF- β , INF- γ , interleucina (en adelante denominada "IL")-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y similar. La proteína tóxica incluye ricina, toxina de la difteria, ONTAK, y similar, y también incluye una proteína tóxica en la que se introduce una mutación en una proteína a fin de controlar la toxicidad.

El anticuerpo terapéutico incluye un anticuerpo contra un antígeno en el que se induce apoptosis mediante la unión del anticuerpo, un anticuerpo contra un antígeno que participa en la información del estado patológico del tumor, un anticuerpo que regula la función inmunitaria, y un anticuerpo relacionado con la angiogénesis en la parte patológica.

El antígeno en el que se induce apoptosis mediante la unión del anticuerpo incluye el cúmulo de diferenciación (en adelante en la presente memoria "CD") 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80 (B7.1), CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86 (B7.2), antígeno leucocitario humano (HLA)-Clase II, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y similar.

El antígeno para el anticuerpo que regula la función inmunológica incluye CD40, ligando de CD40, molécula de la familia de B7 (CD80, CD86, CD274, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H4), ligando de la molécula de la familia de B7 (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, BTLA), OX-40, ligando de OX-40, CD137, molécula de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (DR4, DR5, TNFR1, TNFR2), molécula de la familia de receptores del ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF TRAIL familia de receptores de la molécula de la familia de TRAIL (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4), activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa B (RANK), ligando de RANK, CD25, receptor 4 de ácido fólico, citocina [IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante (TGF) β , TNF α , etc.], receptores de estas citocinas, quimiocina (SLC, ELC, I-309, TARC, MDC, CTACK, etc.) y receptores de estas quimiocinas.

El antígeno para el anticuerpo que inhibe la angiogénesis en la parte patológica incluye factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), EGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), eritropoyetina (EPO), TGF β , IL-8, efilina, SDF-1, sus receptores, y similares.

Un anticuerpo de fusión con una proteína o anticuerpo terapéutico se puede producir enlazando un ADNc que codifica un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo a un ADNc que codifica la proteína, construyendo el ADN que codifica el anticuerpo de fusión, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota o eucariota, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el anticuerpo de fusión.

En el caso en el que se use el conjugado del anticuerpo anterior para un método de detección, un método para la determinación cuantitativa, un reactivo de detección, un reactivo para la determinación cuantitativa o un agente de diagnóstico en la presente invención, los ejemplos del agente al que está unido un anticuerpo monoclonal de la

presente invención que reconoce específicamente una región extracelular de CD4 y se une a la región extracelular incluye un marcador usado en un método habitual de detección o medida inmunitario. El marcador incluye enzimas tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa y luciferasa, materiales luminiscentes tales como éster de acridinio y lofina, materiales fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de tetrametilrodamina (RITC), y similares.

Además, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal de la invención en la fabricación de un agente terapéutico para una enfermedad relacionada con una célula positiva para CD4, agente el cual comprende como principio activo un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente una región extracelular de CD4 y también se une a la región extracelular.

La enfermedad asociada a una célula positiva para CD4 puede ser cualquier enfermedad en tanto que sea un cáncer relacionado con una célula que expresa CD4.

Los ejemplos de una célula positiva para CD4 incluyen una célula T positiva para CD4 tal como una célula Th1, célula Th2, o célula Th17, una célula T reguladora (también denominada "célula T reguladora"), una célula $\gamma\delta$ T, y similar. Además, un ejemplo de una célula positiva para CD4 que está relacionada con una enfermedad es un célula cancerosa que se basa en el hecho de que CD4 es expresada en una célula anormal responsable de tal enfermedad.

El cáncer incluye cáncer de la sangre, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer rectal, cáncer de tiroide, cáncer de cuello uterino, cáncer de intestino delgado, cáncer de próstata y cáncer pancreático. Los ejemplos preferidos del cáncer incluyen cáncer de la sangre, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer hepático y cáncer de próstata. Los ejemplos de cáncer de la sangre incluyen linfoma cutáneo de células T (CTCL), linfoma periférico de células T (PTCL), linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), otra leucemia linfoide, leucemia mieloide, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin.

El agente terapéutico en la presente invención es un agente terapéutico que comprende como principio activo el anticuerpo monoclonal anterior de la presente invención.

El agente terapéutico que comprende el anticuerpo de la presente invención, o un conjugado del mismo, puede comprender solamente el anticuerpo, o conjugado del mismo, como principio activo. Generalmente se prefiere que el agente terapéutico se prepare como una preparación farmacéutica producida mediante un método apropiado bien conocido en el campo técnico de la farmacia, y mezclándolo con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Se prefiere administrar el agente terapéutico mediante la vía que sea más eficaz para el tratamiento. Los ejemplos incluyen la administración oral y administración parenteral, tal como la administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa, y se prefiere la administración intravenosa.

El agente terapéutico puede estar en forma de pulverización, cápsulas, comprimidos, gránulos, polvo, jarabe, emulsión, supositorio, inyección, ungüento, cinta, y similar.

Aunque la dosis o la frecuencia de administración varía dependiendo del efecto terapéutico objetivo, del método de administración, del período de tratamiento, de la edad, del peso corporal y similar, habitualmente es 10 μ g/kg a 10 mg/kg por día y por adulto.

Además, la presente invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en un método para detectar inmunológicamente o medir CD4 *in vivo*, o diagnosticar cáncer positivo para CD4 *in vivo*.

Como método para la detección o determinación de la cantidad de CD4 en la presente invención, se puede incluir cualquier método conocido. Por ejemplo, se puede ejemplificar un método de detección o medida inmunitario.

Un método de detección o medida inmunitario es un método en el que se detecta o determina una cantidad de anticuerpo o una cantidad de antígeno usando un antígeno o anticuerpo marcado. Los ejemplos del método de detección o medida inmunitario son método de inmunoanticuerpo marcado con sustancia radiactiva (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA), inmunoensayo fluorescente (FIA), inmunoensayo luminiscente, método de transferencia Western, medios físico-químicos, y similares.

El cáncer anterior relacionado con CD4 se puede diagnosticar detectando o midiendo una célula que expresa CD4 usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

Para la detección de la célula que expresa CD4, se pueden usar métodos de detección inmunológica conocidos, y se usa preferentemente un método de inmunoprecipitación, un método de tinción celular fluorescente, un método de tinción tisular inmune, y similar. Además, se puede usar un método de tinción con anticuerpo fluorescente que usa el

sistema FMAT 8100 HTS (Applied Biosystem) y similar.

En la presente invención, la muestra de organismo vivo a usar para detectar o medir CD4 no está particularmente limitada, en tanto que tenga la posibilidad de contener el polipéptido, tal como células tisulares, sangre, plasma sanguíneo, suero, fluido pancreático, orina, materia fecal, fluido tisular o fluido de cultivo.

El agente de diagnóstico que contiene el anticuerpo monoclonal o su conjugado puede contener además un reactivo para llevar a cabo una reacción de antígeno-anticuerpo, o un reactivo para la detección de la reacción, dependiendo del método de diagnóstico deseado. El reactivo para llevar a cabo la reacción de antígeno-anticuerpo incluye un amortiguador, una sal, y similar. La reacción para la detección incluye un reactivo usado generalmente para el método de detección o medida inmunológico, tal como anticuerpo secundario marcado que reconoce al anticuerpo monoclonal, o conjugado del mismo, y sustrato correspondiente al marcado.

Se describe a continuación específicamente un procedimiento para producir el anticuerpo de la presente invención, un método para tratar la enfermedad y un método para diagnosticar la enfermedad.

1. Método de preparación de anticuerpo monoclonal

(1) Preparación de antígeno

El CD4 o una célula que expresa CD4 como antígeno se puede obtener introduciendo un vector de expresión que comprende ADNc que codifica una longitud completa de CD4 o una longitud parcial de la misma en *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de animal, o similar. Además, CD4 se puede purificar de diversas estirpes celulares de tumor humano, tejido humano que expresa una gran cantidad de CD4. Se puede permitir el uso de la estirpe celular de tumor y el tejido como antígenos. Además, un péptido sintético que tiene una secuencia parcial de la CD4 se puede preparar mediante un método de síntesis química tal como método de Fmoc o método de tBoc, y se puede usar como un antígeno.

El CD4 usado en la presente invención se puede producir, por ejemplo, expresando un ADN que codifica CD4 en una célula hospedante usando un método descrito en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997), o similares, según el siguiente método.

En primer lugar, un vector recombinante se prepara insertando un ADNc de longitud completa que comprende la región codificante de CD4 en dirección 3' de un promotor de un vector de expresión apropiado. En este momento, si es necesario, se puede usar un fragmento de ADN que tiene una longitud apropiada que contiene una región que codifica el polipéptido basado en el ADNc de longitud completa, y se puede usar el fragmento de ADN en lugar del ADNc de longitud completa anterior. A continuación, se puede obtener un transformante que produce CD4 introduciendo el vector recombinante en una célula hospedante adecuada para el vector de expresión.

El vector de expresión incluye vectores que se pueden replicar de forma autónoma en la célula hospedante a usar, o vectores que se pueden integrar en un cromosoma que comprende un promotor apropiado en una posición tal que se puede transcribir el ADN que codifica el polipéptido.

La célula hospedante puede ser una cualquiera, en tanto que pueda expresar el gen objetivo. Los ejemplos incluyen un microorganismo que pertenece a los géneros *Escherichia*, tal como *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de animal, y similar.

Cuando se usa un procariota tal como *Escherichia coli* como la célula hospedante, se prefiere que el vector recombinante usado en la presente invención sea replicable de forma autónoma en el procariota, y comprende un promotor, una secuencia de unión al ribosoma, el ADN que comprende la porción que codifica CD4, y una secuencia de terminación de la transcripción. No es necesario que el vector recombinante tenga una secuencia de terminación de la transcripción, pero preferentemente se coloca una secuencia de terminación de la transcripción justo debajo del gen estructural. El vector recombinante puede comprender además un gen que regula el promotor.

También, el vector recombinante anterior es preferentemente un plásmido en el que el espacio entre la secuencia de Shine-Dalgarno (también denominada como secuencia SD), que es la secuencia de unión al ribosoma, y el codón de iniciación se ajusta a una distancia apropiada (por ejemplo, 6 a 18 nucleótidos).

Además, la secuencia nucleotídica del ADN que codifica CD4 se puede sustituir por otra base para que sea un codón adecuado para la expresión en una célula hospedante, mejorando de ese modo la productividad de la CD4 objetivo.

Se puede usar cualquier vector de expresión, en tanto que pueda funcionar en la célula hospedante que se va a utilizar. Los ejemplos del vector de expresión incluyen pBTrp2, pBTac1, pBTac2 (todos fabricados por Roche Diagnostics), pKK233-2 (fabricado por Pharmacia), pSE280 (fabricado por Invitrogen), pGEMEX-1 (fabricado por

Promega), pQE-8 (fabricado por QIAGEN), pKYP10 (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 110600/83), pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)], pLSAI [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)], pGELI [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)], pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene), pTrs30 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs30 (FERM BP-5407)], pTrs32 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs32 (FERM BP-5408)], pGHA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGHA2 (FERM BP-400)], Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 221091/85], pGKA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798)], Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 221091/85], pTerm2 (documentos US4686191, US4939094, US5160735), pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)], pGEX (fabricado por Pharmacia), el sistema pET (fabricado por Novagen), pME18SFL3, y similares.

Se puede usar cualquier promotor, en tanto que pueda funcionar en la célula hospedante que se va a utilizar. Los ejemplos incluyen promotores derivados de *Escherichia coli*, fago, y similar, tal como el promotor trp (Ptrp), promotor lac, promotor PL, promotor PR y promotor T7. También, se pueden usar promotores diseñados y modificados artificialmente, tales como un promotor en el que dos Prtp se enlazan en tándem, promotor tac, promotor lacT7 y promotor letl.

Los ejemplos de la célula hospedante incluyen *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* nº 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Escherichia coli* DH5 α , y similares.

Se puede usar cualquier método de introducción del vector recombinante, en tanto que sea un método para introducir ADN en la célula hospedante, y los ejemplos incluyen un método que usa un ion de calcio [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)], métodos descritos en Gene, 17, 107 (1982) y Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)].

Cuando se usa una célula de animal como la célula hospedante, se puede usar un vector de expresión, en tanto que pueda funcionar en la célula de animal. Los ejemplos incluyen pcDNAI, pcDM8 (fabricado por Funakoshi), pAGE107 [Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 22979/91; Cytotechnology, 3, 133 (1990)], pAS3-3 (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90), pCDM8 [Nature, 329, 840,(1987)], pcDNAI/Amp (fabricado por Invitrogen), pcDNA3.1 (fabricado por Invitrogen), pREP4 (fabricado por Invitrogen), pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)], pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93 (documento WO 97/10354) y similares.

Se puede usar cualquier promotor, en tanto que pueda funcionar en una célula de animal. Los ejemplos incluyen un promotor del gen temprano inmediato (IE) de citomegalovirus (CMV), el promotor temprano de SV40, un promotor de retrovirus, un promotor de metalotioneína, un promotor de choque térmico, promotor de SR α , promotor o potenciador del virus de la leucemia murina de Molony, y similar. También, el potenciador del gen IE de CMV humano se puede usar junto con el promotor.

Los ejemplos de la célula hospedante incluyen la célula Namalwa de célula de leucemia humana, la célula COS de mono, la célula CHO de célula de ovario de hámster chino (Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Apéndice I, II (p. 883-900)), CHO/DG44, CHO-K1 (ATCC CCL-61), DUKXB11 (ATCC CCL-9096), Pro-5 (ATCC CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, nº de Catálogo 11619), la célula Pro-3, YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de mieloma de rata (también conocida como YB2/0), la célula de mieloma de ratón NSO, la célula de mieloma de ratón SP2/0-Agl4, la célula de hámster sirio BHK o HBT5637 (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 000299/88) y similares.

Se puede usar cualquier método de introducción del vector recombinante, en tanto que sea un método para introducir ADN en una célula de animal, y los ejemplos incluyen electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], el método de fosfato de calcio (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90), el método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], y similares.

El CD4 se puede producir cultivando el transformante derivado de un microorganismo, de una célula de animal, o similar que tiene un vector recombinante que comprende el ADN que codifica CD4 en un medio para formar y acumular CD4 en el cultivo, y recuperándolo del cultivo. El método para cultivar el transformante en el medio se lleva a cabo según el método habitual usado en el cultivo de hospedantes.

Cuando CD4 se expresa en una célula derivada de eucariota, se puede obtener CD4 a la que se unen azúcares o cadenas de azúcar.

Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante que contiene un promotor inducible, se puede añadir al medio un inductor, si es necesario. Por ejemplo, se puede añadir al medio isopropil- β -D-thiogalactopiranosido o similar cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante que

usa el promotor *lac*; o se le puede añadir ácido indolacrílico o similar cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante que usa el promotor *trp*.

Cuando se cultiva un transformante obtenido usando como célula hospedante una célula de animal, el medio incluye medio RPMI 1640 usado generalmente [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio MEM de Eagle [Science, 122, 501 (1952)], medio MEM modificado de Dulbecco [Virology, 8, 396 (1959)] y medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), los medios a los que se añade suero fetal de ternera, etc., y similar. El cultivo se lleva a cabo generalmente a un pH de 6 a 8 y a 30 a 40°C durante 1 a 7 días en presencia de 5% de CO₂. Si es necesario, se puede añadir al medio un antibiótico, tal como kanamicina o penicilina, durante el cultivo.

Con respecto al método de expresión del gen que codifica CD4, además de la expresión directa, se puede llevar a cabo la producción secretora, la expresión de proteínas de fusión, y similar, según el método descrito en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

El procedimiento para producir CD4 incluye un método de expresión intracelular en una célula hospedante, un método de secreción extracelular a partir de una célula hospedante, un método de producción en una cubierta exterior de la membrana de la célula hospedante, etc. El método apropiado se puede seleccionar cambiando la célula hospedante usada y la estructura de la CD4 producida.

Cuando el CD4 se produce en una célula hospedante o en una cubierta exterior de la membrana de la célula hospedante, CD4 se puede segregar de forma positiva extracelularmente según el método de Paulson et al. [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)], el método de Lowe et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989), Genes Develop., 4, 1288 (1990)], los métodos descritos en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 336963/93 y el documento WO 94/23021, y similar.

También, la cantidad de producción de CD4 se puede incrementar según el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90, que utiliza un sistema de amplificación génico que usa un gen de dihidrofolato reductasa.

El CD4 resultante se puede aislar y purificar, por ejemplo, como sigue.

Cuando CD4 se expresa intracelularmente en un estado disuelto, las células después del cultivo se recuperan mediante centrifugación, se suspenden en un amortiguador acuoso, y entonces se rompen usando un ultrasonicador, una prensa francesa, un homogeneizador Manton Gaulin, un molino de bolas dynomill, o similar, para obtener un extracto libre de células. El extracto libre de células se centrifuga para obtener un sobrenadante, y se puede obtener una preparación purificada sometiendo el sobrenadante a técnicas generales de aislamiento y purificación de enzimas tales como extracción con disolvente; precipitación salina con sulfato de amonio, etc.; desalado; precipitación con un disolvente orgánico; cromatografía de intercambio aniónico que usa una resina tal como dietilaminoetil (DEAE)-sefarsa, DIAION HPA-75 (fabricada por Mitsubishi Chemical); cromatografía de intercambio catiónico que usa una resina tal como S-sefarsa FF (fabricada por Pharmacia); cromatografía hidrófoba que usa una resina tal como butil-Sefarsa o fenil-Sefarsa; filtración en gel usando un tamiz molecular; cromatografía de afinidad; cromatografía de afinidad; electroforesis tal como enfoque isoeléctrico; y similares, que se pueden usar solas o en combinación.

Cuando CD4 se expresa intracelularmente al formar un cuerpo de inclusión, las células se recuperan, se rompen y se centrifugan de la misma manera, y el cuerpo de inclusión de CD4 se recupera como una fracción de precipitación. El cuerpo de inclusión recuperado de la proteína se solubiliza con un agente desnaturante de la proteína. La proteína se obtiene en una estructura tridimensional normal diluyendo o dializando la disolución solubilizada, y entonces se obtiene una preparación purificada de CD4 mediante el mismo método de purificación y aislamiento como antes.

Cuando CD4 o el derivado tal como un producto glicosilado se segrega extracelularmente, CD4 o el derivado, tal como un producto glicosilado, se puede recuperar del sobrenadante de cultivo. Esto es, el cultivo se trata mediante un método, tal como centrifugación, de la misma manera que antes, para obtener un sobrenadante de cultivo, y se puede obtener una preparación purificada de CD4 a partir del sobrenadante de cultivo mediante el mismo método de aislamiento y purificación como antes.

También, el CD4 utilizado en la presente invención se puede producir mediante un método de síntesis química, tal como el método de Fmoc o método de tBoc. También, se puede sintetizar químicamente usando un sintetizador de péptidos fabricado por Advanced ChemTech, Perkin-Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corporation, o similar.

(2) Inmunización de animal y preparación de célula productora de anticuerpo para la fusión

Se inmuniza un ratón, rata o hámster de 3 a 20 semanas con el antígeno preparado en el (1) anterior, y las células

productoras de anticuerpo se recogen del bazo, ganglio linfático o sangre periférica del animal. También, cuando se reconoce el incremento de un título suficiente en el animal anterior debido a una baja inmunogenicidad, se puede usar un ratón genosuprimido para CD4 como animal a inmunizar.

La inmunización se lleva a cabo administrando el antígeno al animal a través de inyección subcutánea, intravenosa o intraperitoneal junto con un adyuvante apropiado (por ejemplo, adyuvante completo de Freund, combinación de gel de hidróxido de aluminio con vacuna contra la tosferina, o similar). Cuando el antígeno es un péptido parcial, se produce un conjugado con una proteína portadora tal como BSA (seroalbúmina bovina), KLH (hemocianina de lapa californiana), o similar, que se usa como el antígeno.

La administración del antígeno se lleva a cabo 5 a 10 veces cada semana o cada dos semanas después de la primera administración. En el 3^{er} a 7^o día después de cada administración, se recoge una muestra de sangre del fondo del ojo, se evalúa la reactividad del suero con el antígeno, por ejemplo mediante inmunoensayo enzimático [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)], o similar. Un animal que muestra un título suficiente de anticuerpo en sus sueros frente al antígeno usado para la inmunización se usa como la fuente de suministro de células productoras de anticuerpo para la fusión.

Tres a siete días después de la administración final del antígeno, el tejido que contiene las células productoras de anticuerpo, tales como el bazo, del animal inmunizado se corta para recoger las células productoras de anticuerpo. Cuando se usan células del bazo, el bazo se corta y se ablanda, seguido de la centrifugación. Después, las células productoras de anticuerpo para la fusión se obtienen eliminando los eritrocitos.

(3) Preparación de célula de mieloma

Como células de mieloma, se usa una estirpe celular establecida obtenida de ratón. Los ejemplos incluyen la estirpe celular de mieloma de ratón (derivada de BALB/c) resistente a 8-azaguanina P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)], P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [European J Immunology, 6, 511 (1976)], SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)], P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)], P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)] y similar.

Las células de mieloma se subcultivan en un medio normal [un medio en el que se añaden glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, FBS y 8-azaguanina al medio RPMI1640] y se subcultivan en el medio normal 3 o 4 días antes de la fusión celular para asegurar el número de células de 2×10^7 o más en el día para la fusión.

(4) Fusión celular y preparación de hibridoma para producir anticuerpo monoclonal

Las células productoras de anticuerpo para la fusión obtenidas de (2) anterior y las células de mieloma obtenidas de (3) anterior se lavan suficientemente con un medio esencial mínimo (MEM) o PBS (1,83 g de hidrogenofosfato disódico, 0,21 g de dihidrogenofosfato potásico, 7,65 g de cloruro de sodio, 1 litro de agua destilada, pH 7,2) y se mezclan para dar una relación de las células productoras de anticuerpo:las células de mieloma = 5 a 10:1, seguido de la centrifugación, y después se descarta el sobrenadante. Después de que el grupo celular precipitado está suficientemente suelto, se añade la mezcla de polietilenglicol-1000 (PEG-1000), MEM y dimetilsulfóxido a la célula, con agitación a 37°C. Además, se añade 1 a 2 ml de medio MEM varias veces cada uno o dos minutos, y se añade MEM para dar una cantidad total de 50 ml. Después de la centrifugación, el sobrenadante se descarta. Después de que las células se disgregan suavemente, las células se suspenden suavemente en medio HAT [un medio en el que se añade hipoxantina, timidina y aminopterina al medio normal]. La suspensión se cultiva en una incubadora con 5% de CO₂ durante 7 a 14 días a 37°C.

Después del cultivo, se muestrea una porción del sobrenadante del cultivo, y se selecciona un hibridoma que es reactivo contra un antígeno que contiene CD4 y que no es reactivo contra un antígeno que no contiene CD4, mediante ensayo de unión como se describe a continuación. Entonces, se lleva a cabo la clonación dos veces mediante el método de dilución limitante [en primer lugar, se usa medio HT (medio HAT del que se elimina la aminopterina), y en segundo lugar, se usa el medio normal], y se selecciona como el hibridoma productor de anticuerpo monoclonal un hibridoma que muestra un título establemente elevado de anticuerpo.

(5) Preparación de anticuerpo monoclonal purificado

Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal obtenidas mediante el (4) anterior se administran por inyección intraperitoneal en ratones o ratones atímicos de 8 a 10 semanas tratados con 0,5 ml de pristano (se administra intraperitonealmente 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano), seguido de la alimentación durante 2 semanas). El hibridoma desarrolla tumor ascítico en 10 a 21 días. El fluido ascítico se recoge de los ratones, se centrifuga para eliminar los sólidos, se somete a precipitación salina con sulfato de amonio al 40 a 50%, y entonces se precipita mediante ácido caprílico, se hace pasar a través de una columna de DEAE-Sefarosa, una columna de proteína A o una columna de filtración en gel para recoger una fracción de IgG o IgM como un anticuerpo monoclonal purificado.

Además, un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal obtenido mediante (4) anterior se cultiva en medio RPMI1640 que contiene FBS o similar, y el sobrenadante se elimina por filtración. Las células precipitadas se suspenden en medio SFM de hibridoma que contiene 5% de DIGO GF21, y se cultivan durante 3 a 7 días. El anticuerpo monoclonal purificado se puede obtener centrifugando la suspensión celular obtenida, seguido de la purificación del sobrenadante resultante con una columna de Proteína A o una columna de Proteína G para recoger las fracciones de IgG.

La subclase del anticuerpo se puede determinar usando un kit de tipado de la subclase mediante inmunoensayo enzimático. La cantidad de la proteína se puede determinar mediante el método de Lowry, o a partir de la absorbancia a 280 nm.

(6) Selección de anticuerpo monoclonal

La selección del anticuerpo monoclonal se lleva a cabo mediante el siguiente ensayo de unión usando un método de inmunoensayo enzimático y análisis cinético con Biacore.

(6-a) Ensayo de unión

Como el antígeno, se usa una célula a la que se le ha introducido un gen o se usa una proteína recombinante obtenida introduciendo un vector de expresión que contiene un ADNc que codifica CD4 obtenido en (1) en *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de animal, o similar, o se usa un polipéptido purificado o un péptido parcial obtenido de un tejido humano. Cuando el antígeno es un péptido parcial, se prepara y se usa un conjugado con una proteína portadora tal como BSA o KLH.

Después de obtener estos antígenos en una capa sólida al dispensarlos en una placa de 96 pocillos, se dispensa en ella como anticuerpo primario una sustancia a ensayar, tal como suero, un sobrenadante de cultivo de un hibridoma o un anticuerpo monoclonal purificado, y se deja reaccionar. Tras el lavado a conciencia con PBS o PBS-Tween, se dispersa en ella como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con biotina, una enzima, un material quimioluminiscente, un compuesto de radiación, o similar, y se deja reaccionar. Tras el lavado a conciencia con PBS-Tween, la reacción se lleva a cabo en respuesta al marcador del anticuerpo secundario para seleccionar un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con el antígeno.

(6-b) Análisis cinético con Biacore

La cinética entre un antígeno y una sustancia de ensayo se mide usando Biacore T100, y entonces los resultados obtenidos se analizan usando software de análisis que acompaña al aparato. Después de que anticuerpo de ratón anti-IgG se inmoviliza sobre una matriz sensora CM 5 mediante un método de acoplamiento de amina, se deja pasar una sustancia de ensayo tal como un sobrenadante de cultivo de un hibridoma, un anticuerpo purificado, se deja unir en una cantidad apropiada, y posteriormente se deja pasar un antígeno a varias concentraciones conocidas, seguido de la medida de la unión y disociación. Usando los datos obtenidos y el software que acompaña el aparato, se lleva a cabo el análisis cinético usando el modelo de unión 1:1 para obtener los parámetros necesarios. De otro modo, después de que CD4 humana se inmoviliza sobre la matriz sensora mediante un método de acoplamiento de amino, se deja pasar un anticuerpo monoclonal purificado a varias concentraciones conocidas seguido de la medida de la unión y de la disociación. Usando los datos obtenidos y el software que acompaña el aparato, se lleva a cabo el análisis cinético usando el modelo de analito bivalente para obtener los parámetros necesarios.

2. Preparación de anticuerpo recombinante

Como ejemplos de producción de anticuerpos recombinantes, a continuación se muestran procedimientos para producir un anticuerpo híbrido humano y un anticuerpo humanizado.

(1) Construcción de vector para la expresión de anticuerpo recombinante

Un vector para la expresión de anticuerpo recombinante es un vector de expresión para célula de animal en el que se han insertado ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano, y se construye clonando cada uno de los ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para la célula de animal.

La región C de un anticuerpo humano puede ser CH y CL de cualquier anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen CH que pertenece a la subclase $\gamma 1$, CL que pertenece a la clase κ , y similar. Como los ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano, generalmente se puede usar el ADNc, y también se puede usar un ADN cromosómico que comprende un exón y un intrón. Como el vector de expresión para la célula de animal, se puede usar cualquier vector de expresión, en tanto que se le pueda insertar en él y se pueda expresar en él un gen que codifica la región C de un anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen pAGE107 [Cytotechnol., 3, 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)], pSG1bd2-4 [Cytotechnol., 4, 173 (1990)], pSE1UK1Sed1-3 [Cytotechnol., 13, 79 (1993)], y similares. Los ejemplos de un promotor y potenciador usados para un vector de expresión para célula de animal incluyen un promotor temprano de

SV40 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], una LTR del virus de la leucemia de ratón de Moloney [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)], un promotor [Cell, 41, 479 (1985)] y un potenciador [Cell, 33, 717 (1983)] de la cadena H de inmunoglobulina, y similar.

El vector para la expresión de anticuerpo recombinante puede ser de un tipo en el que un gen que codifica una cadena H del anticuerpo y un gen que codifica una cadena L del anticuerpo existen en vectores distintos, o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo de tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector para la expresión de anticuerpo recombinante, la facilidad de introducción en células de animal, y el balance entre las cantidades de expresión de las cadenas H y L del anticuerpo en células de animal, es más preferido un tipo de tándem del vector para la expresión de anticuerpo recombinante [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]. Los ejemplos del tipo de tándem del vector para la expresión de anticuerpo recombinante incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)], y similar.

(2) Obtención de ADNc que codifica la región V de anticuerpo derivada de animal no humano, y análisis de la secuencia de aminoácidos

La obtención de los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo de animal no humano y el análisis de la secuencia de aminoácidos se llevan a cabo como sigue.

Se extrae ARNm de células de hibridoma que producen un anticuerpo derivado de un animal no humano para sintetizar ADNc. El ADNc sintetizado se clona en un vector, tal como un fago o un plásmido, para preparar una genoteca de ADNc. Cada uno de un fago recombinante o plásmido recombinante que contiene ADNc que codifica VH o VL se aísla de la genoteca usando como sonda ADN que codifica una parte de la región C o región V de un anticuerpo de ratón. Se determina la longitud completa de las secuencias nucleotídicas de VH y VL de un anticuerpo de ratón derivado de un animal no humano de interés en el fago recombinante o plásmido recombinante, y se deduce la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL a partir de las secuencias nucleotídicas, respectivamente.

Los ejemplos del animal no humano para preparar una célula del hibridoma que produce un anticuerpo no humano incluyen ratón, rata, hámster, conejo, o similar. Se puede usar cualesquiera animales en tanto que se pueda producir a partir de ellos una célula de hibridoma.

Los ejemplos del método para preparar ARN total a partir de una célula de hibridoma incluyen un método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)], el uso de un kit tal como el kit RNA easy (fabricado por Qiagen), y similar.

Los ejemplos del método para preparar ARNm a partir de ARN total incluyen un método de columna de celulosa con oligo (dT) inmovilizado [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], un método que usa un kit de purificación de ARNm tal como Oligo-dT30 <Super> (fabricado por Takara Bio), y similar. También, ejemplos de un kit para preparar ARNm a partir de una célula de hibridoma incluyen el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen), el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia), y similar.

Los ejemplos del método para sintetizar ADNc y preparar una genoteca de ADNc incluyen métodos conocidos [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1, John Wiley & Sons (1987-1997)]; un método que usa un kit tal como el Sistema Plasmídico Super Script para la Síntesis de ADNc y Clonación de Plásmidos (fabricado por GIBCO BRL), el kit ZAP-cDNA (fabricado por Stratagene), etc.; y similar.

El vector en el que el ADNc sintetizado, que usa como molde ARNm extraído de una célula de hibridoma, se inserta para preparar una genoteca de ADNc puede ser cualquier vector, en tanto que se pueda insertar el ADNc. Los ejemplos incluyen ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], λzapII (fabricado por Stratagene), λgt10 y λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell y pT7T3 18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)], y similar.

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

Para seleccionar clones de ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo no humano o similar a partir de la genoteca de ADNc, se puede usar un método de hibridación en colonias o un método de hibridación en placa usando una sonda marcada isotópicamente o fluorescentemente [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)].

También, los ADNc que codifican VH y VL se pueden preparar a través de reacción en cadena de la polimerasa (en adelante denominada "PCR"; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1, John Wiley & Sons (1987-1997)) al preparar cebadores y usar como molde ADNc preparado a partir de ARNm o una genoteca de ADNc.

La secuencia nucleotídica del ADNc se puede determinar digiriendo el ADNc seleccionado con enzimas de restricción apropiadas y similares, clonando los fragmentos en un plásmido tal como SK(-) (fabricado por Stratagene), llevando a cabo la reacción mediante un método de análisis nucleotídico usado habitualmente. Por ejemplo, un análisis nucleotídico se lleva a cabo usando un analizador de secuencias nucleotídicas automático, tal como ABI PRISM3700 (fabricado por PE Biosystems) y el secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia) tras una reacción tal como el método de didesoxi [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)].

Si los ADNc obtenidos codifican las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL del anticuerpo que contiene una secuencia señal secretora se puede confirmar estimando la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL a partir de la secuencia nucleotídica determinada, y comparándola con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]. La longitud de la secuencia señal secretora y de la secuencia de aminoácidos N-terminal se puede deducir comparando la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo que comprende una secuencia señal secretora con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], y también se puede conocer el subgrupo al que pertenecen. Además, las secuencias de aminoácidos de cada una de las CDRs de VH y VL se puede encontrar comparando las secuencias de aminoácidos obtenidas con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)].

Además, la novedad de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de VH y VL se puede examinar llevando a cabo una búsqueda de homología con secuencias en cualquier base de datos,

por ejemplo SWISS-PROT, PIR-Protein o similar, usando la longitud completa obtenida de las secuencias de aminoácidos de VH y VL, por ejemplo según el método de BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] o similar.

(3) Construcción de vector para expresión de anticuerpo híbrido humano

El ADNc que codifica cada una de VH y VL del anticuerpo de animal no humano se clona en dirección 5' de los genes que codifican CH y CL del anticuerpo humano del vector para la expresión de anticuerpo recombinante mencionado en (1) anterior, para construir de ese modo un vector para la expresión de anticuerpo híbrido humano.

Por ejemplo, a fin de ligar ADNc que comprende una secuencia nucleotídica de 3'-terminal de VH o VL de anticuerpo de animal no humano y una secuencia nucleotídica de 5'-terminal de CH o CL de anticuerpo humano, cada ADNc que codifica VH y VL de anticuerpo de animal no humano se prepara para que codifique aminoácidos apropiados codificados por una secuencia nucleotídica y una porción de enlazamiento, y se diseña para que tenga una secuencia de reconocimiento apropiada de una enzima de restricción. Los ADNc obtenidos que codifican VH y VL de anticuerpo se clonan respectivamente de manera que cada uno de ellos se expresa en una forma apropiada en la dirección 5' del gen que codifica CH o CL de anticuerpo humano del vector para la expresión de anticuerpo humanizado mencionado en (1) anteriormente, para construir un vector para la expresión de anticuerpo híbrido humano.

Además, el ADNc que codifica VH o VL de un anticuerpo de animal no humano se amplifica mediante PCR usando un ADN sintético que tiene una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en ambos extremos, y cada uno de ellos se clona al vector para la expresión de anticuerpo recombinante obtenido en (1) anteriormente.

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

Los ADNc que codifican VH o VL de un anticuerpo humanizado se pueden obtener como sigue.

Las secuencias de aminoácidos de la región de estructura (en adelante denominada en la presente memoria "FR") en VH o VL de un anticuerpo humano a la que secuencias de aminoácidos de CDRs en VH o VL de un anticuerpo derivado de un anticuerpo de animal no humano se trasplantan y se seleccionan respectivamente. Se pueden usar cualesquiera secuencias de aminoácidos de FR de un anticuerpo humano, en tanto que deriven de ser humano. Los ejemplos incluyen secuencias de aminoácidos de FRs de anticuerpos humanos registrados en una base de datos tal como Protein Data Bank o similar, y las secuencias de aminoácidos comunes a subgrupos de FRs de anticuerpos humanos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], y similares. A fin de inhibir la reducción en la actividad de unión del anticuerpo, se seleccionan secuencias de aminoácidos que tienen una homología elevada (al menos 60% o más) con la secuencia de aminoácidos de FR en VH o VL.

Después, las secuencias de aminoácidos de las CDRs del anticuerpo original se injertan en la secuencia de aminoácidos seleccionada de FR en VH o VL del anticuerpo humano, respectivamente, para diseñar cada secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humanizado. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN considerando la frecuencia del uso de codones encontrada en secuencias nucleotídicas de genes de anticuerpos [Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], y se diseña la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humanizado.

Basándose en las secuencias nucleotídicas diseñadas, se sintetizan varios ADN sintéticos que tienen una longitud de alrededor de 100 nucleótidos, y se lleva a cabo la PCR usándolos. En este caso, a partir de la eficiencia de la reacción de PCR y de las longitudes de los ADN que se pueden sintetizar, se prefiere que se diseñen 6 ADN sintéticos por cada una de las cadenas H y L.

Además, el ADNc que codifica VH o VL de un anticuerpo humanizado se puede clonar en el vector para la expresión de anticuerpo humanizado construido en (1) al introducir la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en el término 5' de los ADN sintéticos que existen en ambos extremos.

También, se puede llevar a cabo usando un ADN sintético como un ADN que codifica cada una de la cadena H de longitud completa y de la cadena L de longitud completa en base a la secuencia de ADN diseñada.

Después de la PCR, un producto amplificado se clona en un plásmido tal como pBluescript SK (-) (fabricado por Stratagene) o similar, y la secuencia nucleotídica se determina según un método similar al método descrito en (2) para obtener un plásmido que tiene una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo humanizado deseado.

(5) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V de anticuerpo humanizado

Es conocido que cuando se produce un anticuerpo humanizado injertando simplemente solo las CDRs en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las FRs de VH y VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión al antígeno es menor que la del anticuerpo original derivado de un animal no humano [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]. En anticuerpos humanizados, entre las secuencias de aminoácidos de las FRs en VH y VL de un anticuerpo humano, un resto de aminoácido que está relacionado directamente con la unión a un antígeno, un resto de aminoácido que interacciona con un resto de aminoácido en CDR, y un resto de aminoácido que mantiene la estructura tridimensional de un anticuerpo y está relacionado indirectamente con un antígeno se identifican y modifican a un resto de aminoácido que se encuentra en el anticuerpo no humanizado original para incrementar de ese modo la actividad de unión al antígeno que se ha reducido.

A fin de identificar los restos de aminoácidos relacionados con la actividad de unión al antígeno en FR, la estructura tridimensional de un anticuerpo se construye y se analiza mediante cristalografía de rayos X [J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)], modelado por ordenador [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)], o similar. Además, actualmente deben ser necesarios varios intentos, por ejemplo se producen varios anticuerpos modificados de cada anticuerpo y se examina la correlación entre cada uno de los anticuerpos modificados y su actividad de unión del anticuerpo.

La modificación de la secuencia de aminoácidos de FR en VH y VL de un anticuerpo humano se puede lograr usando diversos ADN sintéticos para la modificación según PCR como se describe en (4). Con respecto al producto amplificado obtenido mediante la PCR, la secuencia nucleotídica se determina según el método como se describe en (2) de manera que se confirma el hecho de si se ha llevado a cabo la modificación objetivo.

(6) Construcción del vector para la expresión de anticuerpo humanizado

Un vector para la expresión de anticuerpo humanizado se puede construir clonando cada ADNc que codifica VH o VL de un anticuerpo recombinante construido en dirección 5' de cada gen que codifica CH o CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión de anticuerpo recombinante como se describe en (1).

Por ejemplo, cuando se introducen secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción apropiadas en el término 5' de los ADN sintéticos situados en ambos extremos entre los ADN sintéticos usados en la construcción de VH o VL del anticuerpo humanizado en (4) y (5), se puede llevar a cabo la clonación de manera que se expresen en una forma apropiada en dirección 5' de cada gen que codifica CH o CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión de un anticuerpo humanizado como se describe en (1).

(7) Expresión transitoria de anticuerpo recombinante

A fin de evaluar eficazmente la actividad de unión al antígeno de diversos anticuerpos humanizados producidos, los anticuerpos recombinantes se pueden expresar transitoriamente usando el vector para la expresión de anticuerpo humanizado como se describe en (3) y (6), o el vector de expresión modificado del mismo.

Como célula hospedante, se puede usar cualquier célula, en tanto que la célula hospedante pueda expresar un anticuerpo recombinante. En general, se usa la célula COS-7 (ATCC CRL1651) a la vista de su cantidad de expresión elevada [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283 (1991)].

Los ejemplos del método para introducir el vector de expresión en célula COS-7 incluyen un método de DEAE-dextrano [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283 (1991)], un método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], y similar.

Tras la introducción del vector de expresión, la cantidad de expresión y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo recombinante en el sobrenadante de cultivo se pueden determinar mediante el inmunoensayo enzimático Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Monoclonal Antibody Experiment Manual, Kodansha Scientific (1987) y similar.

(8) Obtención del transformante que expresa de forma estable anticuerpo recombinante, y preparación de anticuerpo recombinante

Un transformante que expresa de forma estable un anticuerpo recombinante se puede obtener introduciendo el vector para la expresión de anticuerpo recombinante descrito en (3) y (6) en una célula hospedante apropiada.

Los ejemplos del método para introducir el vector de expresión en una célula hospedante incluyen electroporación [Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891/90, Cytotechnology, 3, 133 (1990)] y similar.

Como célula hospedante en la que se introduce un vector para la expresión de un anticuerpo recombinante, se puede usar cualquier célula, en tanto que sea una célula hospedante que pueda producir el anticuerpo recombinante. Los ejemplos incluyen CHO-K1 (ATCC CCL-61), DUKXB11 (ATCC CCL-9096), Pro-5 (ATCC CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, nº de Catálogo 11619), célula de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (también denominada YB2/0), célula de mieloma de ratón NSO, célula de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC nº CRL1581), célula P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC nº CRL1580), célula CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa (en adelante denominado "dhfr") es defectuoso [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4216 (1980)], Lec13 con resistencia adquirida a lectina [Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)], célula CHO en la que el gen de α 1,6-fucosiltransferasa es defectuoso (documentos WO 2005/35586, WO 02/31140), la célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC nº CRL1662), y similares.

Además, también se pueden usar células hospedantes en las que está reducida o suprimida la actividad de una proteína tal como una enzima relacionada con la síntesis de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, una proteína tal como una enzima relacionada con la modificación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo reductor a través de un enlace α en una cadena de azúcar enlazada mediante N-glicósido de tipo complejo, o una proteína relacionada con el transporte de un nucleótido de azúcar intracelular, GDP-fucosa, al cuerpo de Golgi, preferentemente una célula CHO en la que el gen de α 1,6-fucosiltransferasa está defectuoso, como se describe en los documentos WO2005/35586, WO02/31140 o similar.

Tras la introducción del vector de expresión, los transformantes que expresan de forma estable un anticuerpo recombinante se seleccionan cultivando en un medio para cultivo de células de animal que contiene un agente tal como sulfato de G418 (en adelante denominado en la presente memoria "G418") o similar (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891/90).

Los ejemplos del medio para cultivo de células de animal incluyen medio RPMI1640 (fabricado por Invitrogen), medio GIT (fabricado por Nihon Pharmaceutical), medio EX-CELL301 (fabricado por JRH), medio IMDM (fabricado por Invitrogen), medio Hybridoma-SFM (fabricado por Invitrogen), medios obtenidos añadiendo diversos aditivos tales como FBS a estos medios, y similares. El anticuerpo recombinante se puede producir y acumular en un sobrenadante de cultivo cultivando en un medio los transformantes seleccionados. La cantidad de expresión y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo recombinante en el sobrenadante de cultivo se pueden medir mediante ELISA o similar. También, en el transformante, la cantidad de expresión del anticuerpo recombinante se puede incrementar usando el sistema de amplificación de DHFR o similar, según el método descrito en la solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 257891/90.

El anticuerpo recombinante se puede purificar a partir del sobrenadante de cultivo del transformante usando una columna de proteína A [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. Por ejemplo, el anticuerpo recombinante se puede purificar mediante una combinación de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración, y similar.

El peso molecular de la cadena H o de la cadena L del anticuerpo recombinante purificado o de la molécula de

anticuerpo como un todo se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida [Nature, 227, 680 (1970)], transferencia Western [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)], y similar.

5 3. Evaluación de la actividad del anticuerpo monoclonal o del fragmento de anticuerpo

La actividad del anticuerpo monoclonal purificado o del fragmento de anticuerpo de la presente invención se puede evaluar de la siguiente manera.

10 La actividad de unión a una célula que expresa CD4 se evalúa mediante el ensayo de unión descrito en el 1-(6a) anterior y un método de resonancia de plasmones superficiales usando el sistema de Biacore tal como se describe en el (6b) anterior. Además, se puede medir mediante una técnica de anticuerpo fluorescente [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)], un método de resonancia de plasmones superficiales que usa un sistema tal como BIAcore o similar.

15 Además, la actividad CDC o la actividad ADCC frente a una estirpe celular positiva para el antígeno se evalúa mediante un método conocido [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)].

20 4. Método para controlar la actividad efectora de anticuerpo

Como método para controlar una actividad efectora del anticuerpo monoclonal anti-CD4 de la presente invención, se conoce un método para controlar una cantidad de fucosa (en adelante en la presente memoria denominada como "fucosa central") que está unida en enlazamiento α -1,6 a N-acetilglucosamina (GlcNAc) presente en un extremo reductor de una cadena de azúcar enlazada a través de N de tipo complejo que está unida a asparagina (Asn) en la posición 297 de una región Fc de un anticuerpo (documentos WO2005/035586, WO2002/31140 y WO00/61739), un método para controlar una actividad efectora de un anticuerpo monoclonal modificando el grupo o grupos de aminoácidos de una región Fc del anticuerpo, y similares. La actividad efectora del anticuerpo monoclonal anti-CD4 de la presente invención se puede controlar usando cualesquiera de los métodos.

30 La "actividad efectora" significa una actividad dependiente del anticuerpo que es inducida vía una región Fc de un anticuerpo. Como actividad efectora, se conoce la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad ADCC), la citotoxicidad dependiente del citocromo (actividad CDC), la fagocitosis dependiente del anticuerpo (actividad ADP) por células fagocíticas tales como macrófagos o células dendríticas, y similar.

35 Al controlar el contenido de fucosa central de una cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo de Fc de un anticuerpo, se puede incrementar o disminuir la actividad efectora del anticuerpo. Según un método para reducir el contenido de fucosa que está unida a una cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo unida a Fc del anticuerpo, un anticuerpo al que no está unida la fucosa se puede obtener mediante la expresión de un anticuerpo usando una célula CHO que es deficiente en un gen que codifica α 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que no está unida fucosa tiene una actividad ADCC elevada. Por otro lado, según un método para incrementar un contenido de fucosa que está unida a una cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo unida a FC de un anticuerpo, un anticuerpo al que está unida la fucosa se puede obtener mediante la expresión de un anticuerpo usando una célula hospedante en la que se introduce un gen que codifica α 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que está unida la fucosa tiene una actividad ADCC menor que el anticuerpo al que no está unida la fucosa.

45 Además, modificando el resto o restos de aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo, se puede incrementar o disminuir la actividad ADCC o la actividad CDC. La actividad ADCC se puede controlar incrementando o disminuyendo la actividad de unión a Fc γ R debido a la modificación o modificaciones del resto o restos de aminoácidos en una región Fc. Además, la actividad CDC se puede controlar incrementando o disminuyendo la actividad de unión del complemento debido a la modificación o modificaciones del resto o restos de aminoácidos en una región Fc. Por ejemplo, la actividad de unión a un anticuerpo se puede incrementar usando la secuencia de aminoácidos de la región Fc descrita en el documento US2007/0148165. Además, la actividad ADCC o la actividad CDC se puede incrementar o disminuir modificando el aminoácido como se describe en las patentes US nº 6.737.056, o nº 7.297.775 o en el documento WO2005/070963.

55 Además, un anticuerpo en el que se controla la actividad efectora se puede obtener combinando el método anterior para controlar una cadena de azúcar y el método para modificar un aminoácido o aminoácidos en una región Fc.

60 5. Método para tratar una enfermedad usando el anticuerpo monoclonal anti-CD4 de la presente invención

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar para tratar un cáncer relacionado con CD4.

El agente terapéutico que comprende al anticuerpo de la invención o un conjugado del mismo puede comprender solamente el anticuerpo o un conjugado del mismo como principio activo, pero generalmente se proporciona como una preparación farmacéutica producida mezclándola con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, usando un método apropiado bien conocido en el campo técnico de la farmacia.

Los ejemplos de una vía de administración incluyen la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. En el caso de una formulación de anticuerpo o formulación peptídica, se prefiere la administración intravenosa. Los ejemplos de la forma de dosificación incluyen pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, polvo, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, ungüentos, cintas, y similares.

La preparación farmacéutica adecuada para administración oral incluye emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, y similares.

Las preparaciones líquidas, tales como emulsiones y jarabes, se pueden producir usando, como aditivos, agua; azúcares tales como sacarosa, sorbitol y fructosa; glicoles tales como polietilenglicol y propilenglicol; aceites tales como aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de soja; antisépticos tales como ésteres del ácido p-hidroxibenzoico; sabores tales como sabor de fresa y menta piperita; y similares.

Las cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, y similares, se pueden producir usando, como aditivos, excipientes tales como lactosa, glucosa, sacarosa y manitol; agentes disgregantes tales como almidón y alginato de sodio; lubricantes tales como estearato de magnesio y talco; aglutinantes tales como polialcohol vinílico, hidroxipropilcelulosa y gelatina; tensioactivos tales como un éster de ácido graso; plastificantes tales como glicerina; y similares.

La preparación farmacéutica adecuada para administración parenteral incluye inyecciones, supositorios, pulverizaciones y similares.

Las inyecciones se pueden preparar usando un vehículo tal como una disolución salina, una disolución de glucosa, o una mezcla de ambas.

Los supositorios se pueden preparar usando un vehículo tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada o ácido carboxílico.

Las pulverizaciones se pueden preparar usando el anticuerpo como tal, o usándolo junto con un vehículo que no estimula la membrana mucosa bucal o de las vías respiratorias del paciente y puede facilitar la absorción del compuesto al dispersarlo como partículas finas. El vehículo incluye lactosa, glicerol y similar. Es posible producir preparaciones farmacéuticas tales como aerosoles y polvos secos.

Además, los componentes ejemplificados como aditivos para preparaciones orales también se pueden añadir a las preparaciones parenterales.

6. Método para diagnosticar cáncer usando el anticuerpo monoclonal anti-CD4 de la presente invención

Un cáncer relacionado con CD4 se puede diagnosticar detectando o determinando CD4, o una célula que expresa CD4, usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

Un diagnóstico del cáncer se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la detección o medida de CD4 según lo siguiente.

El diagnóstico del cáncer se puede llevar a cabo detectando CD4 que se expresa en la célula en un cuerpo del paciente mediante un método inmunológico tal como un citómetro de flujo.

Un método inmunológico es un método en el que se detecta o se determina una cantidad de anticuerpo o una cantidad de antígeno usando un antígeno o anticuerpo marcados. Los ejemplos del método inmunológico incluyen un método de inmunoanticuerpo marcado con una sustancia radiactiva, un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo fluorescente, un inmunoensayo luminiscente, un método de transferencia Western, medios físico-químicos, y similares.

Los ejemplos del método de inmunoanticuerpo marcado con sustancia radiactiva incluyen un método en el que el anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con un antígeno, una célula que expresa un antígeno, o similar, después el anticuerpo anti-inmunoglobulina sometido a un marcaje radioactivo o un fragmento de unión del mismo se deja reaccionar con él, seguido de la determinación usando un contador de centelleo o similar.

Los ejemplos del inmunoensayo enzimático incluyen un método en el que el anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con un antígeno, una célula que expresa un antígeno, o similar, después un anticuerpo anti-inmunoglobulina o un fragmento de unión del mismo sometido a marcaje del anticuerpo se deja reaccionar con él, y el pigmento coloreado se mide mediante un espectrofotómetro. Por ejemplo, se puede usar un ELISA de sándwich. Como marcador usado en el inmunoensayo enzimático, se puede usar cualquier marcador enzimático conocido (Enzyme Immunoassay, publicado por Igaku Shoin, 1987) como ya se describió. Los ejemplos incluyen marcaje con

fosfatasa alcalina, marcate con peroxidasa, marcate con luciferasa, marcate con biotina, y similar. El ELISA de sándwich es un método en el que un anticuerpo se une a una fase sólida, el anticuerpo a detectar o medir es atrapado, y se permite que otro anticuerpo reaccione con el antígeno atrapado. En el ELISA, se preparan dos tipos de anticuerpo que reconocen el antígeno a detectar o medir, o el fragmento de anticuerpo del mismo en el que el sitio de reconocimiento del antígeno es diferente, y el primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo se adsorbe previamente en una placa (tal como una placa de 96 pocillos) y el segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo se marca con una sustancia fluorescente tal como FITC, una enzima tal como peroxidasa, o biotina. La placa a la que el anticuerpo anterior se adsorbe se deja reaccionar con la célula separada del organismo vivo o la suspensión celular disgregada del mismo, con tejido o disolución disgregada del mismo, células cultivadas, suero, efusión pleural, fluido ascítico, disolución ocular, etc., después se deja reaccionar con un anticuerpo monoclonal marcado o con un fragmento de anticuerpo, y se lleva a cabo una reacción de detección que corresponde a la sustancia marcada. La concentración de antígeno en la muestra a ensayar se puede calcular a partir de una curva de calibración preparada mediante una dilución por etapas de antígeno de concentración conocida. Como anticuerpo usado para ELISA de sándwich, se puede usar cualquiera de anticuerpo policlinal y anticuerpo monoclonal, o se pueden usar fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab' y F(ab)₂. Como combinación de dos tipos de anticuerpos usados en ELISA de sándwich, se puede usar una combinación de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos que reconocen diferentes epítomos, o se puede usar una combinación de anticuerpo policlinal con anticuerpo monoclonal o fragmentos de anticuerpos.

Un inmunoensayo fluorescente incluye un método descrito en las bibliografías [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Tercera Edición, Academic Press (1996); Manual for Monoclonal Antibody Experiments, Kodansha Scientific (1987)] y similar. Como marcador para el inmunoensayo fluorescente, se puede usar cualquiera de los marcadores fluorescentes conocidos [Fluorescent Immunoassay, Soft Science, (1983)]. Los ejemplos del marcador incluyen FITC, RITC, y similar.

El inmunoensayo luminiscente se puede llevar a cabo usando los métodos descritos en la bibliografía [Bioluminescence and Chemical Luminescence, Rinsho Kensa, 42, Hirokawa Shoten (1998)], y similares. Como marcador usado para el inmunoensayo luminiscente, se puede incluir cualquiera de los marcadores luminiscentes conocidos, y los ejemplos incluyen éster de acridinio, lofina o similar.

La transferencia Western es un método en el que un antígeno o una célula que expresa un antígeno se fracciona mediante SDS (dodecilsulfato de sodio)-PAGE [Antibodies-A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)], el gel se transfiere sobre una membrana de PVDF o una membrana de nitrocelulosa, la membrana se deja reaccionar con anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reconoce el antígeno, posteriormente se deja reaccionar con anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-IgG de ratón que está marcado con una sustancia fluorescente tal como FITC, un marcador enzimático tal como peroxidasa, un marcador biotínico, o similar, y el marcador se visualiza para confirmar la reacción. A continuación se describe un ejemplo de la mismo. Las células o tejidos en los que se expresa un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 2 se disuelven en una disolución y, en condiciones reductoras, se someten a electroforesis 0,1 a 30 g como cantidad de proteína mediante un método de SDS-PAGE. La proteína sometida a electroforesis se transfiere a una membrana de PVDF y se deja reaccionar con PBS que contiene 1 a 10% de BSA (en adelante denominada en la presente memoria "BSA-PBS") a temperatura ambiente durante 30 minutos para el bloqueo. En la presente memoria, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se deja reaccionar con ella, se lava con PBS que contiene 0,05 a 0,1% de Tween 20 en adelante denominada "Tween-PBS"), y se deja reaccionar con anti-IgG de ratón de cabra marcado con peroxidasa, a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lava con Tween-PBS, y se detecta una banda a la que está unida el anticuerpo monoclonal usando Reactivos de Detección de Transferencia Western ECL (fabricado por Amersham) o similar, para detectar de ese modo un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 2. Como anticuerpo usado para la detección de la transferencia Western, se usa un anticuerpo que se puede unir a un polipéptido que no tiene una estructura tridimensional de un tipo natural.

El método fisicoquímico se lleva a cabo específicamente haciendo reaccionar CD4 como el antígeno con el anticuerpo de la presente invención para formar un agregado, y detectando este agregado. Otros ejemplos de los métodos fisicoquímicos incluyen un método capilar, un método de inmunodifusión monodimensional, una inmunturbidimetría, una inmunturbidimetría de látex [Handbook of Clinical Test Methods, Kanehara Shuppan, (1988)] y similar. Por ejemplo, en un método de inmunodifusión de látex, se puede usar un portador tal como un látex de poliestireno que tiene un tamaño de partículas de alrededor de 0,1 a 1 µm sensibilizado con anticuerpo o antígeno, y cuando se lleva a cabo la reacción de antígeno-anticuerpo usando el antígeno o anticuerpo correspondiente, la luz dispersada en la disolución de la reacción aumenta mientras que disminuye la luz transmitida. Cuando se detecta tal cambio como absorbancia o turbidez de esfera integral, ahora es posible medir la concentración de antígeno, etc., en la muestra a ensayar.

Por otro lado, para la detección de la célula que expresa CD4, se pueden usar métodos de detección inmunológicos conocidos, y preferentemente se usa un método de inmunoprecipitación, un método de inmunotinción celular, un método de inmunotinción tisular, un método de tinción de anticuerpo fluorescente, y similar.

Un método de inmunoprecipitación es un método en el que una célula que expresa CD4 se deja reaccionar con el

anticuerpo monoclonal de la presente invención, y después se añade un portador que tiene capacidad de unión específica a la inmunoglobulina, tal como proteína G-Sefarosa, de manera que precipita un complejo de antígeno-anticuerpo. También, se puede llevar a cabo el siguiente método.

5 El anticuerpo descrito anteriormente de la presente invención se coloca en fase sólida sobre una placa de 96 pocillos para ELISA, y después se bloquea con BSA-PBS. Cuando el anticuerpo está en un estado no purificado, tal como un sobrenadante de cultivo de célula de hibridoma, una inmunoglobulina anti-ratón o inmunoglobulina de rata o una proteína A o una Proteína G, o similar, se adsorbe previamente sobre una placa de 96 pocillos para ELISA y se
10 bloquea con BSA-PBS, y se le administra para la unión un sobrenadante de cultivo de célula de hibridoma. Después de que se desecha la BSA-PBS y el residuo se lava suficientemente con PBS, la reacción se lleva a cabo con una disolución disuelta de células o tejidos que expresan CD4. Se extrae un precipitado inmune de la placa con los pocillos lavados con un amortiguador de muestras para SDS-PAGE, y se detecta mediante la transferencia Western descrita anteriormente.

15 Un método de inmunotinción celular o un método de inmunotinción tisular es un método en el que las células o tejidos en los que se expresa el antígeno se tratan, si es necesario, con un tensioactivo, metanol, o similar, para hacer que un anticuerpo permee fácilmente las células o tejidos, después el anticuerpo monoclonal de la presente invención se deja reaccionar con él, posteriormente entonces se deja reaccionar con un anticuerpo anti-inmunoglobulina o fragmento de unión del mismo sometido a marcaje fluorescente tal como FITC, marcaje
20 enzimático tal como peroxidasa, o marcaje con biotina, y el marcador se visualiza y observa bajo un microscopio. Además, las células o tejidos se pueden detectar mediante un método de tinción inmunofluorescente en el que las células se dejan reaccionar con un anticuerpo marcado fluorescentemente y se analizan mediante un citómetro de flujo [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Tercera Edición, Academic Press (1996), Manual for Experiments of Monoclonal Antibodies, Kodansha Scientific (1987)] en el que las células se dejan reaccionar con un
25 anticuerpo marcado fluorescentemente y se analizan mediante un citómetro de flujo. Particularmente, el anticuerpo monoclonal de la presente invención que se une a una región extracelular de la CD4 puede detectar una célula que expresa el polipéptido que mantiene una estructura tridimensional de tipo natural.

Además, en el caso de usar el sistema FMAT8100HTS (fabricado por Applied Biosystems), y similar, entre los
30 métodos de tinción de anticuerpo fluorescente, la cantidad de antígeno o la cantidad de anticuerpo se puede medir sin separar el complejo formado de anticuerpo-antígeno y el anticuerpo o antígeno libre que no está implicado en la formación del complejo de anticuerpo-antígeno.

La presente invención se describe a continuación mediante los ejemplos; sin embargo, la presente invención no está
35 limitada a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Construcción del transfectante de CD4

(1) Construcción del vector de expresión de CD4

Un vector en el que se insertó una secuencia nucleotídica de CD4 humana se construyó como sigue, a partir de un vector (Clon nº 5226427, en adelante denominado en la presente memoria "pCMV-CD4", fabricado por Open
45 Biosystems) en el que se insertó un gen de CD4 humano en un vector pCMV-SPORT6.

El fragmento del gen de CD4 se amplificó usando como molde pCMV-CD4 y los cebadores que comprenden las secuencias nucleotídicas representadas por SEC ID NOs: 79 y 80, según un método de PCR convencional. El producto de la PCR se purificó mediante un Kit de Purificación por PCR (fabricado por Qiagen), y entonces se trató con enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI*. De forma similar, un vector pBluescript II sk(-) (fabricado por Stratagene) (denominado en la presente memoria en adelante "pBS") se trató con enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI*. Los dos fragmentos resultantes se ligaron usando un Ligation high (fabricado por Toyobo) según las instrucciones adjuntas al mismo. Una cepa DH5 α de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) se transformó con la disolución de ADN plasmídico recombinante obtenida. Un ADN plasmídico se preparó a partir del clon del transformante y se confirmó
55 mediante tratamiento con enzimas de restricción, y se obtuvo un plásmido pBS/CD4 en el que se insertó un gen de CD4. El pBS/CD4 resultante en el que se insertó un gen de CD4 y un vector de expresión pKANTEX93 (documento WO97/10354) para una célula de animal se trataron con enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI*. El líquido de la reacción se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, recuperando de ese modo un fragmento de *EcoRI-SpeI* de CD4 y un fragmento de *EcoRI-SpeI* de pKANTEX93, respectivamente. Estos dos fragmentos se ligaron
60 usando un Ligation high (fabricado por Toyobo) según las instrucciones adjuntas al mismo. Una cepa DH5 α de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) se transformó con la disolución de ADN plasmídico recombinante resultante. Un ADN plasmídico se preparó a partir del clon del transformante y se confirmó mediante el tratamiento con enzimas de restricción, y se obtuvo un plásmido pKANTEX/CD4 en el que se insertó un gen de CD4. El plásmido obtenido se dejó reaccionar usando un kit BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (fabricado por PE Biosystems) según las instrucciones adjuntas al mismo, y entonces se analizó su secuencia nucleotídica mediante
65 un secuenciador de la misma compañía, ABI PRISM3700. Como resultado, se obtuvo un vector pKANTEX/CD4 en

el que se clonó un ADNc que codifica CD4 humana. La figura 1 ilustra un diagrama esquemático para la construcción del vector.

(2) Construcción de célula CHO/DG44 que expresa CD4

Según la electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], el vector de expresión de CD4 pKANTEX/CD4 construido en la Sección (1) en una célula CHO/DG44 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555 (1986)] se introdujo de la siguiente manera. Las células usadas en la presente memoria son las subcultivadas en un medio en el que se añadió suplemento HT 1x (fabricado por Invitrogen) a IMDM (fabricado por Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (fabricado por Life Technologies) y gentamicina (50 µg/ml, fabricada por Nacalai Tesque) (en adelante denominado en la presente memoria "medio A3"). Las células CHO/DG44 se suspendieron en un amortiguador que contiene cloruro potásico (137 nmoles/l), cloruro sódico (2,7 nmoles/l), hidrogenofosfato disódico (8,1 nmoles/l), dihidrogenofosfato sódico (1,5 nmoles/l) y cloruro magnésico (4 nmoles/l) (en adelante denominado en la presente memoria "K-PBS") para dar una concentración final de 8×10^6 células/ml, y la suspensión celular resultante (200 µl, $1,6 \times 10^6$ células en términos de recuento celular) se mezcló con el plásmido de expresión pKANTEX/CD4 (8 µg). La mezcla se transfirió a una cubeta (distancia entre electrodos: 2 mm), seguido de la transferencia génica usando GenePulser II (fabricado por Bio-Rad) a un voltaje de pulso de 0,35 kV y una capacidad eléctrica de 250 µF. Después de que la cubeta se dejó reposar en hielo, la suspensión celular en la cubeta se suspendió en una vasija de cultivo celular que contiene medio A3, y se cultivó en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C. Después, las células se cultivaron en un medio que contiene G418 (fabricada por Invitrogen, 0,5 mg/ml), y entonces se obtuvo una estirpe celular transformada resistente a G418. Además, se seleccionó un clon que muestra un nivel elevado de expresión de CD4 añadiendo metotrexato al medio e incrementando la concentración de una manera por etapas. De esta manera, se obtuvo una estirpe celular CHO que expresa CD4 (en adelante denominada en la presente memoria "célula CHO/CD4" o "transfectante de CD4").

Ejemplo 2

Construcción de CD4-Fc

(1) Construcción del vector de expresión CD4-Fc

El vector pBS/CD4 construido en el Ejemplo 1(1), en el que se insertó un gen de CD4 humano, y un vector pKANTEX93 se mezclaron para uso como molde. La PCR se llevó a cabo usando la mezcla como molde, y cuatro oligonucleótidos sintéticos representados por SEC ID NOs: 79, 80, 81, y 82, respectivamente, como cebadores. Según esta reacción, se sintetizó una secuencia nucleotídica en la que un gen que codifica una región extracelular de una proteína CD4 se ligó con un gen de la región Fc (en adelante denominado en la presente memoria "gen CD4-Fc"). El producto de la PCR resultante se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se escindió y purificó un gen CD4-Fc deseado (alrededor de 2 kpb). Se llevó a cabo nuevamente la PCR usando como molde el producto purificado, y dos cebadores representados por SEC ID NOs: 79 y 82, respectivamente, de manera que se amplificó el gen CD4-Fc. El producto de la PCR resultante se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, y un gen deseado CD4-Fc (alrededor de 2 kpb) se escindió y se trató con enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI*, obteniendo de ese modo un fragmento de *EcoRI-SpeI* del gen CD4-Fc. De forma similar, el vector pKANTEX93 se trató con enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI*. Los dos fragmentos resultantes se ligaron usando un Ligation High (fabricado por Toyobo). Una cepa DH5α de *Escherichia coli* (fabricada por Toyobo) se transformó con la disolución de ADN plasmídico recombinante obtenida. Un ADN plasmídico se preparó a partir del clon del transformante y se confirmó mediante tratamiento con enzimas de restricción, y se obtuvo un pKANTEX/CD4-Fc plasmídico en el que se insertó el gen CD4-Fc. El plásmido obtenido se hizo reaccionar usando un BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (fabricado por PE Biosystems) según las instrucciones adjuntas al mismo, y entonces la secuencia nucleotídica se analizó mediante un secuenciador de la misma compañía, ABI PRISM3700. Como resultado, se obtuvo un vector pKANTEX/CD4-Fc en el que se clonó un ADNc que codifica CD4-Fc. La figura 2 ilustra un diagrama esquemático para la construcción del vector.

(2) Expresión de CD4-Fc

Usando el pKANTEX/CD4-Fc construido en la Sección (1), se obtuvo una célula CHO que expresa CD4-Fc (en adelante denominada en la presente memoria "CHO/CD4-Fc") mediante un método convencional [Antibody Engineering, A Practical Guide, W.H. Freeman and Company (1992)].

(3) Purificación de CD4-Fc soluble

Tras cultivar la CHO/CD4-Fc construida en la Sección (2) en las mismas condiciones de cultivo como en el Ejemplo 1(2), la suspensión celular se recuperó y se centrifugó a 3000 rpm y 4°C durante 20 minutos para recuperar el sobrenadante de cultivo, y entonces el sobrenadante de cultivo se esterilizó mediante filtración usando un filtro Millex GV de 0,22 µm de tamaño de poros (fabricado por Millipore). La proteína CD4-Fc se purificó del sobrenadante de cultivo resultante, usando una columna de resina de capacidad elevada de Proteína A (fabricada por Millipore) según

las instrucciones anexas al mismo.

Ejemplo 3

5 Preparación de anticuerpo monoclonal anti-CD4

(1) Preparación de inmunógeno

10 A fin de obtener un anticuerpo monoclonal anti-CD4, se usó como inmunógeno un producto liofilizado de CD4 humana recombinante (número de catálogo: 514-CD/CF, fabricado por R&D Systems) disuelto en amortiguador de fosfato de Dulbecco (disolución salina amortiguada con fosfato: PBS), o una proteína de fusión CD4 humana-Fc en adelante denominada en la presente memoria "CD4-Fc") preparada en el Ejemplo 2(3).

(2) Inmunización de animal y preparación de célula productora de anticuerpo

15 Se administraron en ratas SD (fabricadas por Japan SLC) 20 µg de la CD4 humana recombinante o de la CD4-Fc preparada en el Ejemplo 2(3), junto con 2 mg de un adyuvante de hidróxido de aluminio (Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 99, 1988) y 1×10^9 células de una vacuna de tosferina (fabricada por Chiba Serum Institute). Dos semanas después de la administración, se administraron a las ratas 20 µg de la CD4 y 2 mg de un adyuvante de hidróxido de aluminio solo una vez a la semana, cuatro veces en total. La sangre se recogió parcialmente de la vena del fondo de ojo de las ratas, y el título del anticuerpo del suero se confirmó mediante ELISA de unión a CD4. El bazo se extrajo de una rata que mostró un título de anticuerpo suficiente tres días después de la inmunización final. El bazo se trocó en trozos pequeños en Medio Esencial Mínimo (MEM, fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), se molió y se centrifugó (1200 rpm, 5 minutos). Se añadió amortiguador de cloruro de Tris-cloruro de amonio (pH 7,6) para tratar la fracción de precipitación resultante durante 1 minuto a 37°C, mediante lo cual se eliminaron los glóbulos rojos. La fracción de precipitación resultante (fracción celular) se lavó tres veces con MEM, y se usó en la fusión celular.

(3) ELISA de unión a CD4

30 Para el ensayo, se usó una placa de ELISA de 96 pocillos (fabricada por Greiner). Para este fin, se dispensaron 2 µg/ml de la CD4 humana recombinante preparada en el Ejemplo 1(1) a una concentración de 50 µl/pocillo a la placa, y se dejó reposar a 4°C toda la noche para la adsorción. Después de que la placa se lavó con PBS, se añadieron 100 µl/pocillo de seroalbúmina bovina al 1% (BSA)-PBS (en adelante denominada en la presente memoria "BSA-PBS") a la placa, y la placa se dejó reposar entonces a temperatura ambiente durante 1 hora de manera que los grupos activos que quedan se bloquearon. Después, la BSA-PBS se desechó, y se dispensaron a la placa 50 µl/pocillo de una dilución apropiada del suero de rata inmunizado como anticuerpo primario, y la placa se dejó reposar entonces durante 2 horas. La placa se lavó con monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán al 0,05% [(el equivalente del nombre comercial de ICI Tween 20, fabricado por Wako Pure Chemical)]/PBS (en adelante denominado en la presente memoria "Tween-PBS"), y se añadieron a la placa 50 µl/pocillo de un anticuerpo de cabra anti-IgG (cadena H + L) de rata marcado con peroxidasa (fabricado por Zymed) como anticuerpo secundario, y la placa se dejó reposar entonces a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con Tween-PBS, y se desarrolló el color añadiendo 50 µl/pocillo de una disolución de sustrato de 2,2-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)amónico (ABTS) [1 mmol/l de ABTS, 0,1 mol/l de amortiguador de citrato (pH 4,2), 0.1% de H₂O₂]. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl/pocillo de una disolución de laurilsulfato de sodio (SDS) al 5%, y entonces se midió una absorbancia (OD_{415nm}) usando un lector de placas Emax (Molecular Devices).

(4) Preparación de célula de mieloma de ratón

50 La estirpe celular de mieloma de ratón resistente a 8-azaguanina P3X63Ag8U.1 (P3-U1, adquirida de ATCC) se cultivó en medio RPMI 1640 (fabricado por Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino, para asegurar un recuento celular de 2×10^7 o más necesario para la fusión celular, y se proporcionó como células progenitoras en la fusión celular.

55 (5) Medida del sobrenadante de cultivo mediante el método de FMAT

Los transfectantes de CD4 preparados en el Ejemplo 1, o las células CHO/DG44 como control negativo, se sembraron en una placa de FMAT de 96 pocillos (fabricada por Applied Biosystems) a una densidad celular de 1×10^4 células/50 µl/pocillo, seguido del cultivo durante toda la noche en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C. A la placa, se añadieron 10 µl/pocillo del sobrenadante de cultivo del hibridoma, y entonces se le añadieron inmediatamente 50 µl/pocillo de un anticuerpo de cabra anti-IgG (H + L) de rata marcado con ALEXA 647 (fabricado por Invitrogen) diluido con BSA-PBS, dejándolo reposar después a temperatura ambiente en la sombra durante 3 horas. Posteriormente, se midió una longitud de onda de 650 a 685 nm, que se excitó con un láser de He/Ne a 633 nm, mediante un Sistema de Detección Celular 8200 (fabricado por Applied Biosystems). en adelante en la presente memoria, este método de medida se denomina método de FMAT.

(6) Construcción de hibridoma

Células de bazo de ratón obtenidas en la Sección del Ejemplo 3(2) y células de mieloma obtenidas en el Ejemplo 3(4) se mezclaron en una relación de 10:1 y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. El grupo celular de la fracción de precipitación resultante estaba muy disgregado. Se añadió una mezcla de 1 g de polietilenglicol-1000 (PEG-1000), 1 ml de Medio Esencial Mínimo (en adelante denominado en la presente memoria "MEM") y 0,35 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5 ml/1 x 10⁸ células de bazo de ratón y a 37°C con agitación, y se añadió varias veces 1 ml de MEM a la suspensión cada 1 minuto. Después, se añadió MEM para dar un volumen total de 50 ml. La suspensión celular se centrifugó (900 rpm, 5 minutos), y las células de la precipitación resultante se disgregaron lentamente y entonces se suspendieron lentamente en 100 ml de medio HAT [se añadió HAT Media Supplement (fabricado por Invitrogen) a medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino]. La suspensión se dispersó en una placa de cultivo de 96 pocillos a 200 µl/pocillo y se cultivó en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C durante 10 a 14 días. Después del cultivo, el sobrenadante de cultivo se midió según el método de FMAT descrito en el Ejemplo 3(5), y se seleccionó un pocillo que fue reactivo a la CHO/CD4 preparada en el Ejemplo 1 y que no fue reactivo a la célula CHO/DG44. Después, las células seleccionadas que producen un anticuerpo específico para CD4 se sometieron dos veces a clonación mediante un método de dilución limitante para establecer los hibridomas KM4065, KM4066, KM4067, KM4068 y KM4069 que producen anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4.

Ejemplo 4Evaluación de la actividad para anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4(1) Reactividad de anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 para la estirpe celular positiva para CD4 humana mediante FCM

Las células se bloquearon añadiendo 1 mg/ml de IgG humana (fabricada por Sigma) a 1 a 5 x 10⁵ células de la estirpe celular de linfoma de células T humano HPB-ALL. Los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4065 a KM4069 y un anticuerpo de ratón anti-CD4 OKT4 (fabricado por BioLegend) se diluyeron apropiadamente con BSA-PBS, y se añadieron a aquellas para dar un volumen total de 50 µl. Estas suspensiones celulares se dejaron reaccionar en hielo durante 60 minutos, y las células se lavaron dos veces con BSA-PBS. A las células se les añadieron 50 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG (H + L) de rata marcado con Alexa-488 (fabricado por Invitrogen) diluido con BSA-PBS, seguido de la reacción en hielo durante 40 minutos. Las células se lavaron una vez con BSA-PBS y se suspendieron en BSA-PBS, y la intensidad de la fluorescencia se midió mediante un citómetro de flujo (fabricado por Beckman Coulter).

La figura 3 muestra la intensidad de fluorescencia media (valor de MFI) cuando el anticuerpo monoclonal se hizo reaccionar a una concentración de 5, 0,5 y 0,05 µg/ml. Se demostró que todos los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4065 a KM4069 y el anticuerpo de ratón anti-CD4 OKT4 se unen a la estirpe celular positiva para CD4 de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo.

(2) Actividad de unión de anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 a CD4 humana recombinante mediante Biacore

Para analizar cinéticamente la actividad de unión de los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4065 a KM4069 y del anticuerpo de ratón anti-CD4 humana comercialmente disponible para CD4 humana recombinante, la actividad de unión se midió mediante el método de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Todas las siguientes manipulaciones se llevaron a cabo usando el Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences). El anticuerpo anti-IgG de ratón se inmovilizó en una matriz sensora CM5 (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences) mediante un método de acoplamiento de amina usando un Kit de Captura de Anticuerpo de Ratón (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences) según los protocolos anexos al mismo. Los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4065 a KM4069, Leu-3a (BD Biosciences), OKT4 (BioLegend) y 13B8.2 (Beckman Coulter) se añadieron para ser capturados sobre la matriz que tenía inmovilizado al anticuerpo anti-IgG de ratón, para dar 100 RU (unidad de resonancia), respectivamente. Después, la CD4 humana recombinante (fabricada por R&D), diluida desde 2500 ng/ml en cinco etapas, se dejó pasar a un caudal de 30 µl/min. sobre la matriz, y se obtuvo el sensograma correspondiente a cada concentración. El análisis se llevó a cabo en el modelo de unión 1:1 usando un software de análisis incluido con el aparato, calculando de ese modo una constante de velocidad de asociación k_a y una constante de velocidad de disociación k_d de los anticuerpos individuales para la CD4 humana.

Como resultado, en la Tabla 2 se da una constante de velocidad de asociación (en adelante denominada en la presente memoria " k_a "), una constante de velocidad de disociación (en adelante denominada en la presente memoria " k_d ") y una constante de disociación K_D (k_d/k_a) de los anticuerpos individuales así obtenidos.

Como se muestra en la Tabla 2, los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4065 y KM4066 mostraron una mayor afinidad que el anticuerpo convencional.

[Tabla 2]

anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
KM4065	3,57 E+05	1,52 E-06	4,26 E-12
KM4066	1,34 E+06	1,18 E-04	8,82 E-11
KM4067	8,75 E+05	4,73 E-04	5,41 E-10
KM4068	1,85 E+06	2,04 E-03	1,10 E-09
KM4069	1,21 E+06	5,84 E-04	4,82 E-10
Leu-3a*	1,10 E+06	1,29 E-04	1,17 E-10
OKT4**	1,05 E+06	3,06 E-03	2,90 E-09
13B8.2***	4,44 E+05	1,56 E-04	3,52 E-10

*: fabricado por BD Bioscience, **: fabricado por Biolegend, ***: fabricado por Beckman Coulter

(3) Evaluación de la citotoxicidad celular dependiente del complemento (actividad CDC) del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 sobre transfectante de CD4

La actividad CDC de los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4066 a KM4068 y del anticuerpo de ratón anti-CD4 OKT4 sobre el transfectante de CD4 construido en el Ejemplo 1 se midió usando un sobrenadante de cultivo del hibridoma de rata, según el siguiente procedimiento.

El transfectante de CD4 se lavó con PBS, se lavó con RPMI 1640 (fabricado por Wako Pure Chemical) que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS), y se preparó para dar una concentración óptima en el mismo medio, que entonces se usó como una suspensión celular diana. La suspensión celular diana se dispuso en una placa de fondo plano de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite) a 5×10^4 células/pocillo. Además, se le añadió, para dar un volumen total de 100 μ l/pocillo, una disolución de anticuerpo híbrido anti-CD4 preparada para dar una concentración apropiada y un complemento humano (fabricado por Sigma) a una concentración final de 25%. Además, se prepararon respectivamente, como control negativo, un pocillo de reacción que no contiene el anticuerpo (pocillo de citotoxicidad celular de 0%), y como control positivo, un pocillo de reacción que no contiene la célula (pocillo de citotoxicidad celular de 100%). La reacción se llevó a cabo en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C durante 3 horas. Después de que la reacción estuvo terminada, se añadieron 10 μ l/pocillo de un reactivo WST-1 (fabricado por Roche Diagnostics) a los pocillos de reacción, seguido de la reacción a 37°C durante 3 horas. Se midió una absorbancia a 450 nm (OD450) para cada pocillo usando un lector de placas Emax (fabricado por Molecular Devices). A partir de la absorbancia de cada pocillo, la actividad celular CDC (citotoxicidad celular [%]) se calculó según la siguiente fórmula.

(Fórmula)

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

En la figura 4 se muestran los resultados de la medida. Como se muestra en la figura 4, el anticuerpo de ratón anti-CD4 convencional OKT4 tuvo una actividad CDC, y de forma similar todos los clones de los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4066 a KM4068 obtenidos en la presente invención también mostraron una actividad CDC.

Ejemplo 5

Aislamiento y análisis de ADNc que codifica regiones variables de anticuerpo monoclonal anti-CD4

(1) Preparación de ARNm a partir de célula de hibridoma que produce anticuerpo monoclonal anti-CD4

A partir de 5×10^7 a 1×10^8 células de los hibridomas respectivos KM4065 a KM4069 obtenidos en el Ejemplo 3, se preparó ARNm de los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 respectivos usando RNeasy Mini kit (fabricado por Qiagen) y OligotexTM-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (fabricado por Takara) según las instrucciones adjuntas en los mismos.

(2) Clonación génica de regiones variables de la cadena H y de la cadena L de anticuerpo monoclonal anti-CD4

Usando un kit de amplificación de ADNc SMART RACE (fabricado por Clontech) según las instrucciones adjuntas al mismo, se obtuvo un ADNc a partir de 0,5 μ g de ARNm del anticuerpo monoclonal obtenido en el Ejemplo 5(1). Los fragmentos de ADNc de las regiones variables de cadena pesada (en adelante denominadas en la presente memoria "VH") de los anticuerpos respectivos se amplificaron llevando a cabo la PCR usando como molde el ADNc así obtenido, y usando un cebador universal Amix adjunto al kit y uno seleccionado de un cebador específico para IgG1 de rata (SEC ID NO:3), un cebador específico para IgG2a de rata (SEC ID NO:4), y un cebador específico para IgG2b (SEC ID NO:5). También, los fragmentos de ADNc de las regiones variables de cadena ligera (en adelante

denominadas en la presente memoria "VL") de los anticuerpos respectivos se amplificaron llevando a cabo la PCR usando un cebador específico para Ig(κ) de rata (SEC ID NO: 6) en lugar de los cebadores específicos para la subclase respectivos del anticuerpo. La PCR para cualquier subclase de anticuerpo se llevó a cabo calentando a 94°C durante 5 minutos; 5 ciclos que consisten cada uno en una reacción a 94°C durante 15 segundos y una reacción a 72°C durante 3 minutos; 5 ciclos que consisten cada uno en una reacción a 94°C durante 15 segundos, una reacción a 70°C durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 3 minutos; y 30 ciclos que consisten cada uno en una reacción a 94°C durante 15 segundos, una reacción a 68°C durante 30 segundos, y una reacción a 72°C durante 3 minutos, seguido de una reacción a 72°C durante 10 minutos. La PCR se llevó a cabo usando el PTC-200 DNA Engine (fabricado por Bio-Rad).

A continuación, a fin de determinar la secuencia nucleotídica mediante clonación, el producto de la PCR obtenido se separó mediante electroforesis en gel de agarosa, y cada uno de un fragmento del gen de VH y un fragmento del gen de VL se extrajo usando un Kit de Extracción en Gel (fabricado por Qiagen). Después, al fragmento extraído se añadió desoxiadenina (dA), usando un Target Clone Plus (fabricado por Toyobo) según las instrucciones adjuntas al mismo, y VH o VL de cada anticuerpo se incorporó en un vector pTA2. Una cepa DH5α de *Escherichia coli* se transformó con el vector obtenido según las instrucciones adjuntas a un Competent Quick (fabricado por Toyobo). Se extrajo un plásmido del transformante resultante usando un sistema de aislamiento de plásmido automatizado (fabricado por Kurabo). El plásmido extraído se dejó reaccionar usando un Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (fabricado por PE Biosystems) según las instrucciones anejas al mismo, y entonces la secuencia nucleotídica del producto de la PCR clonado se analizó usando un secuenciador de la misma compañía, ABI PRISM3700. Como resultado, se obtuvo un plásmido que contiene un ADNc de VIH de longitud completa y un plásmido que contiene un ADNc de VL, en los que una secuencia ATG, que se supone que está en un codón de iniciación, estaba presente en el término 5' de ADNc. En la figura 5 se muestra un esquema de clonación.

(3) Análisis de la secuencia nucleotídica de la región variable del anticuerpo monoclonal anti-CD4

Las secuencias nucleotídicas completas de VH de los anticuerpos monoclonales anti-CD4 KM4065 a KM4069 comprendidas en el plásmido obtenido en el Ejemplo 5(2) se representan mediante SEC ID NOS: 7 a 11, respectivamente; las secuencias de aminoácidos completas de VH que incluyen una secuencia señal deducida a partir de estas secuencias nucleotídicas se representan mediante SEC ID NOS: 12 a 16, respectivamente; las secuencias nucleotídicas completas de VL se representan mediante SEC ID NOS: 17 a 21, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos completas de VL que incluyen una secuencia señal deducida a partir de estas secuencias nucleotídicas se representan mediante SEC ID NOS: 22 a 26, respectivamente. A partir de la comparación de los resultados del análisis obtenidos con los datos de secuencias [SECUENCES of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] de anticuerpos de rata conocidos, está claro que cada uno de los ADNc aislados es un ADNc de longitud completa que codifica una región variable (en adelante denominada en la presente memoria "región V") de anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4065 a KM4069 que contienen una secuencia señal secretora; en la cadena H de KM4065, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 19 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 12 es la secuencia señal secretora; en la cadena L de KM4065, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 20 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 22 es la secuencia señal secretora; en la cadena H de KM4066, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 19 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 13 es la secuencia señal secretora; en la cadena L de KM4066, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 19 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 23 es la secuencia señal secretora; en la cadena H de KM4067, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 18 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 14 es la secuencia señal secretora; en la cadena L de KM4067, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 20 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 24 es la secuencia señal secretora; en la cadena H de KM4068, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 19 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 15 es la secuencia señal secretora; en la cadena L de KM4068, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 20 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 25 es la secuencia señal secretora; en la cadena H de KM4069, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 19 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 16 es la secuencia señal secretora; y, en la cadena L de KM4069, la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 20 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 26 es la secuencia señal secretora.

Entonces, se investigó la novedad de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de los anticuerpos monoclonales anti-CD4 KM4065 a KM4069. Usando un paquete GCG (versión 9.1, fabricado por Genetics Computer Group) como sistema de análisis de secuencias, la base de datos de las secuencias de aminoácidos de proteínas convencionales se recuperó mediante el método de BLASTP [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)]. Como resultado, no se encontraron secuencias de aminoácidos que coinciden completamente tanto para la VH como para la VL, de manera que se confirmó que la VH y la VL de los anticuerpos monoclonales anti-CD4 KM4065 a KM4069 tienen secuencias de aminoácidos nuevas.

Además, las CDRs de VH y VL de los anticuerpos monoclonales respectivos se identificaron comparándolas con las secuencias de aminoácidos de anticuerpos conocidos. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065 se representaron mediante SEC ID NOS: 27, 28 y 29,

respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL del mismo se representan mediante SEC ID NOs: 30, 31 y 32, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4066 se representaron mediante SEC ID NOs: 33, 34 y 35, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL del mismo se representaron mediante SEC ID NOs: 36, 37 y 38, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4067 se representaron mediante SEC ID NOs: 39, 40 y 41, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL del mismo se representan mediante SEC ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4068 se representaron mediante SEC ID NOs: 45, 46 y 47, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL del mismo se representaron mediante SEC ID NOs: 48, 49 y 50, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4069 se representaron mediante SEC ID NOs: 51, 52 y 53, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL del mismo se representaron mediante SEC ID NOs: 54, 55 y 56, respectivamente.

Ejemplo 6

Preparación de anticuerpo híbrido anti-CD4

(1) Construcción del vector de expresión de anticuerpo híbrido anti-CD4

El anticuerpo híbrido preparado en la presente invención es un anticuerpo híbrido en el que una región constante de cadena pesada (denominada en la presente memoria en adelante "tipo 113F"), que tiene una actividad CDC elevada y que comprende una secuencia de aminoácidos en la que una parte de una región Fc de un anticuerpo IgG1 humano se sustituye por Fc de un anticuerpo IgG3 humano descrito en el documento US2007/0148165, y una región constante de cadena ligera de κ humana se ligaron a regiones variables de cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 obtenido en el Ejemplo 5(2), respectivamente. Para este fin, usando un vector de expresión de anticuerpo híbrido de tipo CDC elevada PKTX93/113F (descrito en el documento US2007/0148165) que comprende una región variable de un anticuerpo anti-CD20, y un vector pTA2 que comprende VH o VL de cada anticuerpo monoclonal obtenido en el Ejemplo 5(2), se construyó un vector de expresión de anticuerpo híbrido anti-CD4 según el siguiente procedimiento (figuras 5 y 6).

Se preparó una disolución de reacción (50 μ l) que contiene 100 ng de un vector TA2 que contiene como molde VH o VL de cada anticuerpo monoclonal, 5 μ l de amortiguador KOD Plus 10x, 5 μ l de 2 mmoles/l de dNTPs, 2 μ l de 25 mmoles/l de cloruro de magnesio, 2,5 μ l de DMSO, 1 μ l de KOD Plus polimerasa (fabricada por Toyobo), y 1 μ l de cada uno de 10 μ moles/l de cebadores específicos para VH y VL de cada anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4. Usando la disolución así preparada, se llevó a cabo la PCR según lo siguiente: calentamiento a 94°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos que consisten cada uno en una reacción a 94°C durante 15 segundos, una reacción a 60,6°C durante 30 segundos, y una reacción a 68°C durante 1 minuto. Los cebadores de VH de KM4065 se representan mediante SEC ID NOs: 57 y 58, y los cebadores de VL del mismo se representan mediante SEC ID NOs: 59 y 60; los cebadores de VH de KM4066 se representan mediante SEC ID NOs: 61 y 62, y los cebadores de VL del mismo se representan mediante SEC ID NOs: 63 y 64; los cebadores de VH de KM4067 se representan mediante SEC ID NOs: 65 y 66, y los cebadores de VL del mismo se representan mediante SEC ID NOs: 67 y 68; los cebadores de VH de KM4068 se representan mediante SEC ID NOs: 69 y 70, y los cebadores de VL del mismo se representan mediante SEC ID NOs: 71 y 72; y los cebadores de VH de KM4069 se representan mediante SEC ID NOs: 73 y 74, y los cebadores de VL del mismo se representan mediante SEC ID NOs: 75 y 76, respectivamente.

Cada producto de la PCR se purificó usando un Kit de Purificación de PCR (fabricado por Qiagen). La VH obtenida de cada anticuerpo se trató con enzimas de restricción *Apal* (fabricada por New England Biolabs) y *NotI* (fabricada por New England Biolabs), obteniendo de ese modo un fragmento de *NotI*-*Apal* de VH. Además, VL de cada anticuerpo se trató con enzimas de restricción *Bs*MI (fabricada por New England Biolabs) y *Eco*RI (fabricada por New England Biolabs), obteniendo de ese modo un fragmento de *Eco*RI-*Bs*MI de VL. Además, el vector de expresión del anticuerpo híbrido de tipo CDC elevada PKTX93/113F también se sometió a tratamientos con enzimas de restricción *NotI* y *Apal*, o *Eco*RI y *Bs*MI. Al igual que con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(1), se obtuvo un vector en el que se clonó un ADNc que codifica VH de los anticuerpos monoclonales anti-CD4 KM4065 a KM4069, y un vector en el que se clonó un ADNc que codifica VL de cada uno de los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4065 a KM4069. Se añadieron enzimas de restricción *Eco*RI y *NotI* para tratar el vector PKTX93/113F obtenido en el que se incorporó VH o VL de cada anticuerpo, obteniendo de ese modo un fragmento de *NotI*-*Eco*RI del vector PKTX93/113F en el que se incorporó un fragmento de *Eco*RI-*NotI* de VL y VH. Al igual que con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1(1), se obtuvo un vector de expresión de un anticuerpo híbrido anti-CD4 en el que se clonó cada uno de los ADNc que codifican VH y VL de cada uno de los anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 KM4065 a KM4069. En la figura 6 se muestra un esquema para la construcción del vector. Además, los anticuerpos híbridos anti-CD4 preparados a partir de los anticuerpos monoclonales anti-CD4 KM4065 a KM4069 se definen como anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049, respectivamente (Tabla 3).

[Tabla 3]

Anticuerpo monoclonal de rata	Anticuerpo híbrido
KM4065	KM4045
KM4066	KM4046
KM4067	KM4047
KM4068	KM4048
KM4069	KM4049

(2) Expresión de anticuerpo híbrido anti-CD4 usando células de animal

Usando el vector de expresión de anticuerpo híbrido anti-CD4 obtenido en el Ejemplo 6(1), el anticuerpo híbrido anti-CD4 en una célula de animal se expresó mediante un método convencional [Antibody Engineering, A Practical Guide, W.H. Freeman y Company (1992)] para obtener transformantes KM4045 a KM4049 que producen anticuerpos híbridos anti-CD4. Como célula de animal para expresar el anticuerpo deseado, se usó una estirpe celular CHO/DG44 en la que se genosuprimió doblemente un gen de $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa (FUT8) (en adelante denominada en la presente memoria "célula CHO genosuprimida para FUT8"). Se sabe que la fucosa no se añade a una estructura central de una cadena de azúcar enlazada mediante N-glicósido de tipo complejo del anticuerpo expresado en esta célula hospedante (documento WO2002/31140).

(3) Obtención de anticuerpo híbrido purificado

Tras cultivar cada uno de los transformantes KM4045 a KM4049 obtenidos en la Sección (2) mediante un método de cultivo convencional, las suspensiones celulares se recuperaron y se centrifugaron a 3000 rpm y 4°C durante 20 minutos para recuperar el sobrenadante de cultivo. Después, los sobrenadantes de cultivo se esterilizaron mediante filtración usando un filtro Millex GV de 0,22 μ m de tamaño de poros (fabricado por Millipore). Los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049 se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos, usando una columna de resina de alta capacidad de Proteína A (fabricada por Millipore) según las instrucciones anejas a la misma.

(4) Preparación de anticuerpo tipo IgG1 y anticuerpo tipo 113F de anticuerpo humano anti-CD4 6G5

A fin de comparar la actividad del anticuerpo monoclonal anti-CD4 de la presente invención, se prepararon dos anticuerpos (denominados en la presente memoria en adelante "6G5-1" y "6G5-113F") que comprenden una región variable del anticuerpo humano anti-CD4 convencional 6G5 y una región Fc de IgG humana convencional o una región Fc de tipo 113F de actividad CDC elevada.

Un gen que codifica VH y VL del anticuerpo humano anti-CD4 6G5 se construyó llevando a cabo la PCR usando los oligo ADN sintéticos representados mediante SEC ID NOs: 89 a 92, los oligo ADN sintéticos representados mediante SEC ID NOs: 83 a 88, y un cebador T3 y un cebador T7 situados en ambos extremos de la región variable, en base a la información de secuencia descrita en el documento US20060183195. El fragmento génico de VH o VL amplificado mediante PCR del anticuerpo 6G5 se ligó en un vector pBluescript II sk(-) vector (fabricado por Stratagene) para la subclonación. Subsiguientemente, al igual que con el procedimiento en el Ejemplo 1 o en el Ejemplo 6(2), se construyó un vector de expresión 6G5.1-1 y un vector de expresión 6G5.1-113F (figura 7). El vector de expresión 6G5.1-1 construido se expresó tanto en la célula CHO/DG44 como en la célula CHO genosuprimida para FUT8 (documento WO2002/31140), y el vector de expresión 6G5.1-113F se expresó en la célula CHO genosuprimida para FUT8. La introducción del vector de expresión, la obtención de la cepa celular de expresión, el cultivo celular, y la purificación de los anticuerpos se llevaron a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 6(2) y (3). Como resultado, se obtuvo un anticuerpo 6G5-1 (en adelante denominado en la presente memoria "6G5-1") en el que la fucosa está unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor en una cadena de azúcar enlazada mediante N-glicósido de tipo complejo del anticuerpo a través del enlace α -1,6, y se obtuvo un anticuerpo 6G5-1 (en adelante denominado en la presente memoria "6G5-P") al que la fucosa no está unida a él, y se obtuvo un anticuerpo 6G5-113F (en adelante denominado en la presente memoria "6G5-113F") en el que la fucosa no está unida a una cadena de azúcar enlazada mediante N-glicósido de tipo complejo de la región Fc del anticuerpo.

(5) Determinación del contenido de fucosa en el anticuerpo híbrido anti-CD4

Según el método descrito en el documento WO2002/31140, se examinó la relación de una cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa no está unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la cadena de azúcar enlazada mediante N-glicósido de tipo complejo de la región Fc de cada anticuerpo híbrido anti-CD4 y anticuerpo 6G5-1 a través del enlace α al todo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

A partir de estos resultados, se demostró que la fucosa no se añadió al anticuerpo híbrido preparado en el Ejemplo 6(3).

[Tabla 4]

Contenido de fucosa en anticuerpo híbrido anti-CD4	
KM4045	0%
KM4046	0%
KM4047	0%
KM4048	0%
KM4049	0%
6G5-1	100%

Ejemplo 7Evaluación de la actividad del anticuerpo híbrido anti-CD4

En las siguientes secciones (1) a (4), se llevó a cabo la evaluación de la actividad para los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049 obtenidos en el Ejemplo 6 y 6G5-1, 6G5-P y 6G5-113F preparados en el Ejemplo 6(5).

(1) Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo híbrido anti-CD4 a CD4 humana recombinante mediante ELISA de unión

El ELISA de unión se llevó a cabo como en el mismo procedimiento como se describe en el Ejemplo 2(3). Como anticuerpo primario, se usaron los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049 obtenidos en el Ejemplo 6, y 6G5-1, 6G5-P y 6G5-113F, que se diluyeron 5 veces en serie desde 1 µg/ml. Los resultados se muestran en la figura 8.

Como resultado, se encontró que todos los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049, 6G5-1, 6G5-P y 6G5-113F se unen a la CD4 humana recombinante. Además, se encontró que los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045, KM4046, KM4048 y KM4049 se unen a la CD4 recombinante de forma más fuerte que 6G5-1, 6G5-P y 6G5-113F.

(2) Evaluación a base de Biacore de la actividad de unión del anticuerpo híbrido anti-CD4 a CD4 humana recombinante

Para analizar cinéticamente la actividad de unión de anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049, 6G5-1 y 6G5-P a CD4 humana recombinante, la actividad de unión se midió mediante el método de resonancia de plasmones superficiales (SPR). Todas las manipulaciones siguientes se llevaron a cabo usando un Biacore T100 (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences). El anticuerpo anti-IgG humana se inmovilizó sobre una matriz sensora CM5 (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences) mediante un método de acoplamiento de amina usando un Kit de Captura de anticuerpo humano (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences) según los protocolos adjuntos al mismo. Se añadió una muestra de ensayo (anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049) para ser capturada sobre la matriz que tiene inmovilizado el anticuerpo anti-IgG humana, para dar 100 RU (unidad de resonancia). Después, se dejó pasar CD4 humana recombinante (fabricada por R&D), diluida a partir de 2500 ng/ml en cinco etapas, a un caudal de 30 µl/min. sobre la matriz, y se obtuvo el sensograma correspondiente a cada concentración. El análisis se llevó a cabo en el modelo de unión 1:1 usando un software de análisis adjunto al aparato, software de evaluación de Biacore T100 (fabricado por Biacore), calculando de ese modo una constante de velocidad de asociación k_a y una constante de velocidad de disociación k_d de los anticuerpos respectivos para CD4 humana.

Como resultado, en la Tabla 5 se da una constante de velocidad de asociación k_a , una constante de velocidad de disociación k_d , y una constante de disociación K_D (k_d/k_a) de anticuerpos individuales así obtenidos.

Como se muestra en la Tabla 5, todos los anticuerpos híbridos KM4045 a KM4049 mostraron una afinidad mayor que la del anticuerpo humano anti-CD4 convencional 6G5-1.

[Tabla 5]

Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
KM4045	3,60 E+05	2,97 E-08*	8,24 E-14
KM4046	8,34 E+05	5,12 E-05	6,14 E-11
KM4047	1,33 E+06	4,88 E-04	3,69 E-10
KM4048	5,85 E+06	3,81 E-03	6,51 E-10
KM4049	5,77 E+06	1,16 E-03	2,00 E-10
6G5-1	5,95 E+05	8,72 E-04	1,46 E-09

*KM4045 mostró una disociación lenta, y el valor superó un límite medible de una constante de velocidad de disociación k_d (1×10^{-5}) indicado por el marcador en este sistema.

(3) Evaluación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC) de anticuerpo híbrido anti-

CD4 en estirpes celulares de cáncer de la sangre humano

La actividad ADCC de los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049, 6G5-1, 6G5-P, y 6G5-113F, en las estirpes celulares de linfoma de células T humano, se midió de la siguiente manera.

(3)-1 Preparación de suspensión celular diana

Las estirpes celulares de linfoma de células T humano HPB-ALL y HUT78 y la estirpe celular de linfoma linfoblástico de células T SUP-T1 se lavaron con PBS, se lavaron con medio RPMI1640 libre de rojo de fenol (fabricado por Invitrogen) que contiene 5% de suero fetal bovino dializado (dFBS, fabricado por Invitrogen) (en adelante denominado en la presente memoria "medio ADCC"), y entonces se suspendieron en el mismo medio para dar una concentración óptima y se usaron como una suspensión celular diana.

(3)-2 Preparación de suspensión de células efectoras

A partir de sangre periférica humana sana, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de la siguiente manera. A partir de voluntarios sanos, se recogieron 50 ml de sangre periférica humana sana usando una jeringuilla a la que se añadieron 0,5 ml de heparina sódica (fabricada por Shimizu Pharmaceutical). A la sangre periférica recogida se añadió un volumen igual de disolución salina fisiológica (fabricada por Otsuka Pharmaceutical) para la dilución, seguido de la agitación a conciencia. Después, se dispensaron 4,7 ml de Lymphoprep (fabricado por Axis-Shield) en cada uno de tubos de 15 ml (fabricados por Greiner). La sangre periférica diluida (10 ml) se depositó suavemente en capas sobre el Lymphoprep. A continuación, la capa de células mononucleares se separó mediante centrifugación a 2000 rpm, ruptura, y temperatura ambiente durante 20 minutos. La fracción de células mononucleares así obtenida se lavó dos veces con un medio ADCC, y entonces se suspendió en el mismo medio para dar un recuento celular óptimo, y se usó como una suspensión de células efectoras.

(3)-3 Medida de la actividad ADCC

La actividad ADCC se midió mediante el siguiente procedimiento, usando un Ensayo de Citotoxicidad No Radiactivo CytoTox96 (fabricado por Promega) según las instrucciones adjuntas al mismo.

Se dispensó una disolución de anticuerpo (50 µl/pocillo), en la que cada anticuerpo se diluyó 20 veces en serie a partir de 2 µg/ml o 1 µg/ml, a una placa de fondo en forma de U de 96 pocillos (fabricada por Falcon). A continuación, se le dispensaron $2,5 \times 10^4$ células/50 µl/pocillo de la suspensión celular diana preparada en la Sección (3)-1. Finalmente, se le dispensaron 2×10^5 células/50 µl/pocillo de la suspensión de células efectoras preparada en la Sección (3)-2 para dar un volumen total de 150 µl, seguido de la reacción a 37°C durante 4 horas. Por lo tanto, el experimento se llevó a cabo a una relación 8:1 de célula efectora (E):célula diana (T). La actividad ADCC se calculó mediante la siguiente fórmula. Los resultados se muestran en la FIG. 9.

(Fórmula)

$$\text{Actividad ADCC (\%)} = \frac{([\text{absorbancia de la muestra}] - [\text{absorbancia de liberación espontánea de la célula diana}] - [\text{absorbancia de liberación espontánea de célula efectora}])}{([\text{absorbancia de liberación total de célula diana}] - [\text{absorbancia de liberación espontánea de célula diana}])} \times 100$$

Como resultado, el anticuerpo humano anti-CD4 convencional 6G5-1 no mostró actividad ADCC sobre la estirpe celular de linfoma de células T humano HPB-ALL, mientras que 6G5-P y 6G5-113F, al que una fucosa central no estaba unida a la cadena de azúcar enlazada mediante N-glicósido de tipo complejo de la región Fc del anticuerpo, mostraron actividad ADCC elevada. Por otro lado, la actividad ADCC de 6G5-P y 6G5-113F fue casi la misma (figura 9A). Estos resultados son consistentes con los resultados descritos en el documento US 7.214.775 y en Cancer Res 2008; 68: (10): 3863-72.

Además, todos los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045, KM4046, KM4047, KM4048 y KM4049 de la presente invención exhibieron una actividad ADCC elevada igual o mayor que 6G5-P sobre las estirpes celulares de linfoma de células T humano HUT78 y la estirpe celular de linfoma linfoblástico de células T humano SUP-T1 (figuras 9B y C). Además, todos los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045, KM4046, KM4048 y KM4049 exhibieron una actividad ADCC mayor que 6G5-113F sobre la estirpe celular de linfoma de células T humano HPB-ALL (figura 9D).

A partir de estos resultados, se demostró que todos los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045, KM4046, KM4047, KM4048 y KM4049 de la presente invención exhibieron actividad ADCC elevada igual o mayor que el anticuerpo humano anti-CD4 convencional.

(4) Evaluación de la citotoxicidad celular dependiente del complemento (actividad CDC) del anticuerpo híbrido anti-CD4 sobre transfectante de CD4 y sobre la estirpe celular de linfoma de células T humano

La actividad CDC de los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 a KM4049 sobre el transfectante de CD4 construido en el Ejemplo 1 y sobre la estirpe celular de linfoma de células T humano HPB-ALL se midió de la misma manera como en el Ejemplo 4(3).

Como resultado, el anticuerpo humano anti-CD4 convencional 6G5-1 y el anticuerpo humano anti-CD4 convencional 6G5-113F que tiene un Fc de tipo 113F con un intercambio de dominio parcial de Fc de IgG1 en Fc de IgG3 no mostraron actividad CDC sobre el transfectante de CD4, mientras que todos los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045, KM4046, KM4047, KM4048 y KM4049 de la presente invención mostraron una actividad CDC (figura 10A). Por otro lado, el anticuerpo humano anti-CD4 convencional 6G5-113F que tiene una Fc de tipo 113F con un intercambio de dominio parcial de Fc de IgG1 en Fc de IgG3, el anticuerpo de ratón anti-CD4 convencional OKT4, y los anticuerpos híbridos anti-CD4 KM4045 y KM4046 de la presente invención no mostraron actividad CDC sobre la estirpe celular de linfoma de células T humano HPB-ALL, y solamente el anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4049 de la presente invención mostró una actividad CDC sobre la estirpe celular de linfoma de células T humano (figura 10B).

Ejemplo 8

Preparación de anticuerpo humanizado

(1) Diseño de secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpo humanizado anti-CD4

Una secuencia de aminoácidos de VH de un anticuerpo humanizado anti-CD4 se diseñó de la siguiente manera. En primer lugar, a fin de injertar las secuencias de aminoácidos de CDR1 a CDR3 de un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065VH representadas por SEC ID NOs: 27 a 29, se seleccionó la secuencia de aminoácidos de FR de VH de un anticuerpo humano. Usando como sistema de análisis de secuencia el paquete GCG (fabricado por Genetics Computer Group), se recuperó mediante el método de BLASTP [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)], en base a la base de datos de aminoácidos de proteínas convencionales, un anticuerpo humano que tiene una homología elevada con el anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065. Cuando la puntuación de la homología se comparó con la homología de una secuencia de aminoácidos real, nº de acceso de base de datos SWISSPROT AAC18328, la autorreactividad y la expresión del gen VH de la inmunoglobulina en seres humanos envejecidos (en adelante denominada en la presente memoria "AAC18328") mostraron una homología de 84,2%. Puesto que fue un anticuerpo humano el que tuvo la homología más elevada, se seleccionó la secuencia de aminoácidos de FR de este anticuerpo. Con respecto a la secuencia de aminoácidos de FR de AAC18328, mostró una supresión de un resto de aminoácido (el primer resto) en el término N del anticuerpo secretor dado a conocer por Kabat et al. [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]. Para el resto en la primera posición, se seleccionó Glu, que es un resto de aminoácido exhibido por el anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065. Además, con respecto a Val en la posición 11^a, Val se sustituyó por Leu, que fue un resto de aminoácido que apareció a una frecuencia elevada en la secuencia del anticuerpo humano y que se exhibía en el anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065. Puesto que estos restos de aminoácidos se encuentran a una frecuencia elevada en cualquier secuencia de anticuerpo humano [Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Service (1991)], no se construyen como desviados de la secuencia de anticuerpo humano.

Las secuencias de aminoácidos de las CDRs de VH del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065 representadas por SEC ID NOs: 27 a 29, respectivamente, se injertaron en una posición apropiada de la secuencia de aminoácidos así determinada de FR del anticuerpo humano. De esta manera, se diseñó la secuencia de aminoácidos HV0 de VH de un anticuerpo humanizado anti-CD4 representada por SEC ID NO: 77.

A continuación, se diseñó una secuencia de aminoácidos de VL de un anticuerpo humanizado anti-CD4 de la siguiente manera.

Se seleccionó una secuencia de aminoácidos de FR de VL de un anticuerpo humano para injertar las secuencias de aminoácidos de CDR1 a CDR3 de un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065VL representadas por SEC ID NOs: 30 a 32, respectivamente. Kabat et al. han clasificado VL de diversos anticuerpos humanos convencionalmente conocidos en cuatro subgrupos (HSG I a IV) en base a la homología de sus secuencias de aminoácidos, y dieron a conocer las secuencias de consenso para cada uno de los [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]. En consecuencia, se examinó la homología entre la secuencia de aminoácidos de FR de las secuencias de consenso de los subgrupos I a IV de VL del anticuerpo humano y la secuencia de aminoácidos de FR de VL del anticuerpo de rata anti-CD4 KM4065.

Como resultado de recuperar la homología, la secuencia de aminoácidos de FR de KM4065VL tuvo una homología elevada de 72,2% con HSGI. En base a estos resultados, la secuencia de aminoácidos de CDR de VL del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065 se injertó en una posición apropiada de una secuencia de aminoácidos de FR de la secuencia de consenso del subgrupo I de VL del anticuerpo humano. Sin embargo, puesto que Leu en la posición 24 y Leu en la posición 128 en la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065 representada por SEC ID NO: 22 no son los restos de aminoácidos que tienen la frecuencia de uso más elevada en la región que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la FR del anticuerpo humano citada

por Kabat et al., sino que son los restos de aminoácidos que se usan a una frecuencia relativamente elevada, se usaron los restos de aminoácidos mencionados anteriormente que se reconocen en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065. De esta manera, se diseñó la secuencia de aminoácidos LV0 de VL de un anticuerpo humanizado anti-CD4 representada por SEC ID NO: 78.

La secuencia de aminoácidos HV0 de VH y la secuencia de aminoácidos LV0 de VL del anticuerpo humanizado anti-CD4 diseñado en lo anterior son secuencias en las que la secuencia de aminoácidos de CDR del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065 sola se injertó en la secuencia de aminoácidos de FR del anticuerpo humano seleccionada, pero en general, cuando se prepara un anticuerpo humanizado, su actividad de unión se reduce frecuentemente en el caso de meramente un simple injerto de una secuencia de aminoácidos de CDR de un anticuerpo de ratón a una FR de anticuerpo humano. Por estas razones, a fin de evitar la disminución de la actividad de unión, se llevaron a cabo, junto con el injerto de las secuencias de aminoácidos de CDR, modificaciones de los restos de aminoácidos que se consideran que tienen una influencia sobre la actividad de unión, entre los restos de aminoácidos de FR que son diferentes entre los anticuerpos humanos y los anticuerpos de ratón. De este modo, también en este ejemplo, los restos de aminoácidos de FR que se consideran que tienen una influencia sobre la actividad de unión se identificaron de la siguiente manera.

En primer lugar, usando una técnica de modelado por ordenador, se construyó una estructura tridimensional de una región V de anticuerpo (HV0LV0) que consiste en la secuencia de aminoácidos HV0 de VH y la secuencia de aminoácidos LV0 de VL del anticuerpo humanizado anti-CD4 diseñado en lo anterior. La preparación de las coordenadas de la estructura tridimensional se llevó a cabo usando un software AbM (fabricado por Oxford Molecular) según las instrucciones adjuntas al mismo, y se llevó a cabo la presentación de la estructura tridimensional usando un software Pro-Explore (fabricado por Oxford Molecular) o ViewerLite (fabricado por Accelrys) según las instrucciones adjuntas al mismo. Además, también se construyó de la misma manera un modelo por ordenador de la estructura tridimensional de la región V del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065. Además, construyendo de forma similar un modelo de estructura tridimensional que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de FR de VH y VL de HV0LV0, que son diferentes de aquellos del anticuerpo de rata anti-CD4 KM4065, se seleccionaron y modificaron en los restos de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065, se compararon las estructuras tridimensionales de las regiones V del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065, de HV0LV0 y del producto modificado, con lo que se identificaron los restos de aminoácidos que se predice que tienen una influencia sobre la actividad de unión del anticuerpo.

Como resultado, como los restos de aminoácidos entre los restos de aminoácidos de FR de HV0LV0, que se considera que cambian una estructura tridimensional de la región de unión al antígeno y por lo tanto tienen una influencia sobre la actividad de unión del anticuerpo, se seleccionaron respectivamente Leu en la posición 18, Val en la posición 93, Ala en la posición 97, y Thr en la posición 114 en la secuencia de HV0, y Ala en la posición 13, Val en la posición 15, Val en la posición 19, Ala en la posición 47, Val en la posición 62, y Leu en la posición 82 en la secuencia de LV0. Modificando al menos uno o más restos de aminoácidos de estos restos de aminoácidos seleccionados en los restos de aminoácidos que están presentes en las mismas posiciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065, se diseñaron VH y VL de un anticuerpo humanizado que tiene diversas modificaciones. Específicamente, con respecto a la VH del anticuerpo, se introdujo al menos una modificación entre las modificaciones de aminoácidos para sustituir Leu en la posición 18 por Met, Val en la posición 93 por Thr, Ala en la posición 97 por Thr, y Thr en la posición 114 por Ile, en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 77. Además, con respecto a la VL del anticuerpo, se introdujo al menos una modificación entre las modificaciones de aminoácidos para sustituir Ala en la posición 13 por Val, Val en la posición 15 por Leu, Val en la posición 19 por Ala, Ala en la posición 47 por Gln, Val en la posición 62 por Ile, y Leu en la posición 82 por Val, en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 78.

Diseñando las secuencias de aminoácidos de regiones variables de HV2LV0, HV3LV0, HV4LV0, y HV4LV6 con modificaciones de al menos uno de los restos de aminoácidos presentes en FR de HV0LV0, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena H HV2, HV3 y HV4, y de la región variable de la cadena L LV6 se representaron mediante SEC ID NOs: 96, 98, 100 y 102, respectivamente.

(2) Preparación y evaluación de anticuerpo humanizado anti-CD4

Se construyó en células de mamífero un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo humanizado anti-CD4 usando un codón que se usó a una frecuencia elevada, cuando se lleva a cabo una modificación o modificaciones de aminoácidos usando un codón que se usa como un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de VH o VL del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 KM4065. Las secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos de HV0 y LV0 del anticuerpo humanizado anti-CD4 se representaron mediante SEC ID NOs: 93 y 94, respectivamente, mientras que las secuencias de ADN que codifican las secuencia de aminoácidos de regiones variables HV2, HV3, HV4, y LV6 en las que se introdujeron una modificación o modificaciones de aminoácidos se representaron mediante SEC ID NOs: 95, 97, 99 y 101, respectivamente. Cada secuencia de ADN se construyó mediante la síntesis completa. Al igual que en el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6, el ADN de la síntesis completa que codifica cada región variable se insertó en el vector de expresión del

anticuerpo humanizado pKANTEX93 para construir un vector de expresión de anticuerpo humanizado anti-CD4. El vector de expresión de anticuerpo humanizado anti-CD4 construido se introdujo en una célula de animal para expresar un anticuerpo humanizado, preparando de ese modo anticuerpos humanizados anti-CD4 HV0LV0, HV2LV0, HV3LV0, HV4LV0 y HV4LV6.

Cuando la actividad de unión de los anticuerpos humanizados anti-CD4 obtenidos se midió usando un Biacore T100, todos los anticuerpos humanizados anti-CD4 preparados HV2LV0, HV3LV0, HV4LV0 y HV4LV6 exhibieron una actividad de unión igual a o 1/2 o mayor que la del anticuerpo híbrido anti-CD4 KM4045. Por lo tanto, se preparó un anticuerpo humanizado anti-CD4 que tiene una actividad de unión elevada.

Ejemplo 9

Evaluación de la actividad de unión de anticuerpo humanizado

La evaluación de la actividad de unión se llevó a cabo para los anticuerpos humanizados anti-CD4 HV0LV0, HV2LV0, HV3LV0, HV4LV0 y HV4LV6 preparados según el método descrito en el Ejemplo 8.

(1) Evaluación en base a Biacore de la actividad de unión de anticuerpo humanizado anti-CD4 a CD4 humana recombinante

La medida de la actividad de unión se llevó a cabo según el método descrito en el Ejemplo 7(2). En la Tabla 6 se mostraron la constante de velocidad de asociación k_a , la constante de velocidad de disociación k_d y la constante de disociación K_D (kd/ka) de los anticuerpos respectivos así obtenidos.

Como resultado, los anticuerpos humanizados HV0LV0, HV2LV0, HV3LV0, HV4LV0, y HV4LV6 mantuvieron una actividad de unión muy fuerte de 1×10^{-10} M o mayor. Esta fue una actividad de unión equivalente a la del anticuerpo híbrido KM4045. Y la actividad de unión fue mayor que la de 6G5-1.

[Tabla 6]

anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
KM4045	5,41E+05	< 1E-05*	< 1,84E-11*
HV0LV0	1,47E+06	2,86E-05	1,95E-11
HV2LV0	1,14E+06	< 1E-05*	< 8,77E-12*
HV3LV0	1,33E+06	< 1E-05*	< 7,52E-12*
HV4LV0	7,91E+05	< 1E-05*	< 1,26E-11*
HV4LV6	4,03E+05	< 1E-05*	< 2,48E-11*
6G5-1	5,34E+05	8,24E-04	1,54E-09

* Puesto que KM4045, HV2LV0, HV3LV0, HV4LV0, y HV4LV6 exhibieron una disociación baja, los valores excedieron un límite medible de una constante de velocidad de disociación k_d (1×10^{-5}) indicado por el marcador en este sistema.

(2) Evaluación de la actividad de unión a estirpe celular de linfoma de células T positiva para CD4 usando citómetro de flujo

Se evaluó la reactividad de diversos anticuerpos anti-CD4 a células. Como anticuerpos para la evaluación, se usaron el anticuerpo híbrido KM4045, los anticuerpos humanizados HV0LV0, HV2LV0, HV3LV0, HV4LV0 y HV4LV6, y los anticuerpos humanos 6G5-1 y 6G5-P.

Para inhibir la unión no específica de un anticuerpo de ensayo, se añadió una IgG humana (fabricada por Sigma) a una concentración final de 1 mg/ml a 1 a 5×10^5 células de la estirpe celular de linfoma de células T humano HPB-ALL. Además, se diluyeron apropiadamente diversos anticuerpos anti-CD4 con BSA-PBS y se añadieron para dar un volumen total de 50 μ l. La suspensión celular resultante se hizo reaccionar en hielo durante 90 minutos, y se lavó dos veces con BSA-PBS. A las células, se añadieron 50 μ l de un anticuerpo anti-Fc de IgG humana marcado con FITC (fabricado por Acris) diluido con BSA-PBS, seguido de la reacción en hielo durante 90 minutos. Las células se lavaron una vez con BSA-PBS y entonces se suspendieron en BSA-PBS. La intensidad de la fluorescencia se midió mediante un citómetro de flujo (fabricado por Beckman Coulter). La figura 11 muestra la intensidad de fluorescencia media (valor de MFI) cuando el anticuerpo se hizo reaccionar a una concentración de 6,7, 0,67 y 0,067 μ g/ml. Todos los anticuerpos humanizados anti-CD4 se unieron a la estirpe celular positiva para CD4 de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo. Cada uno de los grados de unión fue equivalente al del anticuerpo híbrido KM4045.

Ejemplo 10

Evaluación de eficacia medicinal *in vitro* de anticuerpo humanizado HV2LV0

El anticuerpo humanizado anti-CD4 HV2LV0 preparado en el Ejemplo 8 se denomina en la presente memoria en adelante como KM8045. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC) del anticuerpo humanizado anti-CD4 sobre una estirpe celular de cáncer de sangre humano se evaluó según el método descrito en el Ejemplo 7(3). Como célula diana, se usaron tres tipos de células, es decir, las estirpes celulares de linfoma de células T humano HPB-ALL, HUT78, y CCRF-CEM. Además, como anticuerpo, se usó el anticuerpo humanizado KM8045, el anticuerpo híbrido KM4045, y los anticuerpos humanos 6G5-1 y 6G5-P.

Como resultado, el anticuerpo humanizado KM8045 exhibió, en cualquier estirpe celular, una actividad ADCC elevada equivalente a la del anticuerpo híbrido KM4045, y también exhibió una actividad ADCC igual o mayor que la de 6G5-P. 6G5-1 exhibió solamente una actividad ADCC débil sobre HPB-ALL y HUT78, y no exhibió actividad ADCC sobre CCRF-CEM (figura 12).

Ejemplo 11

Evaluación de eficacia medicinal *in vivo* de anticuerpo humano KM8045

(1) Modelo de cáncer de ratón de etapa temprana usando como diana la estirpe celular de linfoma de células T humano HH

La estirpe celular de linfoma de células T humano cultivada *in vitro* HH se suspendió a una densidad de 1×10^8 células/ml en medio RPMI1640 (Gibco BRL). Se trasplantaron subcutáneamente 100 μ l (1×10^7 células/ratón) de la suspensión en el abdomen derecho de ratones SCID (machos, 8 semanas, adquiridos de CLEA Japan). El anticuerpo humanizado anti-CD4 KM8045 o el anticuerpo humano anti-CD4 6G5P se diluyó para dar 1 μ g/100 μ l/cabeza, y se administró intravenosamente a los ratones en los Días 0, 3 y 5, tres veces en total. Al grupo de control negativo se le administró PBS sola. El día del trasplante del tumor se tomó como Día 0, y el diámetro de la masa tumoral se midió día a día usando calibradores vernier. El volumen tumoral se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen Tumoral} = \text{Anchura} \times \text{Anchura} \times \text{Longitud} \times 0,5$$

En la figura 13 se muestran los cambios a lo largo de los días en el valor medio del volumen tumoral de cada grupo. Como se muestra en la figura 13, el grupo al que se le administró 6G5-P mostró efectos antitumorales solamente débiles en comparación con el grupo de control negativo, mientras que el grupo al que se le administró KM8045 exhibió efectos antitumorales significativos.

A partir de estos resultados, se demostró que el anticuerpo humanizado anti-CD4 KM8045 tiene mayores efectos antitumorales que 6G5-P sobre el modelo de cáncer de ratón de etapa temprana en el que se usa como diana una célula HH.

(2) Modelo de metástasis de ratón usando como diana EL4 que expresa CD4

CD4/EL4, construida en el Ejemplo 1(3), se cultivó *in vitro* y se suspendió a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio RPMI1640 (Gibco BRL). Se trasplantaron 100 μ l/cabeza (1×10^5 células/cabeza) de la suspensión celular en la vena de la cola de ratones C57BL/6 (machos, 8 semanas, adquiridos de CLEA Japan). El día del trasplante del tumor se definió como Día 0, y en el Día 1. Cada uno del anticuerpo humanizado anti-CD4 KM8045 y de los anticuerpos humanos anti-CD4 6G5-P y 6G5-1 se preparó para que tuviesen 0,2 μ g/100 μ l/cabeza y 2 μ g/100 μ l/cabeza, y entonces se administraron intravenosamente a una dosis de 100 μ l/cabeza a los ratones. Al grupo de control negativo se le administró PBS sola, o un anticuerpo de control de isotipo. En el Día 14, se midió el peso corporal de todos los ratones, y los ratones se sacrificaron mediante exsanguinación bajo anestesia con éter, seguido de la dislocación cervical. Después, el hígado y el riñón se recogieron y se pesaron. Entonces, se calculó como porcentaje la relación del peso del hígado y del peso del riñón con respecto al peso corporal de los ratones individuales (en adelante denominada en la presente memoria "relación del peso del hígado" y "relación del peso del riñón"). La evaluación de los efectos antitumorales se llevó a cabo comparando las relaciones de los pesos del hígado y del riñón de cada grupo, que aumentó debido a la metástasis de las células tumorales, con las relaciones de los pesos del hígado y del riñón medidas al mismo tiempo (valor medio de tres ratones) de ratones sanos a los que no se les había trasplantado el tumor. En las figuras 14A y 14B, respectivamente, se muestran la relación del peso del hígado y la relación del peso del riñón de cada grupo. Como se muestra en las figuras 14A y 14B, el grupo al que se le administró 6G5-1 no exhibió efectos antitumorales con respecto al grupo de control negativo, mientras que el grupo al que se le administró 6G5-P y el grupo al que se le administró KM8045 exhibieron efectos antitumorales. Además, se reconocieron efectos antitumorales más potentes en el grupo al que se le administró KM8045 que en el grupo al que se le administró 6G5-P.

A partir de estos resultados, se demostró que KM8045 tiene efectos antitumorales mayores que 6G5-1 y 6G5-P sobre el modelo de metástasis de ratón cuando se usa como diana CD4/EL4.

(3) Modelo de cáncer progresivo de ratón usando como diana la estirpe celular de linfoma de células T humano HH

Al igual que con el Ejemplo 11(3), la estirpe celular HH cultivada *in vitro* se suspendió a una densidad de 1×10^8 células/ml en medio RPMI1640 (Gibco BRL). Se trasplantaron subcutáneamente 100 μ l/cabeza (1×10^7 células/cabeza) de la suspensión en el abdomen derecho de ratones SCID (machos, 8 semanas, adquiridos de CLEA Japan). En el Día 6 en el que el volumen tumoral tuvo un promedio de 60 mm³, los ratones se agruparon. El anticuerpo humanizado anti-CD4 KM8045 se diluyó con PBS para dar una dosis de 20, 100, y 200 μ g/100 μ l/cabeza, y se administró intravenosamente a los ratones dos veces a la semana, seis veces en total. Al grupo de control negativo se le administró PBS sola. El día del trasplante del tumor se definió como Día 0, y el diámetro de la masa tumoral se midió día a día usando calibradores vernier. El volumen tumoral se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen Tumoral} = \text{Anchura} \times \text{Anchura} \times \text{Longitud} \times 0,5$$

En la figura 15 se muestran los cambios a lo largo de los días en el valor medio del volumen tumoral de cada grupo. Como se muestra en la figura 15, el grupo al que se le administró KM8045 exhibió efectos antitumorales. A partir de la observación de que el efecto antitumoral en el grupo de 200 μ g/cabeza es mayor que en los grupos de 20 μ g/cabeza y 100 μ g/cabeza, se confirmaron los efectos antitumorales dependientes de la dosis.

A partir de estos resultados, se demostró que el anticuerpo humanizado anti-CD4 KM8045 también tuvo efectos antitumorales sobre el modelo de cáncer progresivo en el que se usó como diana una célula HH.

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar un anticuerpo monoclonal que se une a una región extracelular de CD4 humana con afinidad elevada y también exhibe una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o citotoxicidad dependiente del complemento elevadas; un ADN que codifica el anticuerpo; un vector que contiene el ADN; un transformante obtenible mediante la introducción en el vector; un procedimiento para producir un anticuerpo usando el transformante; y el uso del anticuerpo para la fabricación de un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

Texto libre en el listado de secuencias

SEC ID NO:27 : HCDR1 de KM4065
 SEC ID NO:28 : HCDR2 de KM4065
 SEC ID NO:29 : HCDR3 de KM4065
 SEC ID NO:30 : LCDR1 de KM4065
 SEC ID NO:31 : LCDR2 de KM4065
 SEC ID NO:32 : LCDR3 de KM4065
 SEC ID NO:33 : HCDR1 de KM4066
 SEC ID NO:34 : HCDR2 de KM4066
 SEC ID NO:35 : HCDR3 de KM4066
 SEC ID NO:36 : LCDR1 de KM4066
 SEC ID NO:37 : LCDR2 de KM4066
 SEC ID NO:38 : LCDR3 de KM4066
 SEC ID NO:39 : HCDR1 de KM4067
 SEC ID NO:40 : HCDR2 de KM4067
 SEC ID NO:41 : HCDR3 de KM4067
 SEC ID NO:42 : LCDR1 de KM4067
 SEC ID NO:43 : LCDR2 de KM4067
 SEC ID NO:44 : LCDR3 de KM4067
 SEC ID NO:45 : HCDR1 de KM4068
 SEC ID NO:46 : HCDR2 de KM4068
 SEC ID NO:47 : HCDR3 de KM4068
 SEC ID NO:48 : LCDR1 de KM4068
 SEC ID NO:49 : LCDR2 de KM4068
 SEC ID NO:50 : LCDR3 de KM4068
 SEC ID NO:51 : HCDR1 de KM4069
 SEC ID NO:52 : HCDR2 de KM4069
 SEC ID NO:53 : HCDR3 de KM4069
 SEC ID NO:54 : LCDR1 de KM4069
 SEC ID NO:55 : LCDR2 de KM4069
 SEC ID NO:56 : LCDR3 de KM4069
 SEC ID NO:57 : cebador híbrido 1 de KM4065VH
 SEC ID NO:58 : cebador híbrido 2 de KM4065VH
 SEC ID NO:59 : cebador híbrido 1 de KM4065VL
 SEC ID NO:60 : cebador híbrido 2 de KM4065VL
 SEC ID NO:61 : cebador híbrido 1 de KM4066VH

SEC ID NO:62 : cebador híbrido 2 de KM4066VH
 SEC ID NO:63 : cebador híbrido 1 de KM4066VL
 SEC ID NO:64 : cebador híbrido 2 de KM4066VL
 SEC ID NO:65 : cebador híbrido 1 de KM4067VH
 5 SEC ID NO:66 : cebador híbrido 2 de KM4067VH
 SEC ID NO:67 : cebador híbrido 1 de KM4067VL
 SEC ID NO:68 : cebador híbrido 2 de KM4067VL
 SEC ID NO:69 : cebador híbrido 1 de KM4068VH
 SEC ID NO:70 : cebador híbrido 2 de KM4068VH
 10 SEC ID NO:71 : cebador híbrido 1 de KM4068VL
 SEC ID NO:72 : cebador híbrido 2 de KM4068VL
 SEC ID NO:73 : cebador híbrido 1 de KM4069VH
 SEC ID NO:74 : cebador híbrido 2 de KM4069VH
 SEC ID NO:75 : cebador híbrido 1 de KM4069VL
 15 SEC ID NO:76 : cebador híbrido 2 de KM4069VL
 SEC ID NO:77 : secuencia de aminoácidos de HV0 de KM4065
 SEC ID NO:78 : secuencia de aminoácidos de LV0 de KM4065
 SEC ID NO:79 : Cebador 1 del vector de expresión de CD4
 SEC ID NO:80 : Cebador 2 del vector de expresión de CD4
 20 SEC ID NO:81 : Cebador 1 del vector de expresión de CD4-Fc
 SEC ID NO:82 : Cebador 2 del vector de expresión de CD4-Fc
 SEC ID NO:83 : Cebador 1 de 6G5VL
 SEC ID NO:84 : Cebador 2 de 6G5VL
 SEC ID NO:85 : Cebador 3 de 6G5VL
 25 SEC ID NO:86 : Cebador 4 de 6G5VL
 SEC ID NO:87 : Cebador 5 de 6G5VL
 SEC ID NO:88 : Cebador 6 de 6G5VL
 SEC ID NO:89 : Cebador 1 de 6G5VH
 SEC ID NO:90 : Cebador 2 de 6G5VH
 30 SEC ID NO:91 : Cebador 3 de 6G5VH
 SEC ID NO:92 : Cebador 4 de 6G5VH
 SEC ID NO:93 : secuencia de ADN de HV0 de KM4065
 SEC ID NO:94 : secuencia de ADN de LV0 de KM4065
 SEC ID NO:95 : secuencia de ADN de HV2
 35 SEC ID NO:96 : secuencia de aminoácidos de HV2
 SEC ID NO:97 : secuencia de ADN de HV3
 SEC ID NO:98 : secuencia de aminoácidos de HV3
 SEC ID NO:99 : secuencia de ADN de HV4
 SEC ID NO:100 : secuencia de aminoácidos de HV4
 40 SEC ID NO:101 : secuencia de ADN de LV6
 SEC ID NO:102 : secuencia de aminoácidos de LV6

Listado de secuencias

45 <110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.
 <120> Anticuerpo anti-CD4
 <130> 1001P12020
 50 <150> JP 2008-331904
 <151> 2008-12-26
 55 <160> 102
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 60 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 602 459 T3

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

ES 2 602 459 T3

Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys
 180 185 190
 Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser
 195 200 205
 Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro
 210 215 220
 Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp
 225 230 235 240
 Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu
 245 250 255
 Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu
 260 265 270
 Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu
 275 280 285
 Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys
 290 295 300
 Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr
 305 310 315 320
 Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro
 325 330 335
 Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser
 340 345 350
 Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp
 355 360 365
 Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile
 370 375 380
 Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met Ala Leu Ile
 385 390 395 400
 Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile
 405 410 415
 Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met
 420 425 430
 Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro
 435 440 445
 His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
 450 455

5 <210> 2
 <211> 1377
 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgaaccggg gagtcccttt taggcacttg cttctggtgc tgcaactggc gtcctccca    60
gcagccactc agggaaagaa agtgggtgctg ggcaaaaaag gggatacagt ggaactgacc    120
tgtacagctt cccagaagaa gagcatacaa ttccactgga aaaactcaa ccagataaag    180
attctgggaa atcagggctc cttcttaact aaaggtccat ccaagctgaa tgatcgcgct    240
gactcaagaa gaagcctttg ggaccaagga aactttcccc tgatcatcaa gaatcttaag    300
atagaagact cagataactta catctgtgaa gtggaggacc agaaggagga ggtgcaattg    360
ctagtgttcg gattgactgc caactctgac acccacctgc ttcaggggca gagcctgacc    420
ctgaccttgg agagcccccc tggtagtagc ccctcagtgc aatgtaggag tccaaggggt    480
aaaaacatac aggggggggaa gacctctcc gtgtctcagc tggagctcca ggatagtggc    540
acctggacat gcactgtctt gcagaaccag aagaagggtg agttcaaat agacatcgtg    600
gtgctagctt tccagaaggc ctccagcata gtctataaga aagaggggga acaggtggag    660
ttctccttcc cactcgctt tacagttgaa aagetgacgg gcagtggcga gctgtggtgg    720
caggcggaga gggcttcctc ctccaagtct tggatcacct ttgacctgaa gaacaaggaa    780
gtgtctgtaa aacgggttac ccaggacct aagctccaga tgggcaagaa gctcccgctc    840
cacctcacc cgtcccgagg cttgcctcag tatgctggct ctggaaacct caccctggcc    900
cttgaagcga aaacaggaaa gttgcatcag gaagtgaacc tgggtggtgat gagagccact    960
cagctccaga aaaatttgac ctgtgagggtg tggggaccca cctcccctaa gctgatgctg   1020
agcttgaaac tggagaacaa ggaggcaaag gtctcgaagc gggagaaggc ggtgtgggtg   1080
ctgaaccctg aggcggggat gtggcagtg ctgctgagt actcgggaca ggtcctgctg   1140
gaatccaaca tcaaggttct gccacatgg tccaccccg tgcagccaat ggccctgatt   1200
gtgctggggg gcgtcgccgg cctcctgctt ttcattgggc taggcattct cttctgtgtc   1260
aggtgccggc accgaaggcg ccaagcagag cggatgtctc agatcaagag actcctcagt   1320
gagaagaaga cctgccagt ccctcaccgg tttcagaaga catgtagccc catttga   1377

```

5

<210> 3

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador específico de IgG1 de rata

<400> 3

15 gtacatatc aaggcttgca atcacctc

29

<210> 4

<211> 26

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador específico de IgG2a de rata

25 <400> 4

ccacaaggat tgcattccct tggcac

26

	<210> 5	
	<211> 28	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador específico de IgG2b de rata	
10	<400> 5	
	gggcatgtag ggcattgtg tccaatgc	28
	<210> 6	
	<211> 29	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador específico de IgG kappa de rata	
20	<400> 6	
	cctgttgaag ctcttgacga cgggtgagg	29
	<210> 7	
25	<211> 417	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
	<400> 7	
	atggacatca ggctcagctt ggcttttcctt gtccttttca taaaagggtgt ccagtgtgag	60
	gtgcaactgg tagagtctgg gggcggttta gtgcagcctg gaagggtccat gaaactctcc	120
	tgtgcagcct caggattcac ttccagtaac tatggcatgg cctgggtccg ccaggctcca	180
	acgaaggggc tggagtgggt tgcaaccatt agttatgatg gaagtatcac ttattatcga	240
	gactccgtga agggccgatt cactatctcc agagatcatg caaaaagcac cctatacctg	300
	caaatgaaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaag agaggaacaa	360
30	tatagcagct ggtactttga cttctggggc ccaggaataa tggtcaccgt gtcctca	417
	<210> 8	
	<211> 429	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
	<400> 8	
	atgaatttca gcaacacctt gggttttcctt ttgtttcttt taaaagggtat cctgtgtgag	60
	gtgcagctgg aggagtctgg aggaggctta gtgcagcctg gaagggtccct gaaactctcc	120
	tgttttagcct ctggattcac ttccagtaac tatggaatga actggattcg ccaggctcca	180
	gggaagggac tggagtgggt tgcatctatt agtggtagta gcacttacat ctactatgca	240
	gacacagtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccgagaacac cctttacctg	300
	caaatgacca gtctgaggtc tgaagacact gccttgtatt actgtgctag agaggggtct	360
	tctacggatc gttactacga gggttcggtt gcctactggg gccaaaggcac tctggtcact	420
	gtctcttca	429
40	<210> 9	
	<211> 417	
	<212> ADN	

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 9

atgggatgga tctgtatcat ctttcttggtg gcaacagcta caggtgtcca ctcccaggtc	60
aagctgctgc agtctggggc tgcactgggtg aagcctggag cctctgtgaa gatgtcttgc	120
aaagcttctg gttatacatt cactgactac tgggtgcact ggggtgaagca gagtcattgga	180
aagagccttg agtggattgg ggaaatttat cctaataata atactactaa cttcaatgaa	240
aaattcaagg gcaaggccac attgactgta gacaaattca ccagcacagc ctacatggag	300
ctcagcagat tgacatctga ggactctgca atctattact gtacaagagg aactgtatat	360
tacggattag gctactttga tcaactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcttca	417

5

<210> 10

<211> 414

<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

10

<400> 10

atggctgtcc tgggtgctgtt gctctgcctg ttgatatttc caagctgtgt cctgtcccaa	60
gtgcaactaa aggagtcagg acctggctctg gtacagccat cacagaccct gtctctcacc	120
tgcactgtct ctgggttattc attaaccagc aatagtgtaa gctggattcg gcagcctcca	180
ggaaagggtc tggagtggat gggaataata tggagtaatg gagacacaga ttataattca	240
gctatcaaata cccgactgag catcagcagg gacacctcga agagccaagt tttcttaaag	300
atgaacagtc tgcaaaactga agacacagcc atgtacttct gtgccaatcc ttattatggg	360
tataacttcc cctttgatta ctggggccaa ggagtcattg tcacagtctc ctca	414

15

<210> 11

<211> 414

<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 11

atggctgtcc tgggtgctgtt gctctgcctg ttgatatttc caagctgtgt cctgtcccaa	60
gtgcaactaa aggagtcagg gcttggctctg gtacagccat cacagaccct gtctctcacc	120
tgcactgtct ctgggtcattc tttaaccagc aatagtgtaa gctggattcg gcagcctcca	180
ggaaagggtc tggagtggat ggagtaatt tggagtaatg gagacgcaga ttataattca	240
gctatcaaata cccgactgag catcagcagg gacacctcga agagccaagt tttcttaaag	300
atgaacagtc tgcaaaactga agacacagcc atgtacttct gtgccagtcc ttactatggg	360
tattacttcc cctttgatta ctggggccaa ggagtcattg tcacagtctc ctca	414

20

<210> 12

<211> 139

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

25

ES 2 602 459 T3

<400> 12

Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu
50 55 60

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

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp His Ala Lys Ser
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Phe
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Ile Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 13

<211> 143

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 13

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

Ile Leu Cys Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Glu Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ser Ser Thr Asp Arg Tyr Tyr Glu Val
115 120 125

Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 14

<211> 139

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 14

Met Gly Trp Ile Cys Ile Ile Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val
1 5 10 15

His Ser Gln Val Lys Leu Leu Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
35 40 45

Asp Tyr Trp Val His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu
50 55 60

ES 2 602 459 T3

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Asn Thr Thr Asn Phe Asn Glu
65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Phe Thr Ser Thr
85 90 95

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr
100 105 110

Tyr Cys Thr Arg Gly Thr Val Tyr Tyr Gly Leu Gly Tyr Phe Asp His
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 15

<211> 138

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 15

Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Leu Ile Phe Pro Ser Cys
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu
35 40 45

Thr Ser Asn Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile Trp Ser Asn Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
85 90 95

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Asn Pro Tyr Tyr Gly Tyr Asn Phe Pro Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 16

<211> 138

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

ES 2 602 459 T3

<400> 16

Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Leu Ile Phe Pro Ser Cys
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Leu
35 40 45

Thr Ser Asn Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Val Ile Trp Ser Asn Gly Asp Ala Asp Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln
85 90 95

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Phe Pro Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 17

5 <211> 390

<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 17

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60

gacattgtgc tgaccagtc tcctgctttg gctgtgtctc tagggcagag ggccacaatc 120

tcctgtagag ccagccaaag tgtcagtata tctagccatg atctcatgca gtggtaccaa 180

cagaaaccag gacagcaacc caaactcctc atctatgatg cattcaacct agcatctggg 240

atccctgtca gggtcagtgg cagtgggtct gggacagact tcaccctcac cattgatcct 300

gtgcaggctg atgatattgc aacctattac tgtcagcaga gtaaggatga tccgtacacg 360

10 tttggagctg ggaccaagct ggaactgaaa 390

<210> 18

<211> 393

<212> ADN

15 <213> *Rattus norvegicus*

	<400> 18	
	atgaaagtgc ctggtaggct gctggtgctg ttgttttggga ttccagcttc caggagtgat	60
	gttgtgttga cacaaactcc agtttccctg tctgtcacac ttggagatca agcttctata	120
	tcttgcagggt ctagtccagag cctggaatat agtgatggat acacttattt ggaatggtac	180
	ctacagaagc caggccagtc tccacaggtc ctcatctatg gagtttccaa ccgattttct	240
	ggggtcccag acaggttcat tggcagtggg tcaggggacag atttcaccct caagatcagc	300
	agagtagagc ctgaggactt gggagtattat tactgtcttc aagctacaca tgatccgtac	360
	acgtttgggg ctgggaccag gctggaactg aaa	393
5	<210> 19 <211> 384 <212> ADN <213> <i>Rattus norvegicus</i>	
	<400> 19	
	atgggtgtgc ctactcatct cctgggtttg ttgtgtctct ggattacaca tgccatatgt	60
	gatatccgga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtcaac	120
	atcgaatgtc tagcaagtga ggacgtttac agtgatttag catggtatca gcagaagcca	180
	gggaaatctc ctcagctcct gatctataat gcaaataatt taaaaagtgg ggtcccttca	240
	cggtttagtg gcagtggatc tggcacacgg tattctctaa aaataaacag cctgcaatct	300
	gaagatgtcg cgacttattt ctgtcaacaa tataacaatt atcctccgta cacgtttgga	360
10	gctgggacca agctggaact gaaa	384
	<210> 20 <211> 381 <212> ADN <213> <i>Rattus norvegicus</i>	
15	<400> 20	
	atgaacgtgc ccaactcaact ccttgggttg ctgtactct ggcttacagg tggtaaagt	60
	gacatccaga tgacacagtc tcctgcctcc ctgtctgctt ctctggaaga aattgtcacc	120
	atcacctgca aggcaagcca gggcattgat aattacttat catggtatca gcagaaacca	180
	gggaaatctc ctcagctcct gatctatgat gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca	240
	cggttcagcg gcagtagatc tggcacacag tattctctta agatcagcag accacagggt	300
	gatgattctg gaatctatta ctgtctacag agttacagta ctccattcac gttcgggtca	360
	gggacgaagt tggaaataaa a	381
20	<210> 21 <211> 381 <212> ADN <213> <i>Rattus norvegicus</i>	

<400> 21
atgaacgtgc ccactcaact ccttgggttg ctgctactct ggcttacagg tggtaaagt 60
gacatccaga tgacacagtc tctgcctcc ctgtctgctt ctctggaaga aattgtcacc 120
atcacctgca aggcaagcca ggccattgat gcttacttat catggtatca gcagaaacca 180
gggaaatctc ctcagctcct gatctatgat gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 240
cgggttcagcg gcagtagatc tggcacacag tattctctta agatcagcag accacagggt 300
gatgattctg gaatctatta ctgtctacag agttacagta ctccattcac gttcgggtca 360
gggacgaagt tggaaataaa a 381

5 <210> 22
<211> 130
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 22
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
20 25 30
Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45
Ser Ile Ser Ser His Asp Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60
Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Phe Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80
Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95
Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110
Gln Ser Lys Asp Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

10 Leu Lys
130
<210> 23
<211> 131
<212> PRT
15 <213> *Rattus norvegicus*

ES 2 602 459 T3

<400> 23

Met Lys Val Pro Gly Arg Leu Leu Val Leu Leu Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val
20 25 30

Thr Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu
115 120 125

Glu Leu Lys
130

<210> 24

<211> 128

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 24

Met Gly Val Pro Thr His Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Thr
1 5 10 15

His Ala Ile Cys Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Asn Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Val Tyr Ser Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Asn Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Arg Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn
100 105 110

Asn Tyr Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 25
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 25
 Met Asn Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Glu Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly
 35 40 45
 Ile Asp Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser
 85 90 95
 Arg Pro Gln Val Asp Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Tyr
 100 105 110
 Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

10

<210> 26
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

15

<400> 26
 Met Asn Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

ES 2 602 459 T3

Ala Ser Leu Glu Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ala
35 40 45

Ile Asp Ala Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser
85 90 95

Arg Pro Gln Val Asp Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Tyr
100 105 110

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

<210> 27

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR1 de KM4065

<400> 27

Asn Tyr Gly Met Ala
1 5

<210> 28

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR2 de KM4065

<400> 28

Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR3 de KM4065

<400> 29

Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

35

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR1 de KM4065

<400> 30

	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Ser	His	Asp	Leu	Met	Gln
5	1				5					10					15

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR2 de KM4065

<400> 31

	Asp	Ala	Phe	Asn	Leu	Ala	Ser
15	1				5		

<210> 32

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR3 de KM4065

25 <400> 32

	Gln	Gln	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Tyr	Thr
	1				5				

<210> 33

30 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR1 de KM4066

<400> 33

	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn
	1				5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR2 de KM4066

<400> 34

	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys
	1				5					10					15	

Gly

50 <210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR3 de KM4066

<400> 35
Glu Gly Ser Ser Thr Asp Arg Tyr Tyr Glu Val Ser Phe Ala Tyr
 1 5 10 15

5 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR1 de KM4066

<400> 36
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

15 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR2 de KM4066

<400> 37
Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

25 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR3 de KM4066

<400> 38
Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Tyr Thr
 1 5

35 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR1 de KM4067

45 <400> 39
Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5

50 <210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR2 de KM4067

<400> 40
Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Asn Thr Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 41
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR3 de KM4067
 <400> 41
 10 **Arg Gly Thr Val Tyr Tyr Gly Leu Gly Tyr Phe Asp His**
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR1 de KM4067
 20 <400> 42
 Leu Ala Ser Glu Asp Val Tyr Ser Asp Leu Ala
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR2 de KM4067
 30 <400> 43
 Asn Ala Asn Asn Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 44
 35 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR3 de KM4067
 <400> 44
 Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro Tyr Thr
 1 5 10
 45 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR1 de KM4068
 <400> 45
 Ser Asn Ser Val Ser
 1 5
 55 <210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR2 de KM4068

<400> 46

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

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR3 de KM4068

15 <400> 47

	Ala	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Asn	Phe	Pro	Phe	Asp	Tyr
	1				5					10			

<210> 48

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR1 de KM4068

25 <400> 48

	Lys	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Asp	Asn	Tyr	Leu	Ser
	1				5					10	

<210> 49

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR2 de KM4068

<400> 49

	Asp	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp
	1				5		

40 <210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR3 de KM4068

<400> 50

	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Phe	Thr
	1				5				

50 <210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR1 de KM4069

<400> 51

	Ser	Asn	Ser	Val	Ser
	1				5

60 <210> 52

<210> 52
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR2 de KM4069

 10 <400> 52
 Val Ile Trp Ser Asn Gly Asp Ala Asp Tyr Asn Ser Ala Ile Lys Ser
 1 5 10 15

 <210> 53
 <211> 13
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: HCDR3 de KM4069
 20 <400> 53
 Ala Asn Pro Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Phe Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 54
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR1 de KM4069

 <400> 54
 Lys Ala Ser Gln Ala Ile Asp Ala Tyr Leu Ser
 1 5 10

 35 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR2 de KM4069

 <400> 55
 Asp Ala Thr Ser Leu Ala Asp
 1 5
 45
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: LCDR3 de KM4069

 <400> 56
 Leu Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 55 1 5

 <210> 57
 <211> 132
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 602 459 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4065VH		
	<400> 57		
	ccaattaacc ctcactaaag gggcgccgc gacccctcac catgaacctc gggctcagtt	60	
	tgattttcct tgccctcatt ttaaaagggtg tccagtgtga ggtgcaactg gtagagtctg	120	
5	ggggcggttt ag	132	
	<210> 58		
	<211> 80		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4065VH		
15	<400> 58		
	gggtaatacg actcactata gggcgggccc ttggtggagg ctgaggacac ggtgaccatt	60	
	attcctggtc cccagaagtc	80	
	<210> 59		
	<211> 116		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4065VL		
	<400> 59		
	ccaattaacc ctcactaaag ggggaattcgc ctcttcaaaa tgaagttgcc tgttaggctg	60	
	ttggtgctga tgttctggat tcctgcttcc agcagtgcaca ttgtgctgac ccagtc	116	
	<210> 60		
30	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4065VL		
	<400> 60		
	gggtaatacg actcactata gggccgtacg ttcagttcc agcttggctc	50	
40	<210> 61		
	<211> 118		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4066		
	<400> 61		
	ccaattaacc ctcactaaag gggcgccgc gacccctcac catgaacctc gggctcagtt	60	
	tgattttcct tgccctcatt ttaaaagggtg tccagtgtga ggtgcagctg gaggagtc	118	
50	<210> 62		
	<211> 61		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55			

ES 2 602 459 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4066VH		
	<400> 62		
	gggtaatac g actcactata gggcgggccc ttggtggagg ctgaagagac agtgaccaga	60	
5	g		61
	<210> 63		
	<211> 118		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4066		
15	<400> 63		
	ccaattaacc ctcaactaaag gggaattcgc ctcttcaaaa tgaagttgcc tgttaggctg	60	
	ttggtgctga tgttctggat tctgtcttc agcagtgatg ttgtgttgac acaaactc	118	
	<210> 64		
	<211> 50		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4066VL		
25	<400> 64		
	gggtaatac g actcactata gggccgtacg ttcagttcc agcctggctc	50	
	<210> 65		
30	<211> 115		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4067VH		
	<400> 65		
	ccaattaacc ctcaactaaag gggcggcgcc gaccctcac catgagagtg cttattttat	60	
	tgtggctggt cacagccttt cctggtattc ttagtcaggt caagctgctg cagtc	115	
40	<210> 66		
	<211> 62		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4067VH		
	<400> 66		
	gggtaatac g actcactata gggcgggccc ttggtggagg ctgaagagac tgtgaccatg	60	
50	ac		62
	<210> 67		
	<211> 125		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4067VL		

ES 2 602 459 T3

	<400> 67	
	ccaattaacc ctcaactaaag gggaattcgc ctccctcaaaa tgcattttca agtgcagatt	60
	ttcagcttcc tgcttatttc ggcctcagtc ataatgtcca gaggagatat ccggatgaca	120
	cagtc	125
5	<210> 68 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4067VL	
	<400> 68 gggtaatacg actcactata gggccgtacg ttccagttcc agcttggtcc	50
15	<210> 69 <211> 115 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4068VH	
	<400> 69 ccaattaacc ctcaactaaag gggcggccgc gacccctcac catgagagtg cttattttat	60
25	tgtggctggt cacagccttt cctggtattc ttagtcaagt gcaactaaag gagtc	115
30	<210> 70 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4068VH	
	<400> 70 gggtaatacg actcactata gggcgggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgacctg	60
40	<210> 71 <211> 125 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4068VL	
45	<400> 71 ccaattaacc ctcaactaaag gggaattcgc ctccctcaaaa tgcattttca agtgcagatt	60
	ttcagcttcc tgcttatttc ggcctcagtc ataatgtcca gaggagacat ccagatgaca	120
	cagtc	125
50	<210> 72 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4068VL	

	<400> 72 gggtaatacg actcactata gggccgtacg tttatttcc aactcgtcc c	51
5	<210> 73 <211> 115 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4069	
	<400> 73 ccaattaacc ctcaactaaag gggcggccgc gacccctcac catgagagtg cttattttat	60
	tgtggctggt cacagccttt cctggtatte ttagtcaagt gcaactaaag gagtc	115
15	<210> 74 <211> 61 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4069VH	
	<400> 74 gggtaatacg actcactata gggcgggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgaccatg	60
25	a	61
30	<210> 75 <211> 125 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 1 de KM4069VL	
	<400> 75 ccaattaacc ctcaactaaag ggggaattcgc ctccctcaaaa tgcattttca agtgcagatt	60
	ttcagettcc tgettatttc ggcctcagtc ataatgtcca gaggagacat ccagatgaca	120
	cagtc	125
40	<210> 76 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador híbrido 2 de KM4069VL	
	<400> 76 gggtaatacg actcactata gggccgtacg tttatttcc aactcgtcc c	51
50	<210> 77 <211> 120 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de KM4065 HV0	

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 78

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de KM4065 LV0

<400> 78

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

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

Ser His Asp Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Asp Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 79

<211> 60

<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 1 del vector de expresión de CD4	
	<400> 79	
	ccaattaacc ctactaaag gggaattcga ccctcacca tgaaccgggg agtcctttt	60
10	<210> 80	
	<211> 59	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 2 del vector de expresión de CD4	
	<400> 80	
	gggtaatacg actcactata gggcactagt gtcgcactca aatggggcta catgtcttc	59
20	<210> 81	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 1 de la expresión de CD4-Fc vector	
	<400> 81	
30	tctgcccaca tggccaccg agcccaaac ttgtgacaaa a	41
	<210> 82	
	<211> 44	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 2 de la expresión de CD4-Fc vector	
40	<400> 82	
	gggtaatacg actcactata gggcactagt ggatccgctg cact	44
45	<210> 83	
	<211> 92	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 1 de 6G5VL	
	<400> 83	
	ccaattaacc ctactaaag gggaattcga ccctcacca tgatgggtccc agtcagctc	60
	ctcgggtctcc tgcgtctctg gttcccagggt tc	92
55	<210> 84	
	<211> 93	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 2 de 6G5VL	

	<400> 84	
	agtgatggtg actctgtctc ctacagatgc agacacggaa gatggagact gggtcacatctg	60
	gatgtcgcac ctggaacctg ggaaccagag cag	93
5	<210> 85 <211> 93 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 3 de 6G5VL	
	<400> 85	
	ggagacagag tcaccatcac ttgtcgggag agtcaggata ttagcagctg gttagcctgg	60
	tatcagcata aaccaggtaa agcacctaag ctc	93
15	<210> 86 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 4 de 6G5VL	
	<400> 86	
	agagtgaat ctgtcccaga tccacttcg ctgaaccttg atgggacacc actttgcaaa	60
25	ctggatgcag catagatcag gagcttaggt gctttacctg g	101
30	<210> 87 <211> 94 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 5 de 6G5VL	
	<400> 87	
	gatctgggac agatttcact ctccactatca gcagcctgca gcctgaagat tttgcaactt	60
35	actattgtca acaggctaag agtttcccgt acac	94
40	<210> 88 <211> 89 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 6 de 6G5VL	
45	<400> 88	
	gggtaatacg actcactata gggcggtacc cgtacgtttg atctccagct tggttccctg	60
	acaaaaagtg tacgggaaac tattagcct	89
50	<210> 89 <211> 148 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 1 de 6G5VH	

	<400> 89	
	ccaattaacc ctcactaaag gggaattcgc ggcgcgcgacc cctcaccatg aaacacctgt	60
	ggttcttctcct cctcctgggtg gcagctccta gatgggtcct gtctcagggtg cagctacagc	120
	agtggggcgc aggactggtg aagccttc	148
5	<210> 90 <211> 129 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 2 de 6G5VH	
	<400> 90	
	gatttcacca atccactcca gacccttacc tggtaggtgg cggatccagc tccagtagta	60
	accactgaag gaaccacccat agacagcgca ggtgagggac agggctctccg aaggcttcaa	120
15	cagtcctgc	129
20	<210> 91 <211> 156 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 3 de 6G5VH	
25	<400> 91	
	ctggagtgga ttggtgaaat caatcatagt ggaagcacca actacaaccc gtctctcaag	60
	agtcgagtca ccatatcagt agacacgtcc aagaaccagt tctctctgaa actgagctct	120
	gtgaccgctg cggacacggc tgtgtattac tgtgcg	156
30	<210> 92 <211> 124 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Un cebador 4 de 6G5VH	
	<400> 92	
	gggtaatacg actcactata gggcggatcc gggcccttgg ttgaggctga ggagacgggtg	60
	accaggggttc cctggcccca agggtcgaac caattaatta ctctcgaca gtaatacaca	120
	gccg	124
40	<210> 93 <211> 360 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de ADN de KM4065 HV0	

	<400> 93	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggcggc ttggtacagc ctggggcggtc cctgcggctc	60
	tcctgtgcag cctctgggtt cacctttagt aactatggca tggcctgggt ccgccaggct	120
	ccaggaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attagttatg atggcagtat cacttattat	180
	cgagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca attccaagaa cacgctgtac	240
	ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgggaggaa	300
	caatatagca gctgggtactt tgacttctgg ggccagggga ccctggtcac cgtctcctca	360
5	<210> 94	
	<211> 333	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de ADN de KM4065 LV0	
	<400> 94	
	gacatccagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggtga ccgggtcacc	60
	atcacttgtc gggccagcca aagtgtcagt atctctagcc atgatctcat gcagtgggtat	120
	cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc ctgatctatg atgcattcaa cctggcatct	180
	gggggtcccat cacggttcag cggcagtgggt tctgggacag atttactct caccatcagc	240
	agcctgcagc ctgaagattt tgcaacttat tactgccagc agagtaagga tgatccgtac	300
	acgttcgggc aggggaccaa gctggagatc aaa	333
15	<210> 95	
	<211> 360	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de ADN de HV2	
	<220>	
	<221> CDS	
25	<222> (1)..(360)	

<400> 95

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	ggc	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	cgg		48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg		
1				5					10					15			
tcc	ctg	cgg	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	ggg	ttc	acc	ttt	agt	aac	tat		96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr		
			20					25					30				
ggc	atg	gcc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtc		144
Gly	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
gca	acc	att	agt	tat	gat	ggc	agt	atc	act	tat	tat	cga	gac	tcc	gtg		192
Ala	Thr	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
aag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	tcc	cgg	gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tac		240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
65					70				75					80			
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	cga	gcc	gag	gac	acg	gcc	gta	tat	tac	tgt		288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85					90					95				
acg	cgg	gag	gaa	caa	tat	agc	agc	tgg	tac	ttt	gac	ttc	tgg	ggc	cag		336
Thr	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ser	Ser	Trp	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
ggg	atc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca										360
Gly	Ile	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115				120											

<210> 96

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HV2

<400> 96

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 97

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de ADN de HV3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 97

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg ggc ggc ttg gta cag cct ggg cgg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg cgg ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttc acc ttt agt aac tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45


```

gca acc att agt tat gat ggc agt atc act tat tat cga gac tcc gtg      192
Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
  50                      55                      60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aat tcc aag aac acg ctg tac      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
  65                      70                      75                      80

ctg caa atg aac agc ctg cga gcc gag gac acg gcc acc tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                      85                      90                      95

acc cgg gag gaa caa tat agc agc tgg tac ttt gac ttc tgg ggc cag      336
Thr Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
                      100                      105                      110

ggg atc ctg gtc acc gtc tcc tca      360
Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
                      115                      120

```

<210> 98
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HV3

```

<400> 98
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
  1                      5                      10                      15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
          20                      25                      30

```

```

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35                      40                      45

```

```

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
  50                      55                      60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
  65                      70                      75                      80

```

```

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

```

```

Thr Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
          100                      105                      110

```

```

Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
  115                      120

```

<210> 99
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de ADN de HV4

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 99

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg ggc ggc ttg gta cag cct ggg cgg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc atg cgg ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttc acc ttt agt aac tat 96
Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg gcc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt tat gat ggc agt atc act tat tat cga gac tcc gtg 192
Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aat tcc aag aac acg ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cga gcc gag gac acg gcc acc tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

acc cgg gag gaa caa tat agc agc tgg tac ttt gac ttc tgg ggc cag 336
Thr Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

ggg atc ctg gtc acc gtc tcc tca 360
Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

$\langle 210 \rangle$ 100

$\langle 211 \rangle$ 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de HV4

<400> 100

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

15

ES 2 602 459 T3

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de ADN de LV6

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(333)

<400> 101
gac atc cag ctg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gtc tct ctt ggt 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
gac cgg gcc acc atc act tgt cgg gcc agc caa agt gtc agt atc tct 96
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ser
20 25 30
agc cat gat ctc atg cag tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa cag cct 144
Ser His Asp Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro
35 40 45
aag ctc ctg atc tat gat gca ttc aac ctg gca tct ggg atc cca tca 192
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Phe Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60
cgg ttc agc gcc agt ggt tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
agc gtg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgc cag cag agt aag 288
Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95
gat gat ccg tac acg ttc ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 333
Asp Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 102
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de LV6

ES 2 602 459 T3

<400> 102

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

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

Ser His Asp Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Phe Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Asp Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal frente a CD4 humano, presentando dicho anticuerpo una constante de disociación (K_D) inferior a 1×10^{-9} M, se une a una región extracelular de CD4 humano, y es:

(i) un anticuerpo híbrido humano recombinante en el que la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 12 pero que excluye la secuencia señal secretora de aminoácidos 1 a 19 en SEC ID nº: 12, y la región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 22 pero que excluye la secuencia señal secretora de aminoácidos 1 a 20 en SEC ID nº: 22; o

(ii) un anticuerpo humanizado recombinante en el que:

(a) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 96 y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 78;

(b) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 98 y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 78;

(c) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 77 y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 78;

(d) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 100 y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 78; o

(e) la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 100 y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 102.

2. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 96, y la VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 78.

3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2, que se une a CD4 con una K_D inferior a 7×10^{-10} M.

4. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2, que se une a CD4 con una K_D inferior a 2×10^{-10} M.

5. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo presenta una actividad CDC sobre una estirpe celular de cáncer humano que expresa CD4 humano.

6. ADN que codifica el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

7. Vector recombinante que comprende el ADN según la reivindicación 6.

8. Transformante que puede obtenerse introduciendo el vector recombinante según la reivindicación 7 en una célula hospedante.

9. Procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende cultivar el transformante definido en la reivindicación 8 en un medio para producir y acumular el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el cultivo, y recoger el anticuerpo del mismo a partir del cultivo.

10. Utilización del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un agente diagnóstico o agente terapéutico para un cáncer positivo para CD4 humano.

11. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la utilización en el tratamiento del cáncer positivo para CD4; detección o medición inmunitaria de CD4 *in vivo*; o diagnóstico del cáncer positivo para CD4 *in vivo*.

Fig. 1

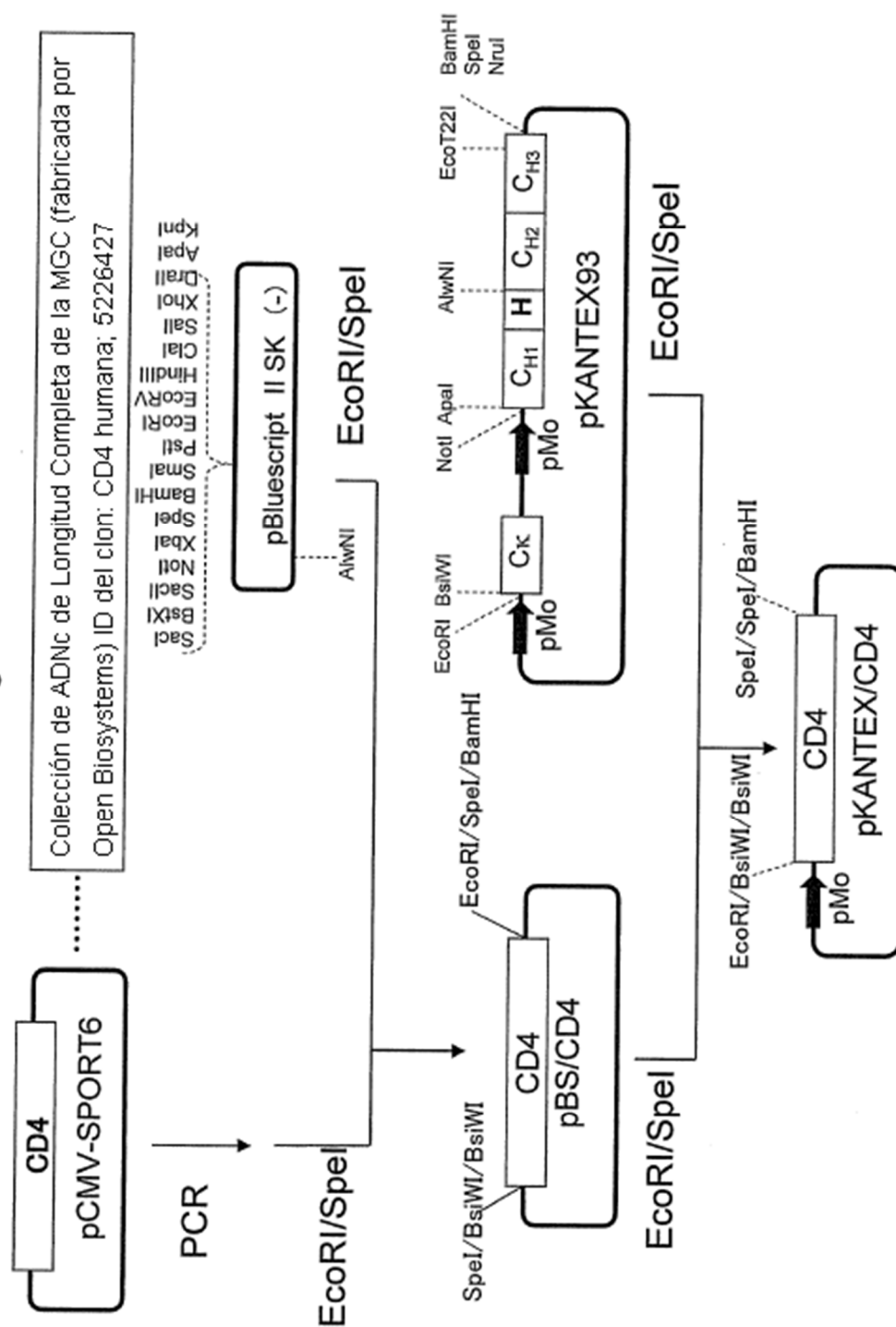


Fig. 2

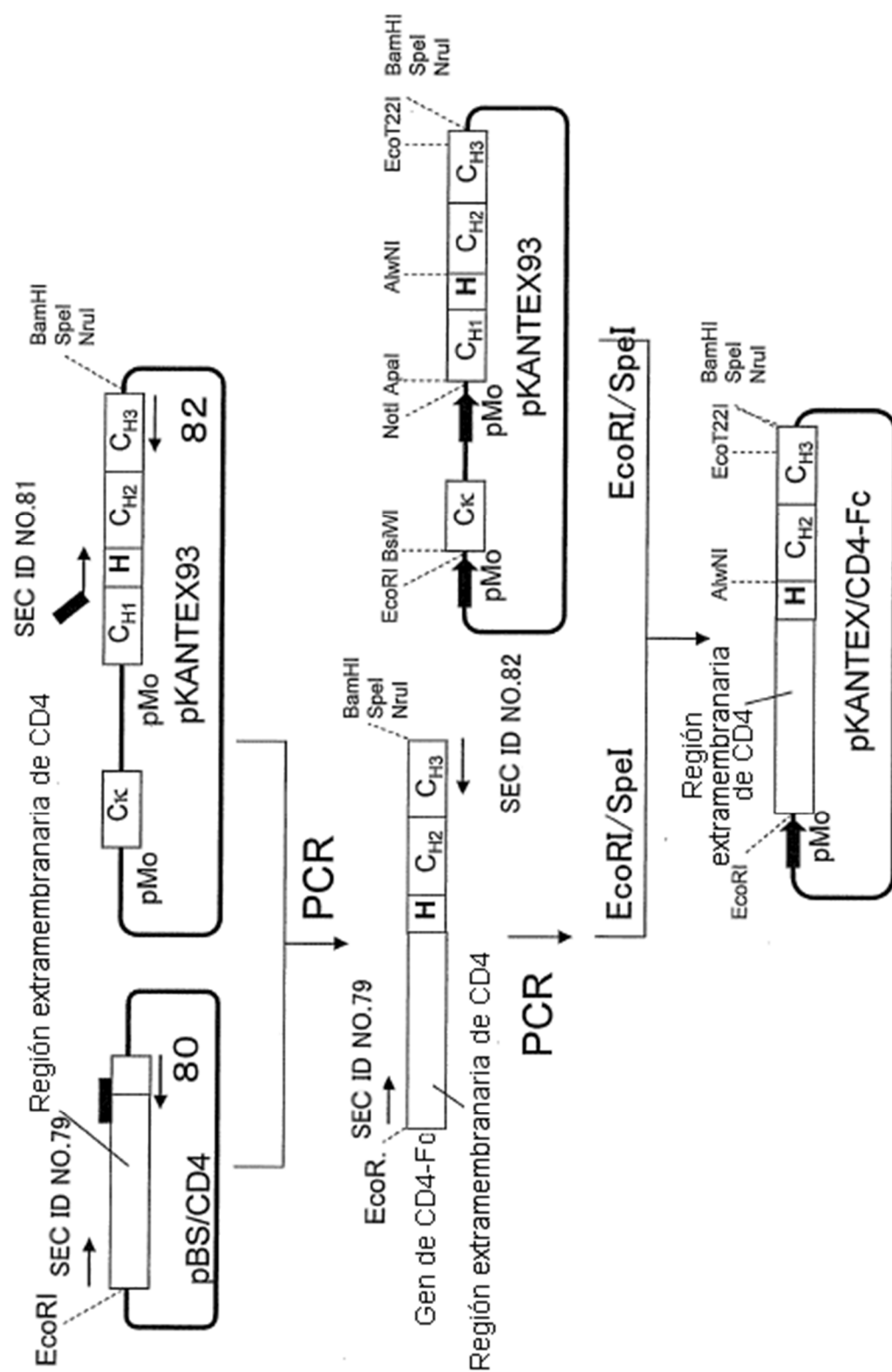


Fig. 3

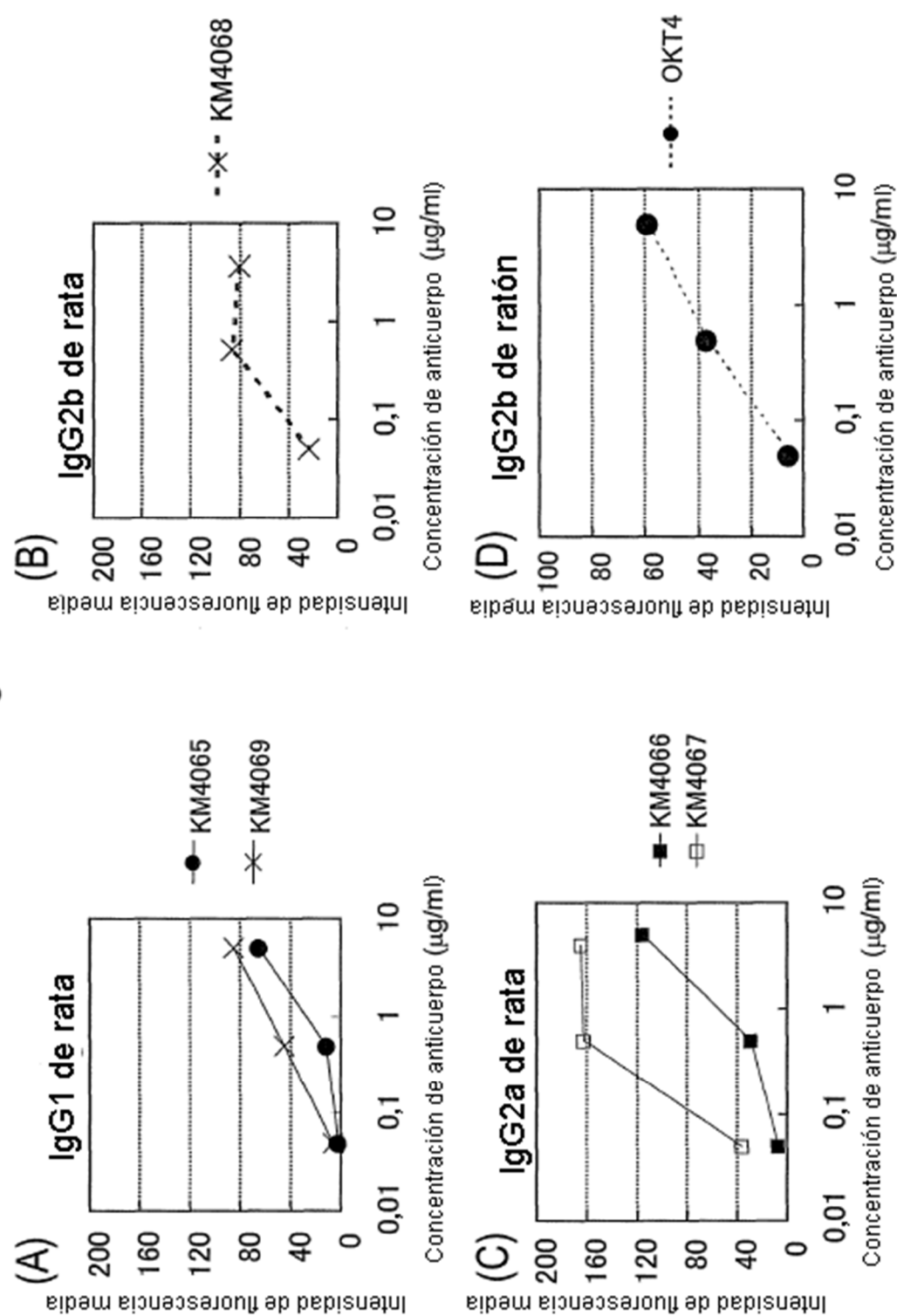


Fig. 4

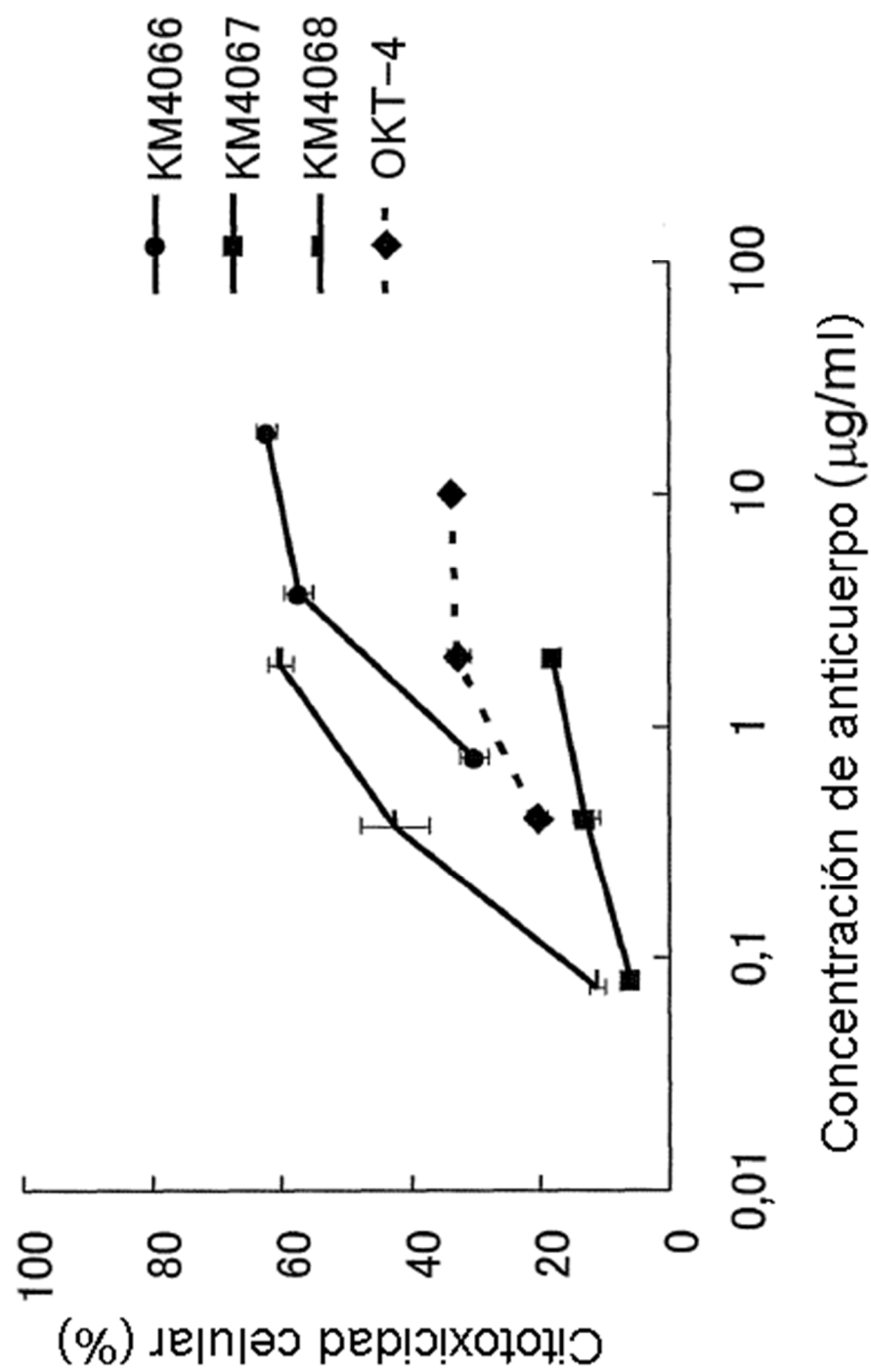


Fig. 5

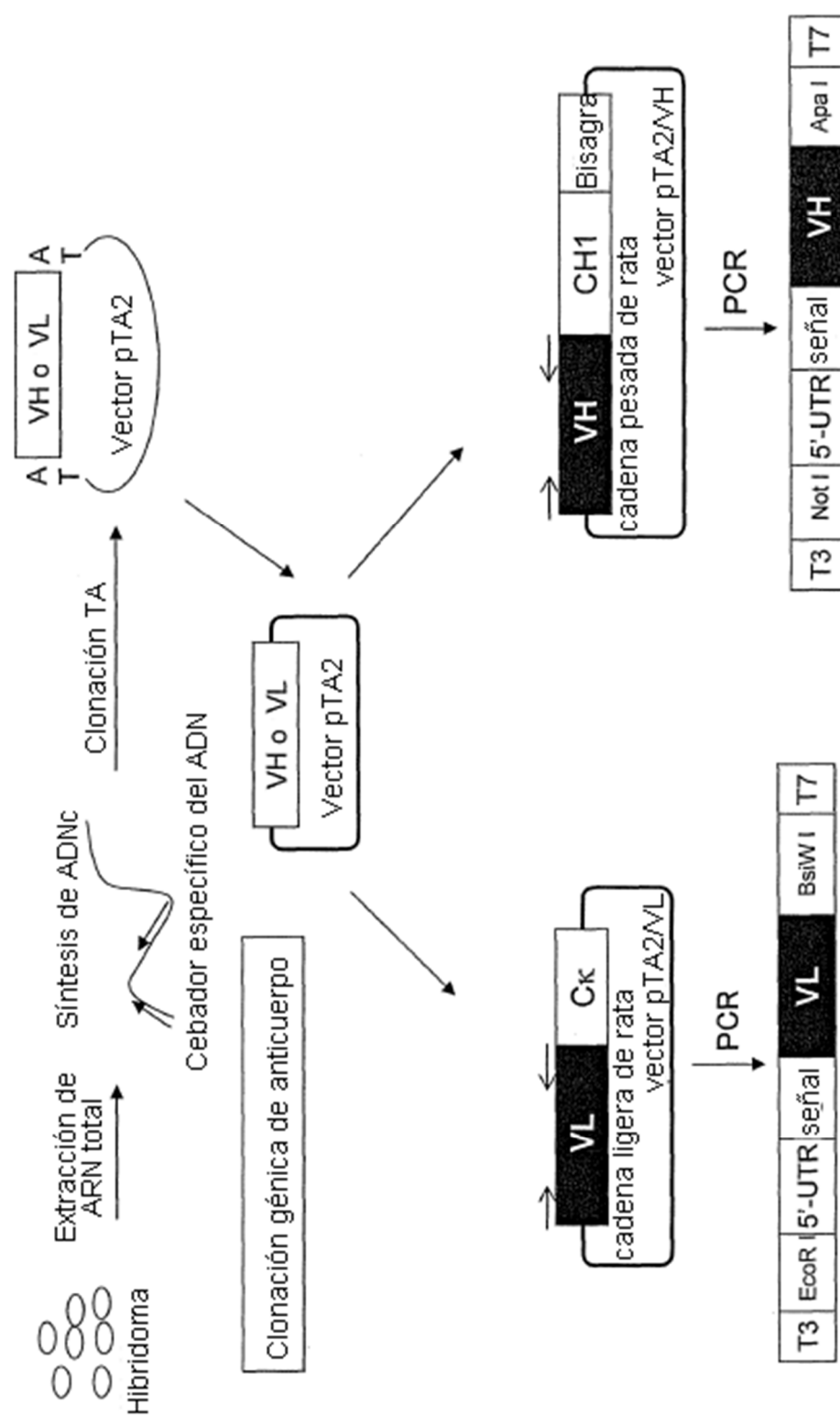


Fig. 6

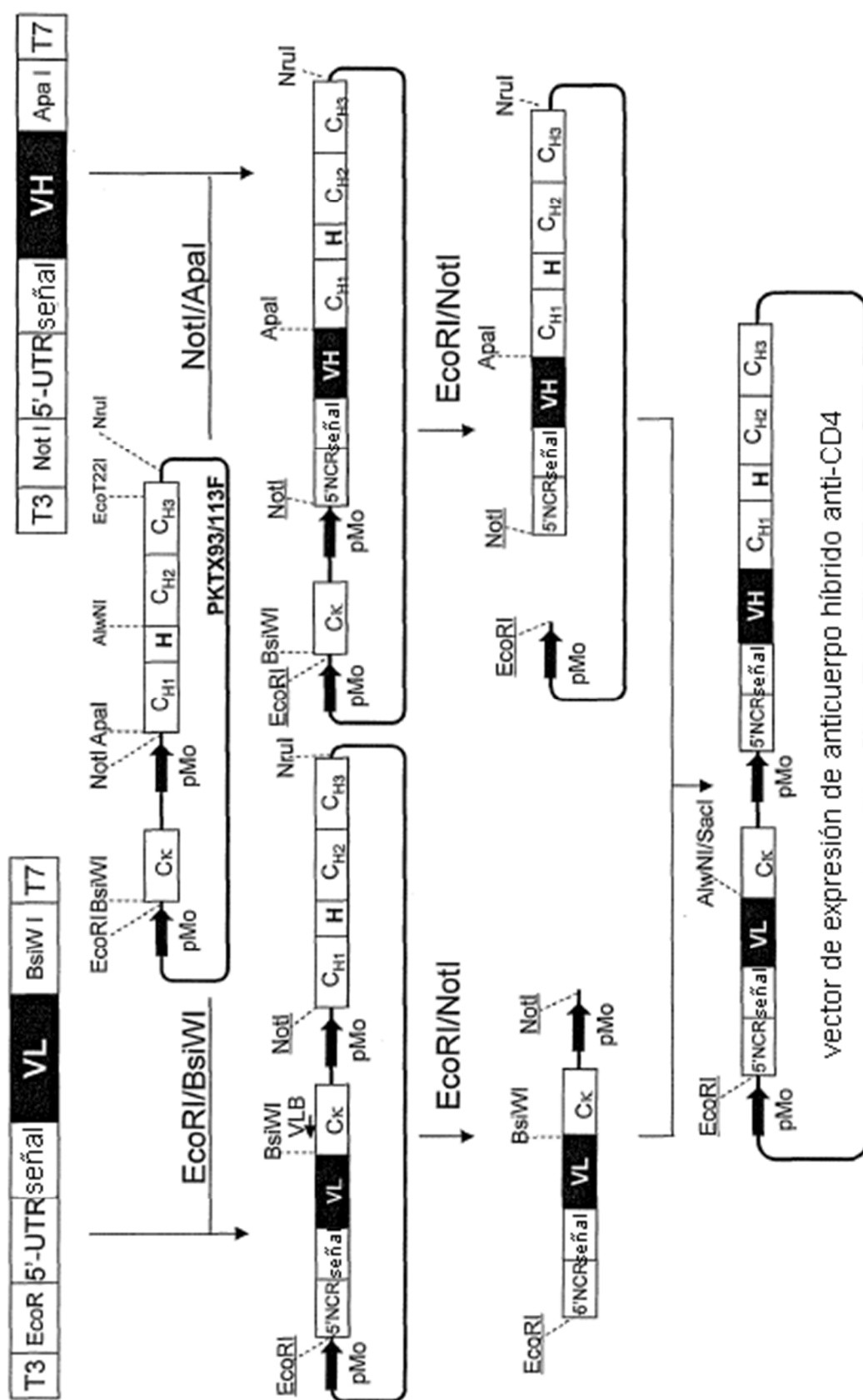


Fig. 7

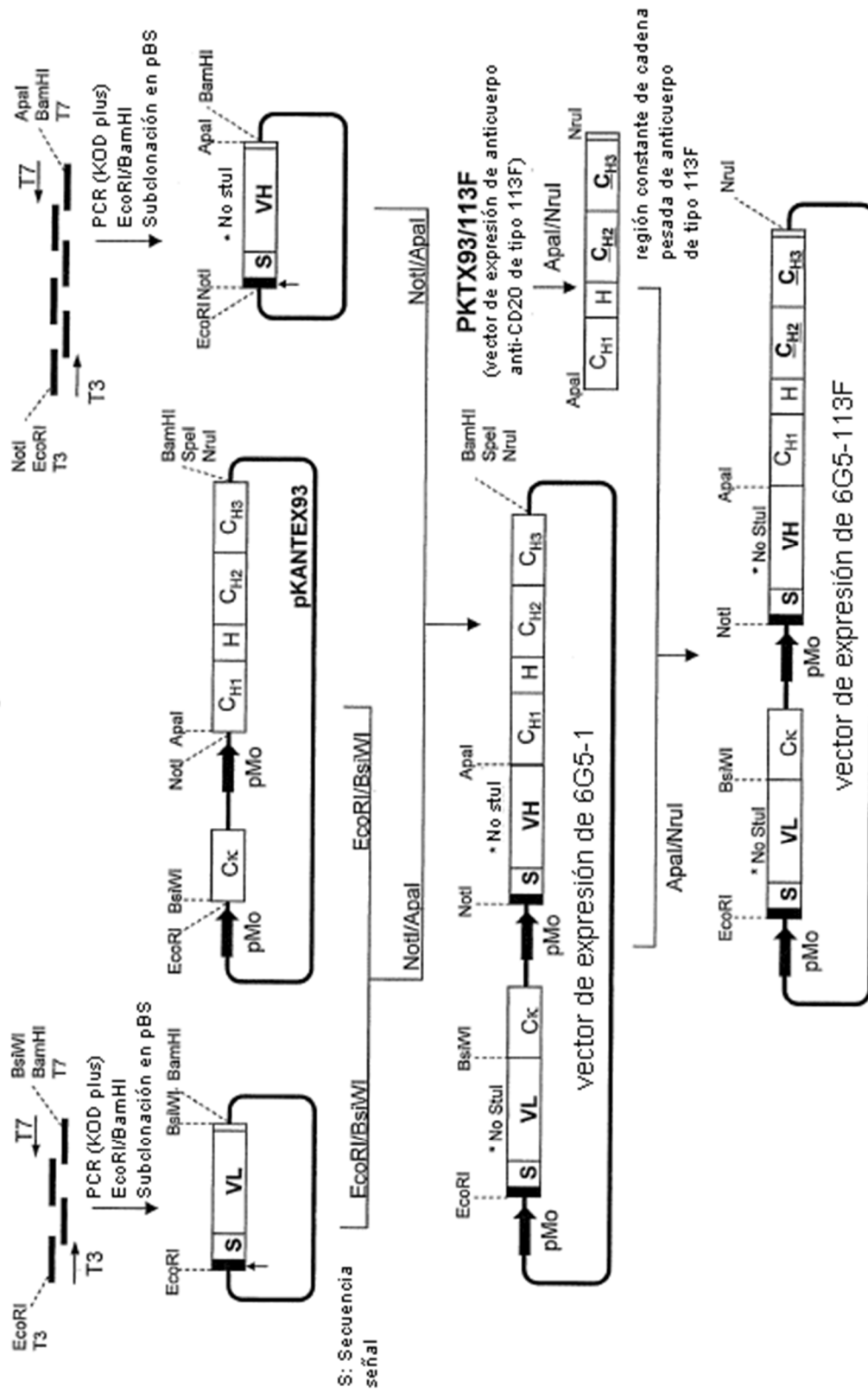
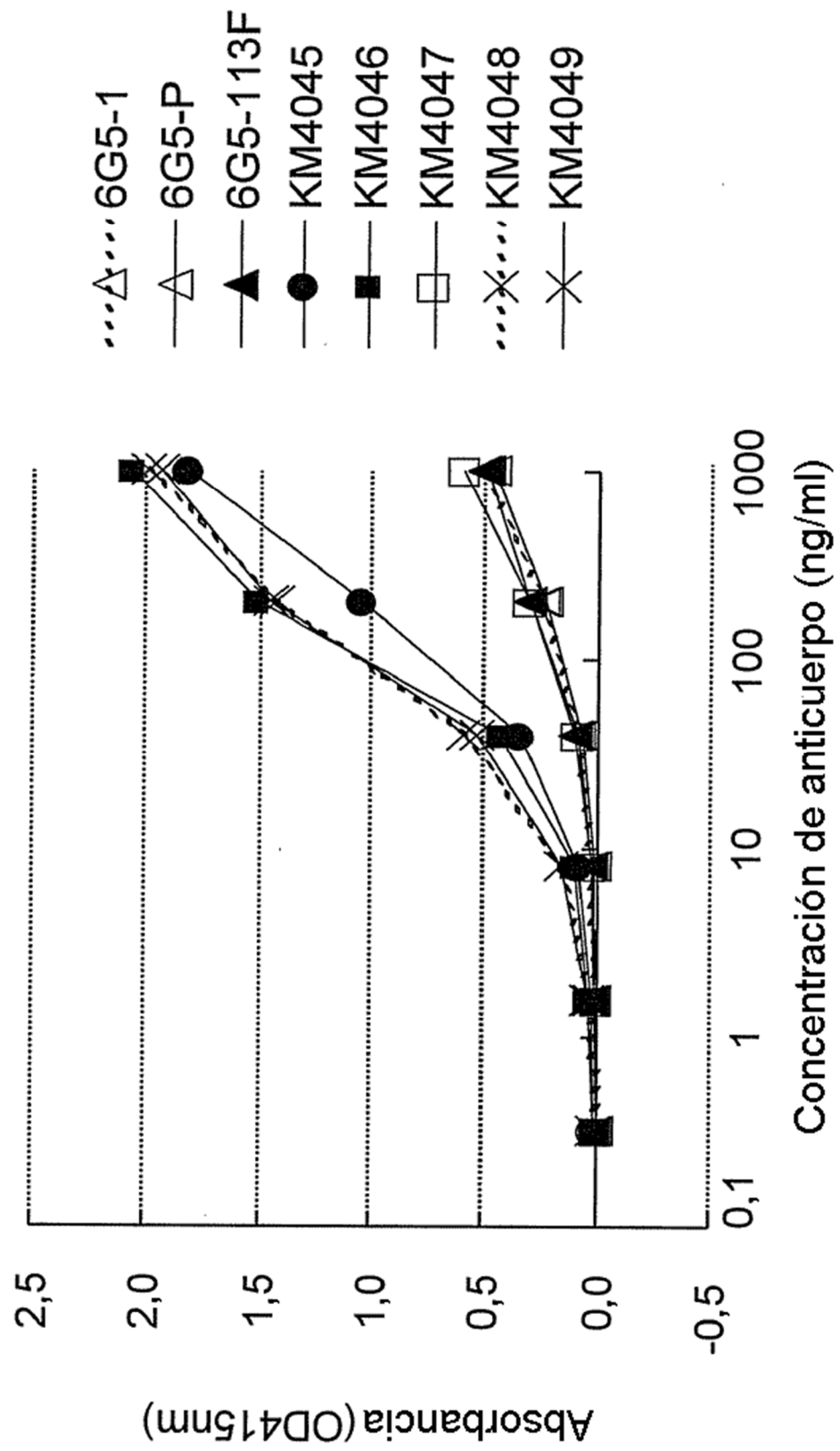


Fig. 8



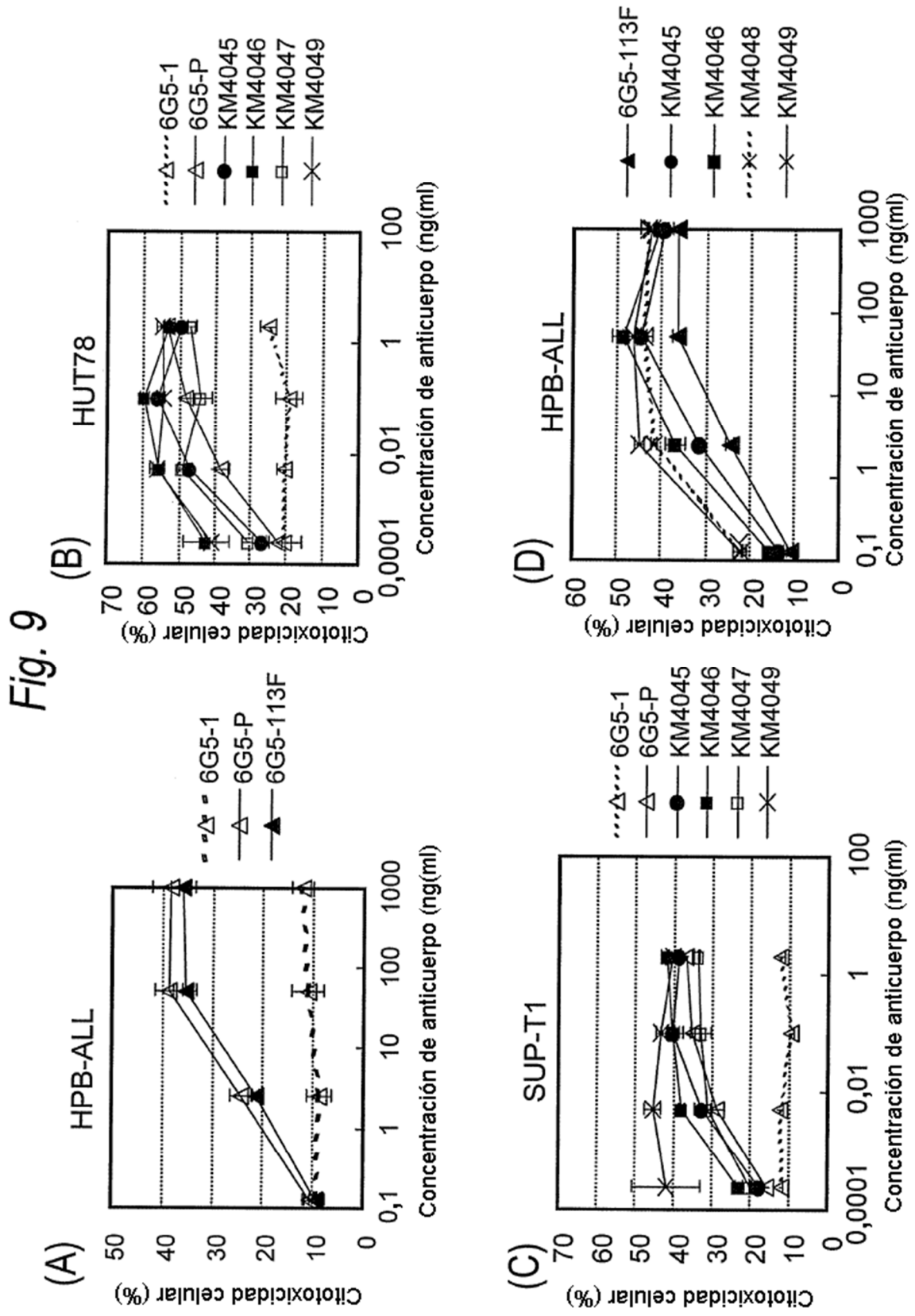


Fig. 10

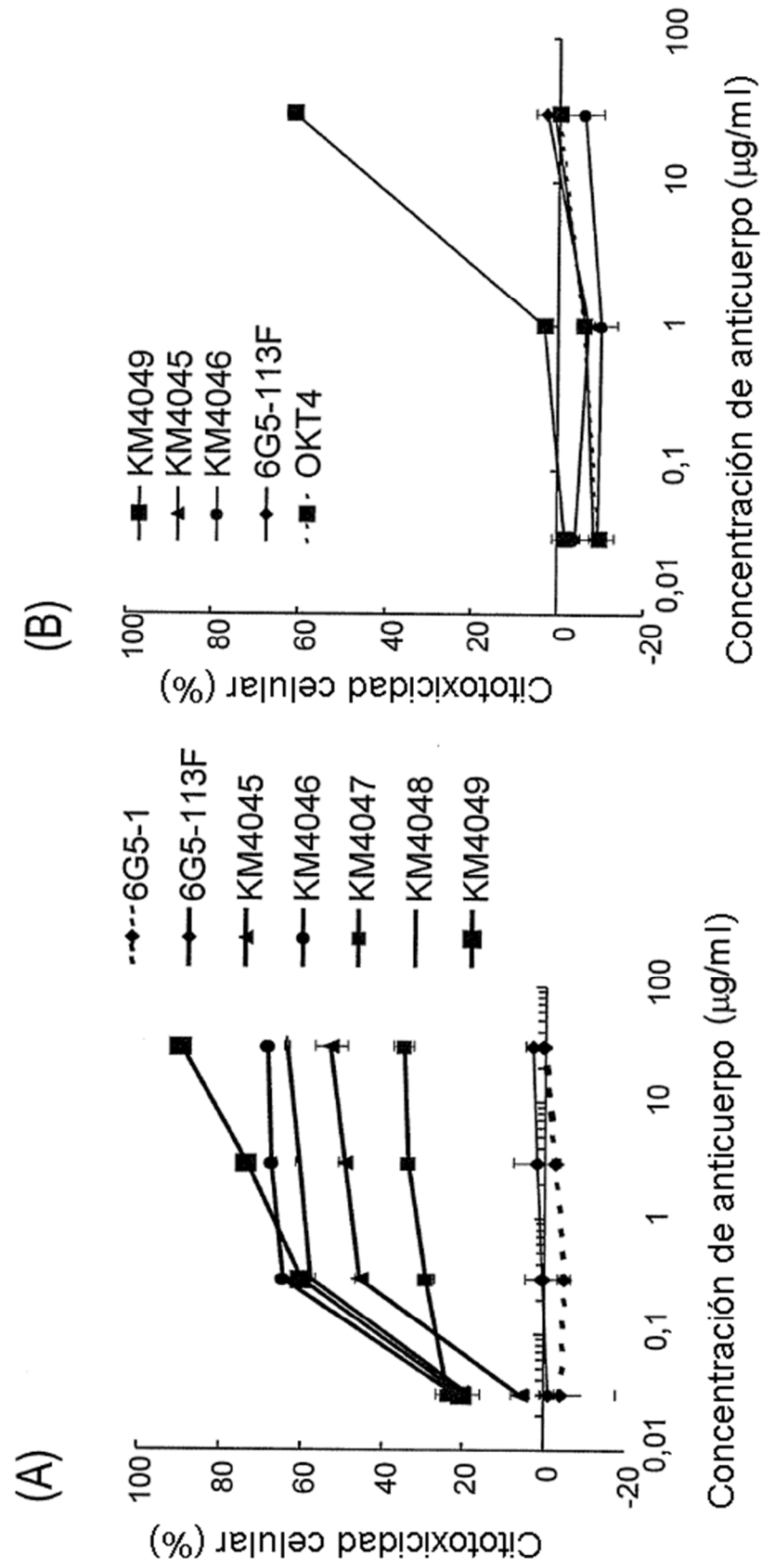


Fig. 11

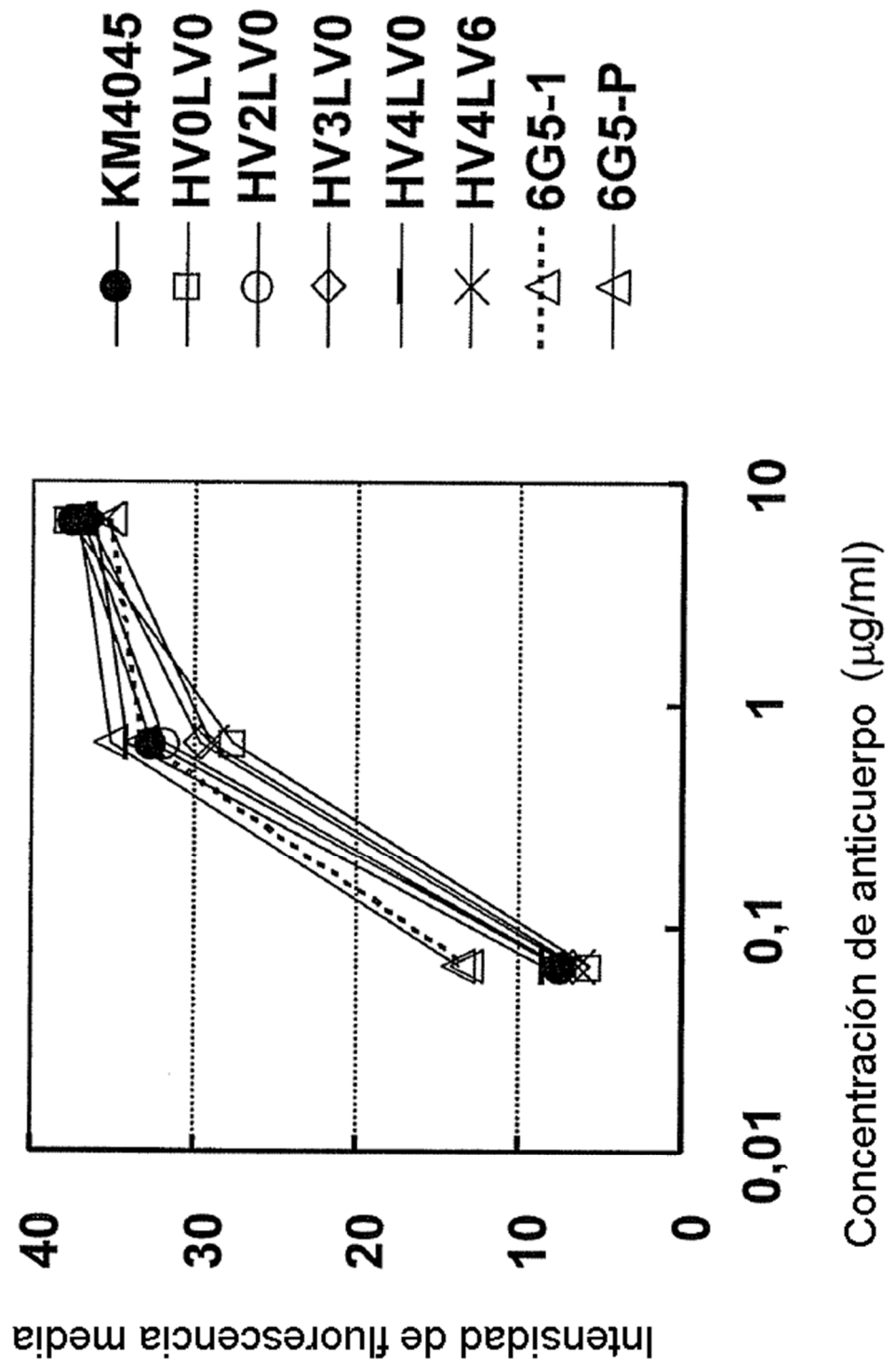


Fig. 12

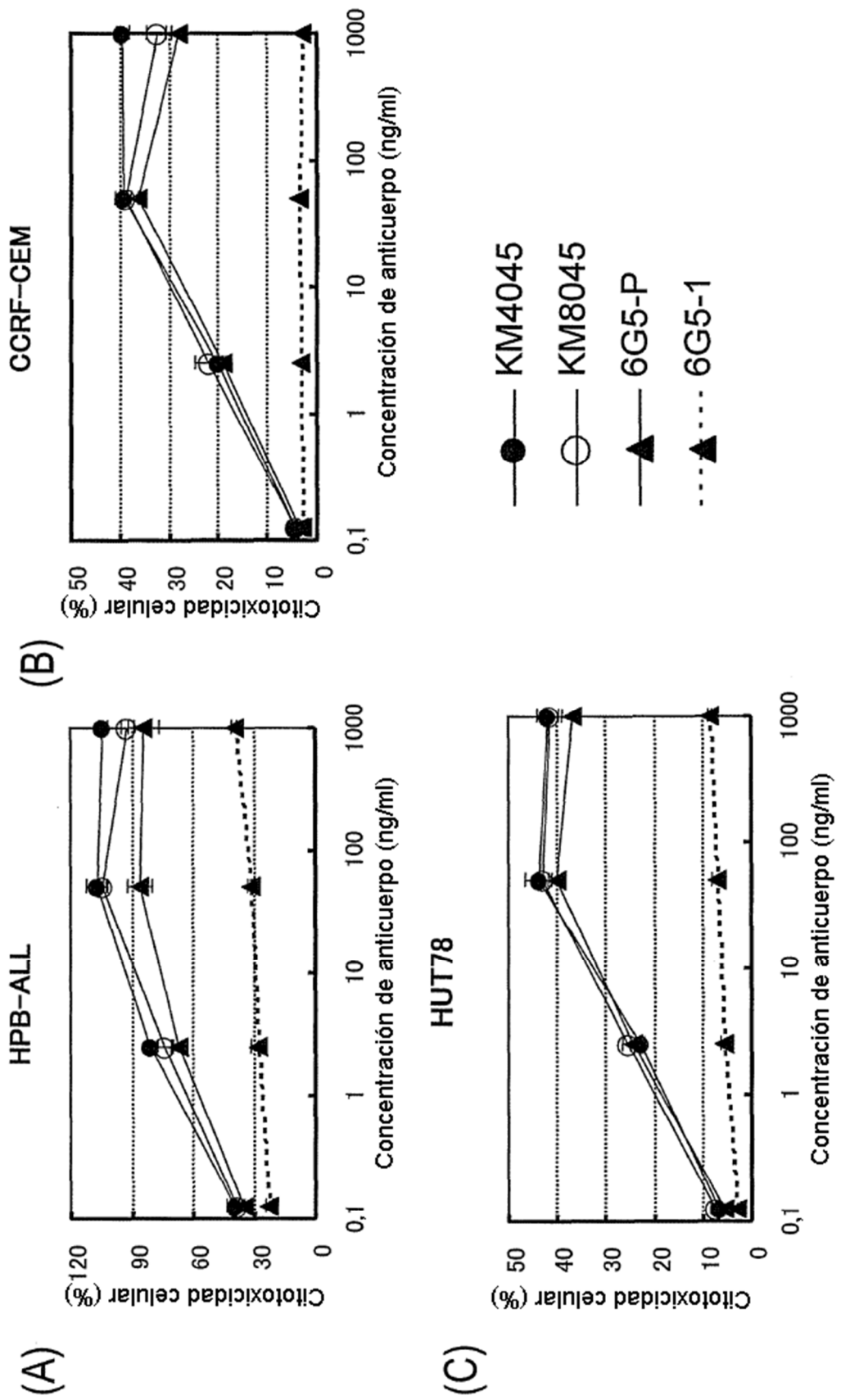


Fig. 13

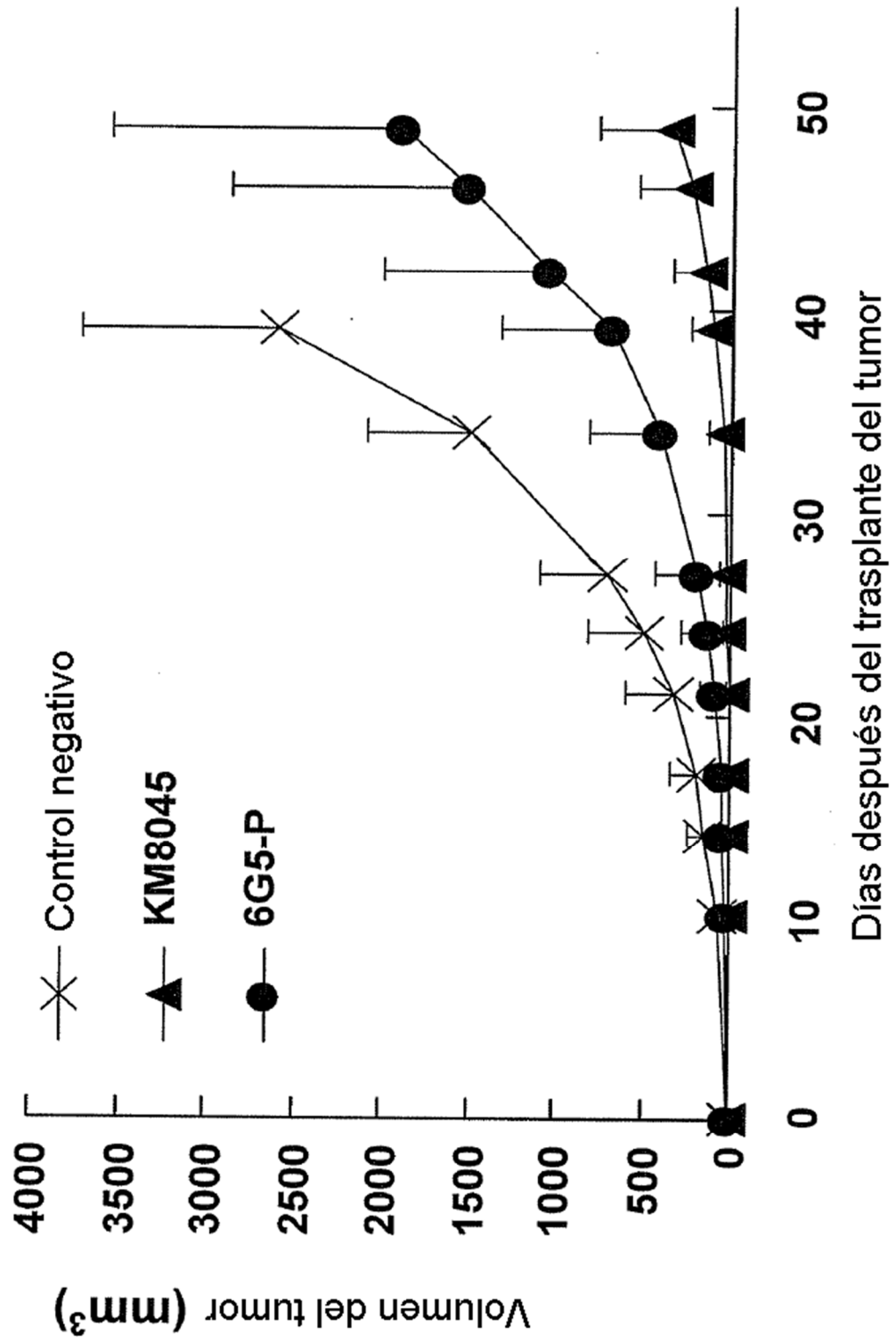


Fig. 14

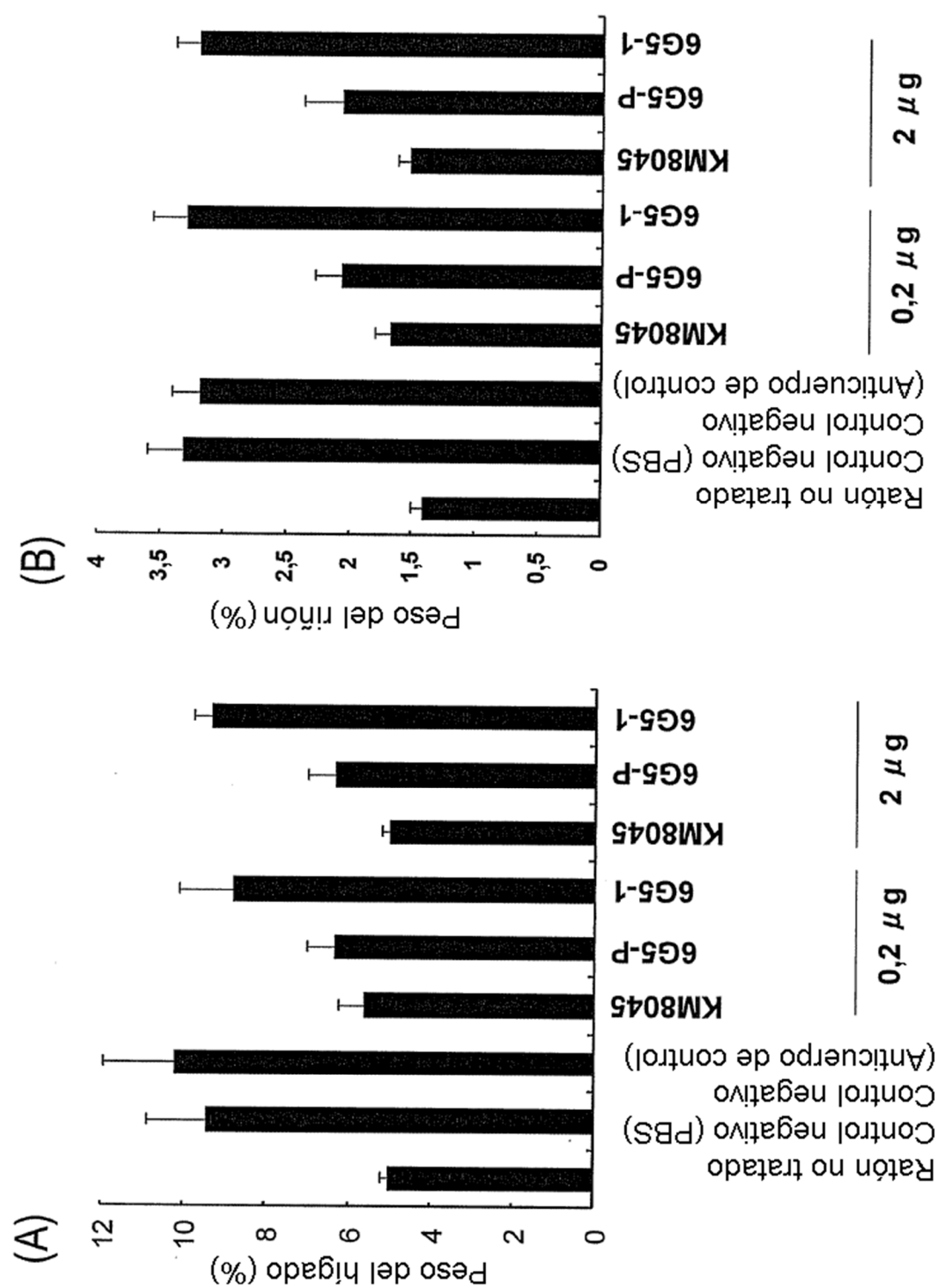


Fig. 15

